

# Identifizierung von molekularen Markern für das duktale *In-situ*-Karzinom der Mamma

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der  
Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der  
Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Dipl. Biologin Céline Schäfer

aus Berlin

September 2009

---

**Die Arbeit wird durchgeführt am:**

Max-Delbrück-Zentrum für molekulare Medizin

Arbeitsgruppe PD Dr. W. Kemmner

Robert-Rössle-Str. 10

13125 Berlin

Zeitraum: April 2006 bis November 2009

1. Gutachter: Prof. Mutzel

2. Gutachter: PD Dr. Kemmner

Disputation am 20.11.2009

---

## **Danksagung**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Wolfgang Kemmner für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und das zur Verfügung gestellte Thema bedanken. Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die gute Betreuung und für die Bereitschaft, eine externe Arbeit zu unterstützen. Besonderer Dank gilt auch Hr. Dr. Winfried Schoenegg, Fr. Prof. Dr. Anja Sterner-Kock und Fr. Dr. Susanne Kopp für die freundschaftliche und hilfreiche Zusammenarbeit.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kemmner, insbesondere Sabine Grigull und den Doktoranden Susann Förster und Pia Forberich möchte ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit danken. Franziska Rudloff, Kornelia Brendel und meinem Vater gebühren Anerkennung für das gewissenhafte und kritische Korrekturlesen dieser Arbeit. Schließlich möchte ich meinem Mann Martin Schäfer und meiner Familie für Ihre Liebe, Aufmunterung und Geduld danken.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	I
1. Einleitung .....	1
1.1 Das invasive Mammakarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie und Inzidenz .....	1
1. 1. 2. Klassifizierung des Mammakarzinoms .....	3
1. 1. 2. 1. Grading .....	3
1. 1. 2. 2. Die TNM-Klassifizierung.....	3
1. 1. 2. 3. Staging .....	4
1. 1. 3. Diagnostik des Mammakarzinoms .....	5
1. 1. 3. 1. Mammographie .....	5
1. 2. Das duktales <i>In-situ</i> -Karzinom (DCIS).....	6
1. 2. 1. Inzidenz und Detektion des DCIS.....	7
1. 2. 2. Klassifizierung des DCIS .....	9
1. 2. 3. Therapieoptionen beim DCIS .....	11
1. 2. 4. Tumorprogressionsmodelle .....	12
1. 3. Mikroarray-Technologie .....	14
1. 3. 1. Die Affymetrix GeneChip® Plattform .....	15
1. 4. Untersuchungsziel .....	18
2. Material und Methoden .....	19
2. 1. Molekularbiologische Kits .....	19
2. 2. Substanzen .....	19
2. 3. Puffer .....	20
2. 4. Geräte, Apparaturen, sonstiges Material.....	22
2. 5. Software.....	23
2. 6. Versuchstiere .....	23

---

2. 6. 1. Das WAP-TNP8 Mausmodell.....	23
2. 6. 1. 1 Simian Virus 40 (SV40).....	24
2. 6. 1. 2. Haltungsbedingungen .....	24
2. 6. 1. 3. Genotypisierung von Mäusen.....	24
2. 6. 1. 4. Gruppierung der Mäuse und experimentelle Verwendung .....	26
2. 7. Humane Gewebe.....	27
2. 8. Brustkrebs-Zelllinie .....	28
2. 9. Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	28
2. 10. RNA-Isolierung.....	29
2. 10. 1. Quantifizierung und Qualitätskontrolle der RNA .....	30
2. 11. cDNA Synthese .....	31
2. 12. Genexpressionsanalyse.....	31
2. 13. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) .....	38
2. 13. 1. Berechnung nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode.....	41
2. 14. Immunhistochemie .....	42
2. 15. Transfektion humaner Brustkrebszellen mit siRNA gegen <i>DEPDC1</i> .....	44
2. 15. 1. Wachstumskurve.....	45
2. 15. 2. Migrations-Assay.....	45
2. 15. 3. Invasions-Assay .....	46
2. 15. 4. Zellzyklusanalyse.....	46
3. Ergebnisse .....	47
3. 1. Histologische Charakterisierung des verwendeten Mausstammes.....	47
3. 2. Genexpressionsanalyse des Mausmodells .....	49
3. 2. 1. Qualitätskontrolle der murinen GeneChip® Mikroarrays.....	49
3. 2. 2. Statistische Analyse zur Identifikation von DCIS-Markern.....	53
3. 2. 2. 1. Funktionelle Einordnung differentiell exprimierter Gene mittels GO-Analyse .....	56

---

3. 2. 2. 2. Selektion von DCIS-Markern .....	58
3. 2. 3. Validierung der murinen GeneChip® Ergebnisse mittels qRT-PCR.....	63
3. 3. Genexpressionsanalyse der humanen Proben .....	65
3. 3. 1. Qualitätskontrolle der Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips®.....	65
3. 3. 2. Statistische Analyse der Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips® .....	68
3. 3. 3. Validierung der humanen Mikroarraydaten Ergebnisse mittels qRT-PCR.....	71
3. 3. 4. Analyse der Proteinexpression der identifizierten DCIS-Marker.....	73
3. 3. 5. Validierung der identifizierten DCIS Marker mittels ONCOMINE .....	76
3. 4. Funktionelle Analyse von DEPDC1 mittels RNA-Interferenz.....	79
4. Diskussion .....	82
5. Zusammenfassung.....	97
6. Summary .....	98
7. Literaturverzeichnis.....	99
8. Anhang .....	109

## Abkürzungen

<i>ACTB</i>	β-Aktin
ADH	Atypische Duktale Hyperplasie
bp	Basenpaare (base pairs)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
cDNA	complementary DNA
CGH	komparative genomische Hybridisierung (Comparative Genomic Hybridization)
cRNA	complementary RNA
Ct	Schwellenwert Zyklus (Threshold Cycle)
DCIS	Duktales <i>In-situ</i> -Karzinom (Ductal Carcinoma <i>In Situ</i> )
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser
DEP-Domäne	(Disheveled, EGL-10, Pleckstrin-Domäne)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol (1,4-Dithiol-2,3-dihydroxybutan)
ECRC	Experimental and Clinical Research Center
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
ER	Östrogenrezeptor (Estrogen Receptor)
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)
FAM	6-Carboxy-Fluoreszin
FC	Fold Change
FCS	Fetales Kälberserum (Foetal Calf Serum)
FDR	Fehlerkontrollkriterium (False Discovery Rate)
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Gravitationsbeschleunigung
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

---

GCRMA	GC Robust Multi-array Average
GO	Gene Ontology
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde (Society for Laboratory Animal Science)
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IARC	International Association on Research of Cancer
IDC	Invasives duktales Karzinom (Invasive Ductal Carcinoma)
IHC	Immunhistochemie
ILC	Invasives lobuläres Karzinom (Invasive Lobular Carcinoma)
LCIS	Lobuläres <i>In-situ</i> -Karzinom (Lobular Carcinoma <i>In Situ</i> )
MM	Miss Match
MMLV-RT	Moloney murine leukemia virus Reverse Transkriptase
mol	Molekulare Einheit der Stoffmenge
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
NaOH	Natronlauge
OD	Optische Dichte
Oligo(dT)	Oligo Desoxythymidin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEM	Positronen Emissions Mammographie
PI	Propidiumiodid
PM	Perfect Match
PR	Progesteronrezeptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RIN	RNA integrity number
RISC-Komplex	RNA-Induced Silencing Complex



---

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RPMI	Kulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
RR	Ribonukleotidreduktase
RT	Reverse Transkriptasen
SF	Scaling Factor
siRNA	small interfering RNA
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TNM	Tumor, Lymphknoten, Metastasen (Tumor, Nodes, Metastasis)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
V	Volt
VNPI	Van Nuys Prognostic Index
vs.	gegen (versus)
WAP	Milcheiweißprotein (Whey Acidic Protein)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation)

# 1. Einleitung

## 1.1 Das invasive Mammakarzinom

Das invasive Mammakarzinom ist ein infiltrativ wachsender, maligner epithelialer Tumor, der aus dem Brustdrüsenparenchym entsteht und häufig metastasiert. Das Mammakarzinom ist eine heterogene Erkrankung mit einem breiten Spektrum pathologischer Entitäten mit definierten klinischen Eigenschaften (Simpson et al. 2005). Histologisch kann das Mammakarzinom je nach Ursprungslokalität in das Milchgangskarzinom (duktales Karzinom) bzw. das Lappchenkarzinom (lobuläres Karzinom) eingeteilt werden. Es werden invasive und nicht-invasive Wachstumsformen unterschieden. Die häufigste histologische Tumorentität ist das invasiv duktales Karzinom (IDC), mit einem Anteil von circa 70-80 % (Reiner 2000), gefolgt von dem invasiv lobulärem Karzinom (ILC) mit circa 10-15 % (Mallon et al. 2000). Invasiv tubuläre, muzinöse, medulläre und papilläre Karzinome treten hingegen selten auf (je etwa 2 %). Die verschiedenen Tumorentitäten unterscheiden sich in ihrer klinischen Präsentation, ihrer histologischen Charakteristik sowie in der Prognose.

### 1.1.1 Epidemiologie und Inzidenz

Nach Angaben der IARC (International Association on Research of Cancer) erkranken weltweit pro Jahr etwa 1,2 Millionen Frauen an Brustkrebs, 410.000 sterben daran (Ferlay et al. 2007). Brustkrebs ist damit die häufigste Krebserkrankung der Frau weltweit. In Deutschland erkranken schätzungsweise 50.000 Frauen pro Jahr an Brustkrebs. Damit ist das Mammakarzinom innerhalb Deutschlands die am häufigsten auftretende Krebserkrankung der Frau (Abb. 1). Die Inzidenz des Mammakarzinoms nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Das Risiko einer Frau, in ihrem Leben an Brustkrebs zu erkranken, beträgt etwa 10-12 % (Benson et al. 2009; Funke and Villena 2008; Parkin et al. 2005). Auch im Bezug auf die Mortalität ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache. So starben im Jahr 2002 etwa 17.500 Frauen an Brustkrebs (Parkin et al. 2005). Dies entspricht 4 % aller Todesfälle bei Frauen und 17 % der durch Krebs verursachten Todesfälle der weiblichen Bevölkerung. Bei Frauen im Alter zwischen 35 und 55 Jahren ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache. Die 5-Jahres-Überlebensrate des Mammakarzinoms liegt über alle Tumorstadien gemittelt bei 76 % (Funke and Villena 2008). Während Inzidenz und Mortalität lange Zeit

stetig parallel anstiegen, ist in den letzten 15 Jahren die Mortalität in den meisten Industrieländern stabil geblieben bzw. zurückgegangen (Decker et al. 2009). Dies ist unter anderem auf die Einführung der Mammographie Screenings sowie auf verbesserte Behandlungsmöglichkeiten zurückzuführen (Benson et al. 2009; Ferlay et al. 2007). Zugleich kam es durch das Mammographie Screening zu einer wachsenden Inzidenz des Mammakarzinoms.

Die Mehrzahl der Brustkrebskrankungen treten sporadisch auf, es bestehen aber sowohl erbliche als auch externe Risikofaktoren. Dabei sind nur etwa 5 % der Brustkrebskrankungen erblich bedingt. Brustkrebs kommt hauptsächlich bei Frauen vor, nur etwa 1 % der Brustkrebskrankungen betreffen Männer (Cutuli et al. 2009). Zusammenfassend kann man sagen, dass das Alter und das weibliche Geschlecht die Hauptrisikofaktoren für das Mammakarzinom sind (Benson et al. 2009).

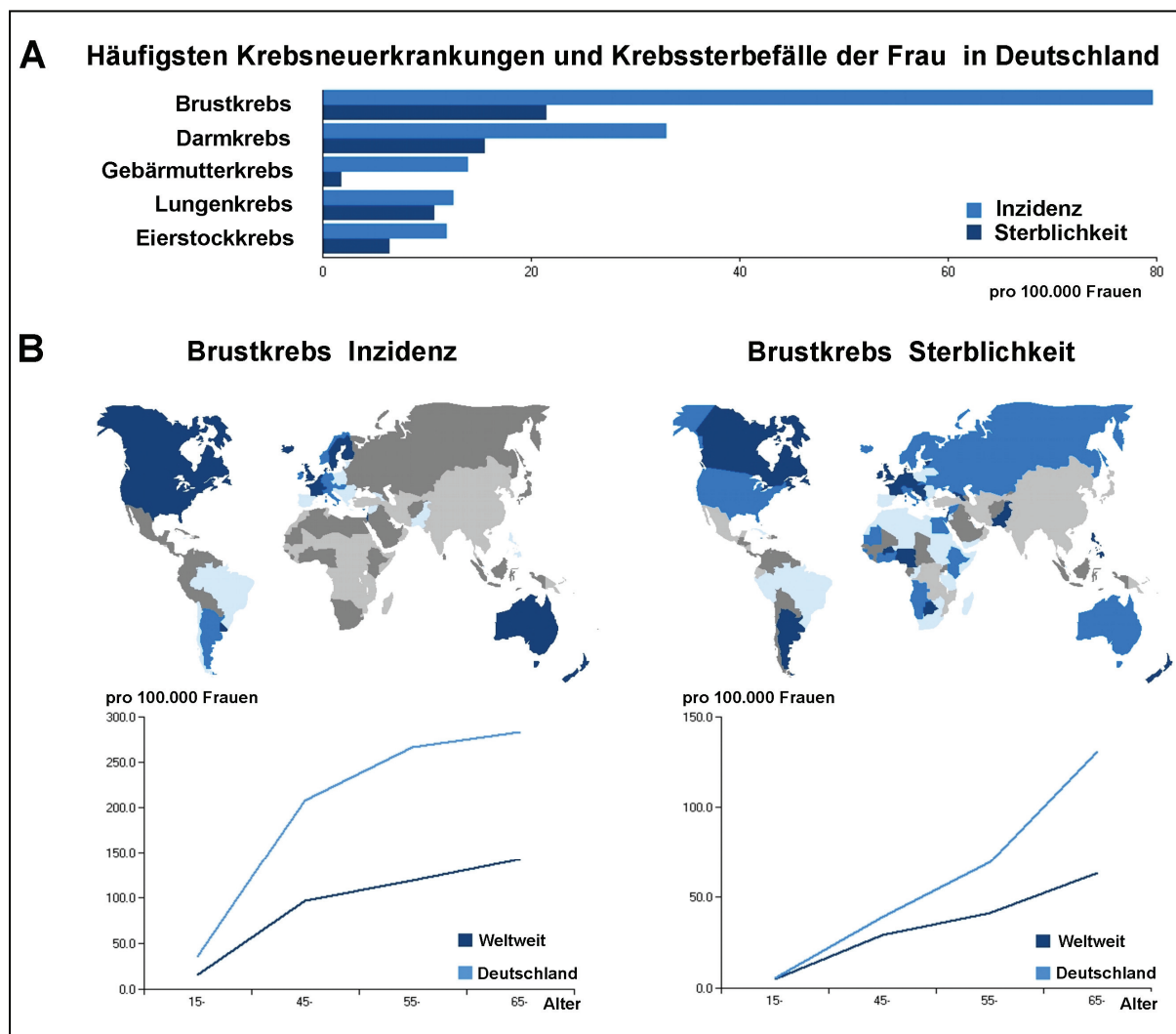


Abb. 1: A: Häufigste Krebsneuerkrankungen und Krebssterbefälle in Deutschland im Jahr 2002 (GLOBOCAN), B: Brustkrebs Inzidenz und Sterblichkeit weltweit und im Vergleich Deutschland/Weltweit im Jahr 2002 (GLOBOCAN)

## 1. 1. 2. Klassifizierung des Mammakarzinoms

In Anbetracht der Komplexität der Erkrankung entwickelten die Pathologen Klassifizierungssysteme zur Erfassung der verschiedenen Formen des Mammakarzinoms. Die derzeitigen Klassifizierungen sind überwiegend deskriptiv definierte morphologische Entitäten, deren prognostische Relevanz durch retrospektive Analysen belegt sind (Geyer et al. 2009). Die Bestimmung von möglichen Prognosefaktoren hat das Ziel, den Krankheitsverlauf prospektiv vorherzusagen und ist zudem für die Wahl der Therapieform wichtig. Die wichtigsten Klassifizierungssysteme des Mammakarzinoms sind das Grading, die TNM-Klassifizierung sowie das Staging. Auf diese drei wird im Folgenden näher eingegangen.

### 1. 1. 2. 1. Grading

Unter Tumorgrading versteht man den Grad der histologischen Entdifferenzierung der Tumorzellen. Das Tumorgrading geht auf Bloom und Richardson (Bloom and Richardson 1957) zurück und wird heute von der WHO in einer modifizierten Form empfohlen. Nach histologischen und zytologischen Kriterien ist eine Einteilung in niedrig maligne, mittelgradig maligne und hoch maligne Tumore möglich. Das heute gebräuchliche Gradingssystem umfasst eben diese drei Malignitätsgrade. So werden die Tumore in Grad 1, 2 oder 3 eingeteilt, dies geschieht unter Berücksichtigung der Drüsenbildung, der Kernatypien sowie der Anzahl der Mitosen (G1 = gut differenziert, G2 = mäßig differenziert, G3 = gering differenziert). Höhere Malignitätsgrade sind mit einer höheren Rezidivrate, einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit und somit mit einer schlechteren Überlebensrate verbunden.

### 1. 1. 2. 2. Die TNM-Klassifizierung

Die TNM-Klassifizierung von Tumoren ist ein weltweit anerkanntes und verwendetes System zur Beschreibung und Einteilung des Stadiums von Krebserkrankungen. Sie wurde von der Union internationale contre le cancer (UICC) eingeführt (Sobin 2001). Die TNM-Klassifizierung beschreibt die Größe des Tumors (T), die Anzahl der befallenen Lymphknoten (N) und eine eventuelle Fernmetastasierung (M). Die Ausdehnung des Primärtumors (T), wird je nach Größe mit den Zahlen null bis vier beschrieben. N und M beschreiben jeweils das Fehlen (N0/M0) oder das Vorhandensein (N1-N3/M1) von Lymphknotenmetastasen bzw. Fernmetastasen. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Einstufungs-

kriterien entsprechend der TNM-Klassifizierung für Brustkrebs (Sobin and Fleming 1997). Ist der TNM-Klassifizierung ein p vorangesetzt (pTNM), so steht dieses für histologisch gesicherte Daten.

**Tab. 1: TNM-Klassifizierung des Mammakarzinoms**

<b>T Tumorgröße</b>		<b>N Lymphknoten</b>		<b>M Metastasen</b>	
T0	kein Tumor nachweisbar	N0	keine	M0	keine Metastase nachweisbar
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	N1	1-3	M1	Metastase nachweisbar
T1	bis 2 cm	N2	4-9		
T2	> 2 cm < 5 cm	N3	> 9		
T3	> 5 cm				
T4	jede Größe mit Ausdehnung auf die Brustwand oder Haut				

### 1. 1. 2. 3. Staging

Die Stadieneinteilung (Staging) nach UICC ist für die Festlegung der adäquaten Therapie eines Mammakarzinoms von großer Bedeutung und gilt als der wichtigste prognostische Faktor (Funke and Villena 2008). Beim Staging werden die Patientinnen in Gruppen mit den Stadien 0 bis IV entsprechend dem Ausmaß ihrer Erkrankung eingeteilt. Die Einteilung in Stadien erleichtert wie eingangs erwähnt, die Festlegung einer individuellen Therapie. Zusätzlich ermöglicht das Staging eine verbesserte Prognose-Abschätzung sowie eine optimale Vergleichbarkeit verschiedener Therapieansätze. Die pathologische Stadieneinteilung setzt sich aus den Daten des klinischen Stagings sowie der histopathologischen Untersuchung des Primärtumors und der Lymphknoten zusammen. Das derzeit gebräuchlichste System zur Stadieneinteilung ist das der UICC, welches auf der TNM-Klassifizierung aufbaut (Tab. 2).

**Tab. 2: Stadieneinteilung nach UICC, aufbauend auf der TNM-Klassifizierung**

	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIA	T0, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	jedes T	N3	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

### 1. 1. 3. Diagnostik des Mammakarzinoms

Für die Detektion des Mammakarzinoms stehen zahlreiche diagnostische Verfahren zur Verfügung. So folgen der klinischen Untersuchung eine Reihe bildgebender Verfahren wie die Röntgenmammographie, die Mammasonographie und die MRT-Untersuchung. Besteht grundlegender Verdacht auf eine maligne Erkrankung, wird eine Biopsie vorgenommen. Im Folgenden wird auf die Mammographie näher eingegangen.

#### 1. 1. 3. 1. Mammographie

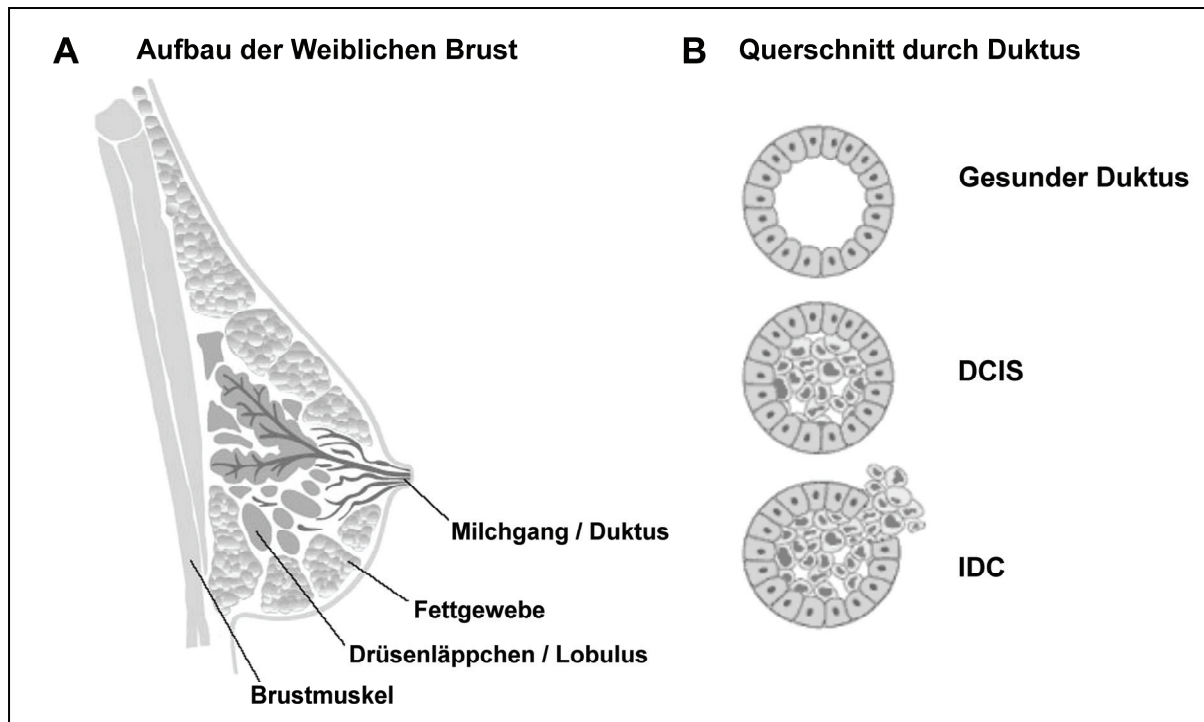
Die Mammographie ist die Röntgenuntersuchung der Brustdrüse mit einer speziellen Weichstrahltechnik. Sie stellt aktuell die bedeutendste, bildgebende Methode in der Mammadiagnostik dar, da sie bisher die einzige Bildgebung ist, die sich für ein Screening der Brustdrüse eignet. Durch das Mammographie Screening wird eine zeitliche Vorverlegung der Diagnostik in den präklinischen Bereich angestrebt. Dies soll langfristig zu einer Senkung der Brustkrebssterblichkeit beitragen. Es gibt eine Reihe großer prospektiver randomisierter Studien zur Evaluierung der Mammographie Screenings. Obwohl sich die durchgeführten Studien hinsichtlich ihres Designs unterschieden, konnte übereinstimmend nachgewiesen werden, dass mit Hilfe der Screening-Mammographie eine altersabhängige relative Reduktion der brustkrebsspezifischen Mortalität um 20-40 % möglich ist. Eine Metaanalyse der Daten von sieben Studien belegte eine Verringerung der brustkrebsspezifischen Sterblichkeit von 24 % (Smith et al. 2003; Wruk 2008).

## 1. 2. Das duktale *In-situ*-Karzinom (DCIS)

Bei der histopathologischen Klassifizierung des Mammakarzinoms werden nicht-invasive und invasive Tumorformen unterschieden, die im Wesentlichen als duktale oder lobuläre, seltener als andere histologische Entitäten auftreten. Die nicht-invasiven Mammakarzinome sind definiert als Karzinome innerhalb der Brustdrüsengänge (duktales *In-situ*-Karzinom, DCIS) oder der Brustdrüsenläppchen (lobuläres *In-situ*-Karzinom, LCIS) ohne Invasion des umliegenden Stromas. Eine schematische Darstellung des Brustaufbaus mit Lokalisation von Lobuli und Dukti ist in Abbildung 2 zu sehen. Im Folgenden soll weiter auf das duktale *In-situ*-Karzinom (DCIS) eingegangen werden.

Das DCIS ist charakterisiert durch eine neoplastische Zellproliferation von malignen epithelialen Zellen, die vom gefäßführendem Fett- und Bindegewebe durch eine intakte Basalmembran abgegrenzt sind (Abb. 2). Das DCIS entsteht, wie schon erwähnt, in den großen Milchgängen der Brustdrüse. Das DCIS ist sozusagen eine „Vorstufe“ des invasiven Mammakarzinoms.

Wird ein DCIS diagnostiziert, handelt es sich ausschließlich um eine lokale Läsion, welche mit adäquater lokaler Therapie geheilt werden kann. Da das DCIS definitionsgemäß nicht in das umliegende Gewebe infiltriert, kann auf eine Chemotherapie verzichtet werden. Hat sich ein invasives Karzinom gebildet, steigt die Wahrscheinlichkeit für Metastasen in anderen Organen. Werden Metastasen diagnostiziert, handelt es sich um eine systemische Erkrankung, die eine wesentlich intensivere, systemische Therapie (Chemotherapie) erfordert und eine weitaus schlechtere Prognose hat.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Anatomie der Brust (A) sowie Darstellung eines normalen Milchganges, eines DCIS und eines IDC (B). Die epitheliale Komponente besteht aus den Lobuli und den Ausführungsgängen (Dukti). Diese epithelialen Bestandteile werden von Stroma, bestehend aus Binde- und Fettgewebe, umgeben.

### 1. 2. 1. Inzidenz und Detektion des DCIS

Derzeit stellt die Mammographie den Goldstandard für die Früherkennungsdiagnostik invasiver und nicht-invasiver Tumoren der Brust dar. Durch die steigenden Mammographie Screenings, welche in den 80iger Jahren begonnen haben, ist die Detektion von DCIS speziell bei den Frauen über 50 Jahren stark angestiegen (Kuerer et al. 2009). DCIS macht mittlerweile 20-45 % aller neu diagnostizierten Brustkrebsfälle und circa 10 % aller Brustkrebserkrankungen aus (Sakorafas et al. 2008; Valenzuela and Julian 2007). Vor Einführung der Mammographie Screenings lag der Anteil an DCIS bei nur 2-3 % der Brustkrebserkrankungen (Ernster et al. 1996). Unbehandelt entwickeln sich bis zu 50 % aller DCIS-Läsionen zu invasiven duktalem Karzinomen, wobei eine große Variabilität in der Zeit dieses Verlaufes liegt (Erbas et al. 2006; Wiechmann and Kuerer 2008). Demzufolge besteht ein besonderes Interesse an der sensitiven Erfassung der DCIS-Läsion vor dem Übergang in ein invasives Stadium. Die Notwendigkeit einer Früherkennung wird durch die Tatsache unterstützt, dass in bis zu 14 % aller DCIS-Fälle mikroinvasive Stadien vorliegen (Padmore et al. 2000; Silverstein et al. 1990).



Die meisten durch Mammographie entdeckten DCIS werden durch Mikroverkalkungen wahrgenommen (Wiechmann and Kuerer 2008), wobei ein großer Teil der DCIS-Läsionen diesen Mikrokalk nicht zeigt. Die Genauigkeit der Mammographie für das Auffinden von DCIS ist unzureichend. Das Hauptproblem ist hierbei die Unterschätzung der Ausdehnung der DCIS und die Unterschätzung der Anzahl der Tumorherde in Patienten mit multifokaler Erkrankung (Berg et al. 2004; Kuerer et al. 2009).

Vor kurzem veröffentlichten Kuhl et al. (Kuhl et al. 2007) eine große DCIS-Screeningstudie. Hierbei wurde sowohl eine mammographische, als auch eine MRT-Untersuchung der Brust durchgeführt. Insgesamt wurden 7000 Frauen in die Studie eingeschlossen, von denen bei 167 ein DCIS diagnostiziert wurde. Dabei wurden mit Hilfe der MRT Untersuchung 92 % der DCIS Fälle entdeckt, wohingegen mit der Mammographie nur 56 % der DCIS Fälle zu diagnostizieren waren. Bezogen auf besonders gefährdete Patientinnen mit high-grade DCIS wurden mit Hilfe der MRT Untersuchung 98 % und mit Hilfe der Mammographie nur 52 % der DCIS Erkrankungen entdeckt. Nachteile der MRT Untersuchung sind die sehr hohen Kosten und der Mangel an qualifiziertem Personal für die Auswertung der MRT Bilder. Daher wird die MRT Untersuchung in der näheren Zukunft wohl nicht die Mammographie ersetzen.

Eine weiter verbesserte Detektionsmöglichkeit für DCIS wäre die PEM (Positronen-Emissions-Tomographie). PEM ist unabhängig von dem Vorhandensein von Mikrokalzifikationen und wäre daher ein großer Fortschritt für die Detektion von DCIS (Berman 2007). Mehrere Studien deuten an, dass PEM für die Unterstützung des konventionellen Brust-Screenings ein nützliches Hilfsmittel darstellen würde. Momentan werden allerdings einige low-grade Tumore mit PEM nicht identifiziert. Daher muss diese Methode eine weitere Entwicklung und Optimierung erfahren.

Eine früher Nachweis von DCIS-Läsionen ist von enormer Bedeutung, da die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt noch gut heilbar ist, so liegt das 10-jährige krebsfreie Überleben von behandelten DCIS Patientinnen über 97 % (Sakorafas et al. 2008). Eine frühe Entdeckung und somit eine frühe Behandlung von DCIS ist der beste Weg um die Mortalität von Brustkrebs zu reduzieren (Suzuki et al. 2006).

### 1. 2. 2. Klassifizierung des DCIS

Bisher basierte die Klassifizierung des DCIS auf seinen architektonischen Merkmalen. Es werden fünf Hauptformen nach ihrer Architektur unterschieden: der Komedotyp, der kribriforme Typ, der papilläre Typ, der solide Typ sowie der mikropapilläre Typ. Der Komedotyp zeigt ein mehrschichtiges, neoplastisches Epithel, welches eine zentrale Nekrosezone umgibt. Der kribriforme Typ zeigt ein siebartiges Proliferationsmuster mit gleichmäßig verteilten kreisrunden Sekundärlumina. Der papilläre Typ wird durch Epithelproliferate an einem fibrovaskulärem Gerüst klassifiziert. Mit atypischem Epithel ausgefüllte Gangstrukturen weisen auf den soliden Typ hin. Der mikropapilläre Typ ist durch pseudopapilläre Zellproliferate ohne fibrovaskuläres Gerüst auszumachen. Diese Einteilung ist mit verschiedenen Nachteilen behaftet. Die strukturellen Muster sind nur unzureichend definiert und überlappen teilweise. In der Mehrzahl der Fälle treten verschiedene Typen nebeneinander auf, so dass häufig Mischformen vorliegen (Lebeau 2006). Zusätzlich werden diese Termini einer biologisch relevanten Klassifizierung nicht gerecht, da diese Einteilung keinen prädiktiven Charakter hinsichtlich der Rezidivrate oder der Entstehung eines invasiven Karzinoms hat. Neuere Studien haben gezeigt, dass Klassifizierungen, die das nukleäre Grading der intraduktalen Proliferation berücksichtigen, aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich des Lokalrezidivrisikos geben (Reiner 2000). Hervorzuheben sind dabei die Holland Klassifizierung (Holland et al. 1994) und der Van Nuys Prognostic Index (VNPI) (Silverstein et al. 1996).

Die Einstufung des Malignitätsgrades von DCIS-Läsionen aufgrund histologischer und zytologischer Kriterien nach Holland et al. (Holland et al. 1994) unterscheidet gut differenzierte, intermediär differenzierte und schlecht differenzierte DCIS. Gut differenzierte DCIS zeigen in Form und Größe gut differenzierte Zellen und Zellkerne mit wenigen Atypien und mit wenigen Mitosen. Bei intermediär differenzierten DCIS zeigen vorhandene Pleomorphismen der Zellkerne, welche aber noch nicht in dem Maße ausgeprägt sind, wie bei einem schlecht differenzierten DCIS. Schlecht differenzierte DCIS zeigen viele Atypien, eine sehr hohe Mitoseaktivität und teilweise sehr ausgeprägte Nekrosen.

Auch die Van-Nuys- Klassifizierung basiert auf dem Kerngrading und bezieht zusätzlich das Vorkommen von Komedotyp-Nekrosen ein (Silverstein et al. 1995b). Komedotyp-Nekrosen sind verkalkte Nekrosen innerhalb des Milchganges. Man unterscheidet drei Gruppen, von denen jede eine unterschiedliche Rezidivwahrscheinlichkeit hat. Die low-grade DCIS haben einen niedrigen Kerngrad und keine Nekrosen, die intermediate-grade DCIS haben ebenfalls

einen niedrigen Kerngrad, weisen aber Nekrosen auf. Die high-grade DCIS sind definiert durch einen hohen Kerngrad (Silverstein et al. 1995b). Der Van Nuys Prognostic Index, wurde aus der Van Nuys- Klassifizierung abgeleitet (Silverstein et al. 1996). Er wird aus drei messbaren prognostischen Faktoren berechnet: der Größe des DCIS, der Breite des Sicherheitssaums und dem Malignitätsgrad.

Diese drei Faktoren sind in den Van Nuys Prognostic Index (Tab. 3) zusammen gefasst. Für jeden Parameter werden Punkte von eins bis drei vergeben, die als Summe (Gesamtpunktzahl = VNPI-Score drei bis neun) eine Richtlinie für die weitere Therapie geben. Bei drei oder vier Punkten genügt die alleinige Resektion, während fünf bis sieben Punkte eine zusätzliche Bestrahlung erfordern; acht und neun Punkte indizieren die Mastektomie (Winzer 2005). Als vierter Parameter wird manchmal auch das Alter in diesen Index miteinbezogen (USC/VNPI). Dabei erhalten Patientinnen über 60 Jahren einen Punkt, Patientinnen zwischen 40 und 60 Jahren zwei Punkte und Patientinnen, die jünger als 40 Jahre sind, drei Punkte.

**Tab. 3: Van Nuys Prognostic Index (VNPI)**

Ausdehnung (mm)	Punkte	Tumorfreier Resektionsrand (mm)	Punkte	Malignitätsgrad	Punkte
≤ 15	1	≥ 10	1	low-grade (non high grad, ohne Nekrose)	1
16-40	2	1-9	2	intermediate-grade (non high grade, mit Nekrose)	2
> 40	3	< 1	3	high-grade (high grade, mit Nekrose)	3

Entsprechend dem Mammakarzinom werden auch beim DCIS molekulare Tumormarker untersucht, insbesondere Wachstumsfaktoren und Hormonrezeptoren. Für den Östrogenrezeptor konnte in 50-75 % der DCIS-Fälle eine Expression nachgewiesen werden (Chaudhuri et al. 1993). Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Expression des Östrogenrezeptors bei gut differenzierten DCIS-Läsionen höher ist als bei schlecht differenzierten (Barnes and Masood 1990). Die Expression von Progesteronrezeptoren scheint ähnlich wie die der Östrogenrezeptoren zu sein. Der positive Östrogenrezeptorstatus ist auch in DCIS ein wichtiger prädiktiver Marker für die Entscheidung zu einer adjuvanten Hormontherapie. Seit kurzem ist der Östrogenrezeptor als erster molekularer Marker beim DCIS, mit nachgewiesener Relevanz für die klinische Therapieentscheidung, zugelassen.

Es gibt eine große Anzahl von Untersuchungen, die sich mit der Expression weiterer Biomarker im DCIS beschäftigt haben. Die am häufigsten analysierten sind die Genprodukte

des Onkogens *ERBB2* (*HER-2*) und des Tumorsuppressorgens *p53* (Tsikitis and Chung 2006). Hinzu kommen Analysen von Proliferationsmarkern, des DNA-Gehalts, zellzyklus-regulierende Proteine, Wachstumsfaktoren und tumorassoziierte Proteasen (Lebeau 2006). Allerdings konnte bisher für keinen dieser Marker eine signifikante Korrelation zwischen Expression und klinischem Verlauf nachgewiesen werden (Lebeau 2006). Ebenso wenig ist es bisher gelungen, einen Marker zu identifizieren, der den Schritt vom DCIS zum invasiven Karzinom charakterisiert.

Für das Tumorsuppressorgen *p53* konnte gezeigt werden, dass Mutationen in dem Gen signifikant mit dem Tumorgrad, dem Vorhandensein von Nekrosen und dem mitotischen Index korrelieren. Mutationen des *p53* Gens werden in etwa 25 % aller DCIS nachgewiesen (Rudas et al. 1997). *HER-2* ist in circa 30 % der DCIS amplifiziert, dies jedoch überwiegend in high-grade Läsionen (Leal et al. 1995). Der Proliferationsmarker Ki-67 ist ein hilfreicher Marker, um zwischen schnell und langsamer proliferierenden Tumoren zu unterscheiden. Zusätzlich korreliert die Expression von Ki-67 mit dem Tumorgrad (Nofech-Mozes et al. 2005). Obwohl der Proliferationsmarker Ki-67 in der pathologischen Untersuchung häufig mitbestimmt wird, konnte er als prognostischer Faktor bisher nicht validiert werden.

### **1. 2. 3. Therapieoptionen beim DCIS**

Hinsichtlich des Managements von DCIS gibt es immer noch unterschiedliche Auffassungen. Mit zunehmendem Wissensstand über das DCIS ist die Therapieentscheidung zudem komplexer geworden. Das primäre Ziel ist die vollständige operative Entfernung des DCIS. Hier hat sich in den letzten Jahren die brusterhaltende Operation, als Alternative zur Mastektomie (Brustamputation), etabliert. Eine Mastektomie wird gegenwärtig nur bei großen, diffus wachsenden Läsionen oder Multizentrität durchgeführt. Bei großen DCIS-Läsionen mit hohem Anteil an Komedonekrosen wird außerdem eine sorgfältige klinische Untersuchung auf eine mögliche Lymphknotenbeteiligung indiziert.

Das Risiko für DCIS-Patientinnen liegt weniger in der Metastasierung, sondern primär darin, ein Lokalrezidiv zu entwickeln. Lokalrezidive nach DCIS-Therapie sind zu 50 % invasiv und somit lebensgefährdend. Lokalrezidive nach einer brusterhaltenden Operation treten bei high-grade-Formen zahlreicher und innerhalb kürzerer Intervalle auf, als bei besser differenzierten Formen. Die Lokalrezidivrate nach brusterhaltender Operation eines DCIS kann durch eine nachfolgende Bestrahlung gesenkt werden. Nach 10 Jahren Nachbeobachtung zeigte sich in der EORTC-Studie eine Minimierung der Lokalrezidivrate nach Bestrahlung von 47 %

(Bijker et al. 2006). Die Mastektomie ist mit dem geringsten Lokalrezidivrisiko von 2 % verbunden (Silverstein et al. 1995a), stellt jedoch für eine Vielzahl kleiner DCIS eine Übertherapie dar. Häufig wird, wie bereits erwähnt, nach brusterhaltender Operation auch der VNPI zur Therapieentscheidung herangezogen (Winzer 2005).

Die Deutsche Krebsgesellschaft empfiehlt generell, eine Bestrahlung nach brusterhaltender Therapie beim DCIS durchzuführen (Deutsche Krebsgesellschaft 2008). Bei Tumoren kleiner 2 cm, einem low-grade DCIS und einem tumorfreien Resektionsrand von mehr als 10 mm, kann hingegen auf eine adjuvante Bestrahlung verzichtet werden.

#### 1. 2. 4. Tumorprogressionsmodelle

Lange Zeit wurde die Entstehung des Mammakarzinoms als ein linearer Prozess verstanden (O'Connell et al. 1994). Dieses Modell geht von einer schrittweisen Progression aus, wobei aus normalem Brustepithel die atypische Hyperplasie entsteht, welche als Vorläufer der *In-situ*-Stufen erachtet wird. Aus dem DCIS entsteht letztendlich das invasive Mammakarzinom (Bsp.: Gesund → ADH → DCIS → IDC). Dieses Modell basierte im Wesentlichen auf pathologisch-epidemiologischen Daten. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die lineare Progression ein zu einfaches Modell darstellt und dass die Beziehungen zwischen den Progressionsstufen weit komplexer sind als bisher angenommen.

Zurzeit existieren zahlreiche Progressionsmodelle, die serielle, schrittweise, stufenweise und spontane Veränderungen beinhalten. Trotzdem bleibt die genaue Progression und Bedeutung der einzelnen Faktoren weiter unklar. Deshalb stellt die Analyse molekularer Mechanismen eine wichtige Voraussetzung dar, um die Tumorprogression zu verstehen und eine exakte Behandlung verschiedener DCIS Subtypen zu etablieren.

Das DCIS teilt in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad, zahlreiche genetische Veränderungen mit dem invasiven Karzinom, was darauf hinweist, dass es sich um eine Vorläuferläsion handelt (Lebeau 2006). Diese Ähnlichkeit zwischen dem DCIS und dem IDC wurde beispielsweise mittels komparativer genomischer Hybridisierung (CGH) oder durch Analyse der Mikrosatelliteninstabilität festgestellt (Stratton et al. 1995). So wurden eine Reihe genetischer Veränderungen, sowohl im IDC, als auch im DCIS nachgewiesen (Lakhani 1999). In verschiedenen zytogenetischen Analysen konnte auch gezeigt werden, dass schon frühe Läsionen, wie die ADH, molekulare Veränderungen der Zelle zeigen, die später auch in fortgeschrittenen nicht-invasiven und invasiven Karzinomen zu finden sind (Bocker et al. 2009; Ellsworth et al. 2005). Dies stärkt die Hypothese, dass die Fähigkeit zur Invasion schon

früh während der Tumorgenese festgelegt wird und das Gene, die das invasive Wachstum unterstützen, bereits im präinvasiven Stadium aktiv sind. Um die Entstehung des Mammakarzinoms besser zu verstehen, wurden eine Reihe zytogenetischer Untersuchungen durchgeführt (Buerger et al. 1999b; Buerger et al. 1999a). Fasst man deren Resultate zusammen, kommt man zu dem Schluss, dass es hauptsächlich zwei große Gruppen von DCIS gibt, welche sich durch den Gewinn oder den Verlust von chromosomalem Material an spezifischen Lozi definieren lassen (Buerger et al. 2000; Buerger et al. 2001; Moulis and Sgroi 2008). Die Gruppe besser differenzierter Mammakarzinome (niedriger Kerngrad) zeichnen sich vorwiegend durch den Verlust von Anteilen des Chromosomenarms 16q und Zunahme von Anteilen des Chromosomenarms 1q aus. Sie sind überwiegend Östrogenrezeptorpositiv. Die schlechter differenzierten Karzinome hingegen, zeigen eine Vielzahl von Veränderungen, wobei die Zunahme von genetischem Material auf dem Chromosomenarm 11q13 allen gemein ist. Die high-grade DCIS und hochgradige IDC weisen zusätzlich noch eine Zunahme genetischen Materials auf dem Chromosomenabschnitt 17q12 auf und sind überwiegend Östrogenrezeptornegativ (Moulis and Sgroi 2008).

Genexpressionsanalysen mit Vergleichen von DCIS und IDC haben keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen ergeben (Ma et al. 2003; Porter et al. 2003). Vielmehr wurden auch hier für die unterschiedlichen histologischen Differenzierungsgrade charakteristische Expressionsmuster identifiziert (Ma et al. 2003). Dies widerlegt erneut das lineare Progressionsmodell. Vielmehr entwickelt sich das hoch differenzierte IDC aus dem low-grade DCIS und das gering differenzierte IDC aus dem high-grade DCIS.

In Anerkennung dieser Erkenntnisse ist in Abbildung 3 ein Tumorprogressionsmodell dargestellt, welches sowohl die genetischen Veränderungen, als auch die durch Mikroarray-Technologie gewonnenen Hinweise mit einbezieht. In dem Modell werden die zwei schon erwähnten Gruppen streng voneinander getrennt. Innerhalb jeder Gruppe ist sowohl eine horizontale, als auch eine vertikale Progression möglich.

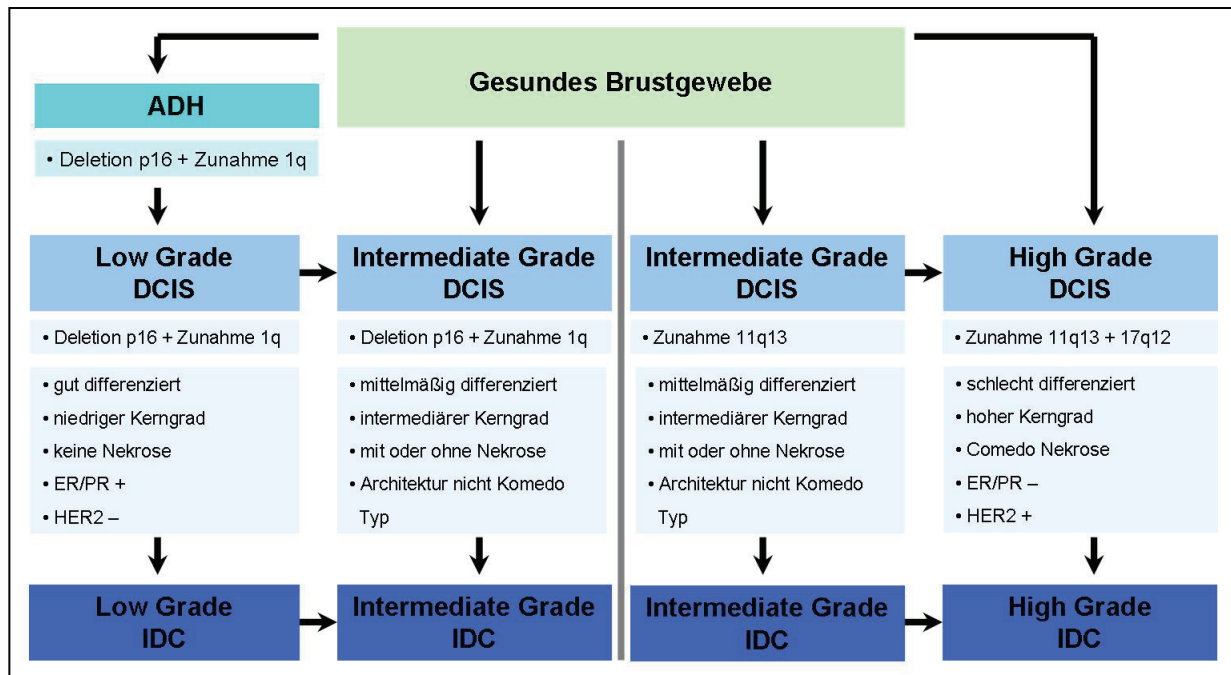


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Tumorprogressionsmodells für das duktales Mammakarzinom unter Einbeziehung genetischer Veränderungen sowie Ergebnissen verschiedener Genexpressionsanalysen. ER = Östrogenrezeptor, PR = Progesteronrezeptor. Angelehnt an Moulis und Sgou 2008 (Moulis and Sgou 2008).

### 1. 3. Mikroarray-Technologie

Die Mikroarraytechnik und somit der genomweite Expressionsvergleich bietet die Möglichkeit, die dynamische Relation zwischen mRNA Gehalt und biologischer Funktion besser zu verstehen (ma-Weiszhausz et al. 2006). Außerdem ist sie zu einem wichtigen Verfahren in der Klassifizierung und der prognostischen Einschätzung von Krankheiten geworden. Mithilfe von Mikroarrays lassen sich Genexpressionsmuster von mehreren tausend Genen gleichzeitig analysieren.

Mikroarrays bestehen aus einem Trägermaterial (z.B. Glas), auf dem biologische Sondenmoleküle wie beispielsweise DNA-Fragmente, in hoher Anzahl und Dichte fixiert sind. Sie beruhen auf dem Mechanismus der Hybridisierung komplementärer Nukleotidstränge. Bei den derzeit zur Verfügung stehenden Mikroarrays, lassen sich nach dem Herstellungsverfahren zwei Arten unterscheiden: cDNA-Mikroarrays und Oligonukleotid-Mikroarrays. Beide Verfahren liefern Daten über die relative mRNA-Expression, obwohl die dahinter stehende Technologie und damit die Basis für die Messung der Expressionswerte sehr unterschiedlich ist. cDNA Mikroarrays bestehen meist aus kurzen durch PCR hergestellten Amplikons, die auf eine Membran gespottet werden. In der Regel erfolgt die Hybridisierung mit zwei farblich unterschiedlich markierten RNA-Proben (rot + grün), oft aus

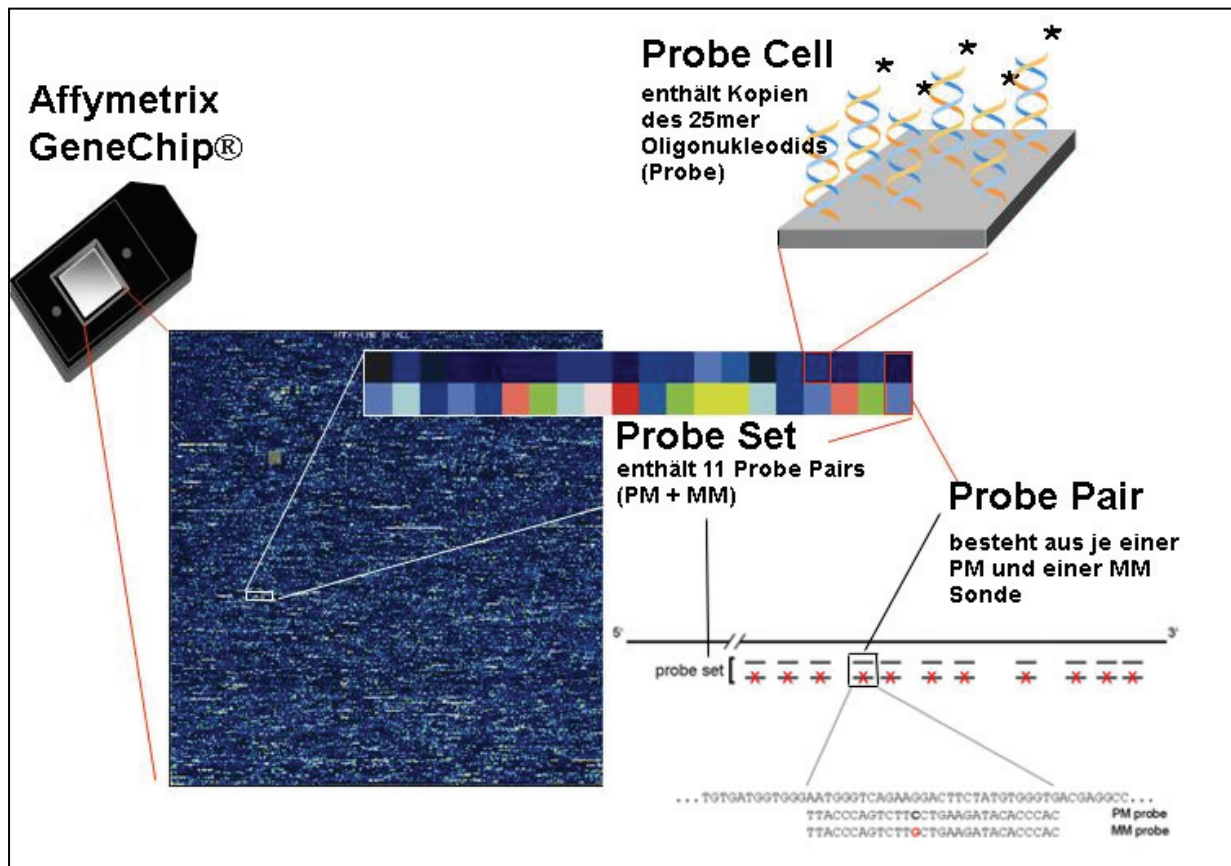
der zu untersuchenden Probe und einer Kontrolle, so dass sich die Werte für die relative Expression jedes Gens jeweils aus dem Verhältnis der Signale beider Proben ergibt (Grimm et al. 2004). Bei Oligonukleotid-Mikroarrays wie den Affymetrix GeneChip®'s (Lipshutz et al. 1999; Lockhart et al. 1996) werden die Proben *in situ* auf den Array synthetisiert. Das Signal jeder mRNA wird dabei durch Hybridisierung auf Cluster (Probe Set) von 11 Paaren von Oligonukleotiden ermittelt. Die Affymetrix GeneChip® Mikroarrays haben sich über die Jahre als eine sehr robuste und zuverlässige Plattform erwiesen und viele neue Erkenntnisse in der Forschung geliefert (Hardiman 2004; ma-Weiszhausz et al. 2006). Da für diese Arbeit ebenfalls Affymetrix GeneChips® verwendet wurden, soll auf diese nun näher eingegangen werden.

### 1. 3. 1. Die Affymetrix GeneChip® Plattform

High-density Oligonukleotid Arrays (auch GeneChip® oder Mikroarray genannt) unterscheiden sich, wie bereits erwähnt, in einigen Eigenschaften grundlegend von anderen Hybridisierungsarrays (Lipshutz et al. 1999; Lockhart et al. 1996). Im Gegensatz zu cDNA Arrays werden bei der Affymetrix GeneChip® Technologie, welche Anfang der 90er Jahre entwickelt wurde, die Sonden *in situ* auf dem Chip synthetisiert (Lipshutz et al. 1999). Die Herstellung von Affymetrix GeneChips® erfolgt mittels eines photolithografischen Prozesses, wie er auch in der Halbleitertechnik Verwendung findet. Dabei werden Glasträger mit einer lichtsensitiven Schicht überzogen. Durch Verwendung der Photolithographie ist eine gezielte, schrittweise Synthese der Oligonukleotide, Base für Base, an definierten Positionen auf dem Array möglich (Fodor et al. 1993; McGall et al. 1996). Durch die Zuhilfenahme von Lochmasken, wird an bestimmten Stellen durch Lichteinwirkung, die bindungsresistente Wirkung der Schicht aufgehoben. Auf den Glasträger wird anschließend eine Nukleotidlösung mit einem der vier bekannten Nukleotide (Adenin, Thymin, Cytosin oder Guanin) aufgebracht. Die Nukleotide sind so behandelt, dass sie an den bindungsfähigen Stellen binden, selbst jedoch erst durch erneute Lichteinwirkung bindungsfähig werden. Durch die Wiederholung aus Lochmaske, Licht und Nukleotidlösung, können alle erdenklichen Sequenzfolgen (Sonden), auf genau definierte Positionen auf einen Chip, aufgebracht werden. Sämtliche Sonden haben eine Länge von genau 25 Basen (Lipshutz et al. 1999) und liegen bei den für diese Arbeit verwendeten Mikroarrays, überwiegend am 3'-Ende eines jeden Gens (Affymetrix 2003; ma-Weiszhausz et al. 2006). Zusätzlich zu den Sonden für bestimmte Gene, befinden sich auf dem Mikroarray eine Reihe von Kontrollen. Dies ist notwendig, um den hohen Anforderungen an Sensitivität, Spezifität und Robustheit zu entsprechen. Um bei



den relativ kurzen Sonden trotzdem eine hohe Spezifität und Sensitivität gewährleisten zu können, wurde ein spezielles Mikroarraydesign gewählt. Jedes zu messende Gen wird durch ein Probe Set repräsentiert. Dieses Probe Set setzt sich aus 11 verschiedenen Sondenpaaren zusammen (Affymetrix 2003). Jedes Probe Pair unterteilt sich in zwei Probe Cells. Jede Probe Cell enthält etwa  $10^7$  identische Sonden (Schadt et al. 2000). Die eine Probe Cell, der sogenannte Perfekt Match (PM), besitzt Oligonukleotide, welche exakt komplementär zu dem zu messenden Gen sind, während bei den Oligonukleotiden in der anderen Probe Cell, dem Mismatch (MM), die mittlere der 25 Basen durch ihre komplementäre Base ausgetauscht ist (Hardiman 2004; Ma-Weiszhausz et al. 2006). Man geht davon aus, dass die Mismatch-Sonde nicht spezifisch für das zu messende Gen ist und somit als Kontrolle für eine unspezifische Hybridisierung dient (Lockhart et al. 1996). In Abbildung 4 ist der Aufbau eines GeneChips® der Firma Affymetrix zu sehen.

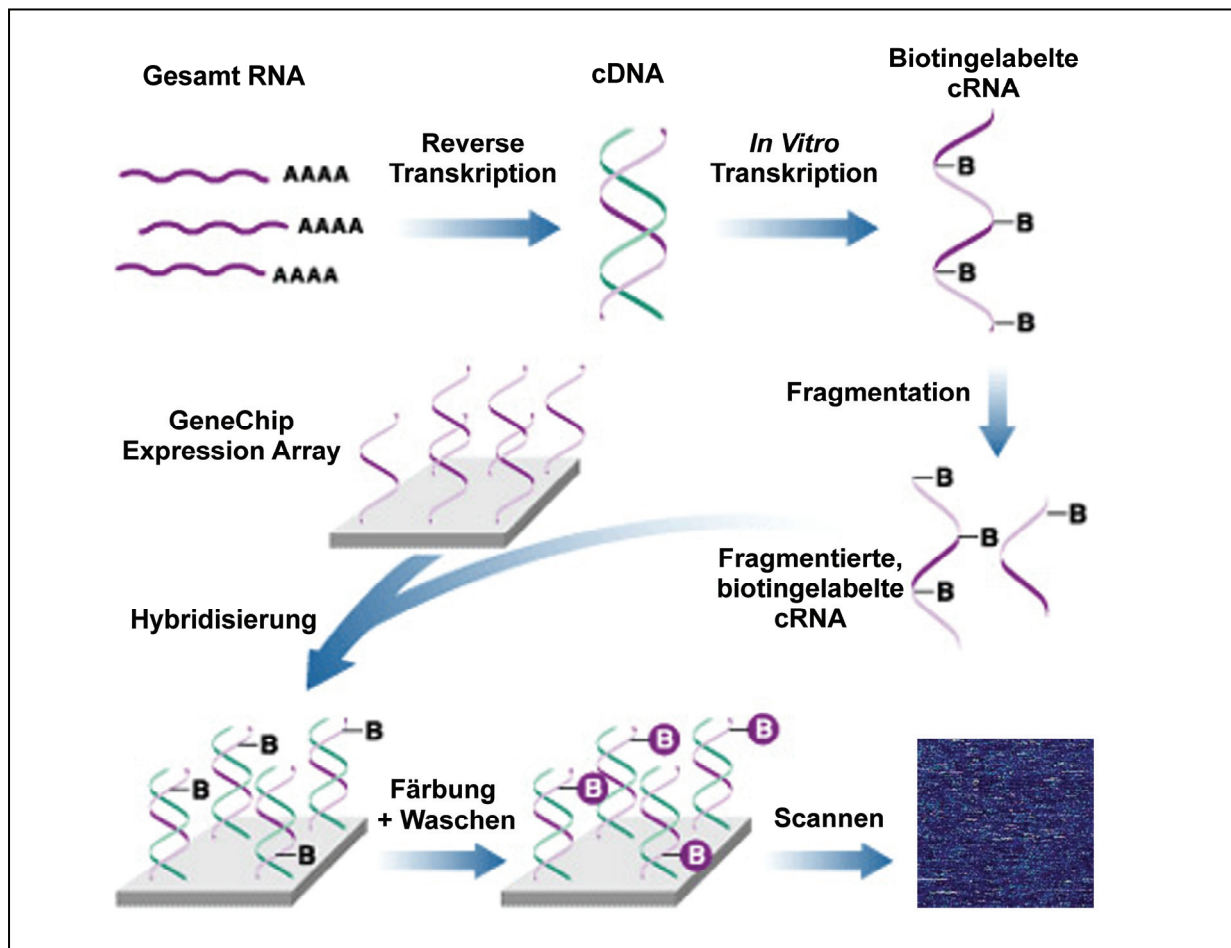


**Abb. 4:** Darstellung des Aufbaus eines Affymetrix GeneChip®. Für jedes Gen gibt es ein Probe Set, welches wiederum aus 11 Probe Pairs besteht. Ein Probe Pair besteht aus zwei Probe Cells. Die Perfect Match Probe Cell ist komplementär zu der zu untersuchenden Sequenz (PM; Perfect Match). Bei der zweiten Probe Cell wurde das mittlere Nukleotid ausgetauscht, so dass keine Bindung stattfindet (MM; Mismatch).

Abbildung 5 zeigt eine Zusammenfassung des Ablaufs eines Affymetrix GeneChip® Experiments. Hierzu muss zuerst die RNA aus den zu untersuchenden Geweben extrahiert

werden. Nach einer reversen Transkription der RNA unter Verwendung eines T7-Oligo(dT)-Primers, folgt eine *In-vitro*-Transkription in Gegenwart von Biotin markierten Nukleotiden. Die so markierten cRNA Moleküle werden fragmentiert und auf dem GeneChip® hybridisiert. Durch die Visualisierung mittels Streptavidin-gekoppelter Fluorochrome, kann so die relative Häufigkeit der Transkripte ermittelt und verglichen werden.

Beim der anschließenden Fluoreszenzmessung werden alle Probe Cells der GeneChips® gescannt und die Werte aller Pixel in sogenannten Dat-Files gespeichert. Mit Hilfe der Affymetrix GeneChip® Operating Software kann eine Visualisierung der Daten erfolgen. Die Werte der einzelnen Proben werden im sogenannten Cel-File gespeichert. Diese können anschließend für die weitere Analyse verwendet werden.



**Abb. 5:** Ablauf eines Affymetrix GeneChip® Experiments. Die GeneChips® werden mit cRNA hybridisiert, die zuvor während einer *In-vitro*-Transkriptionen amplifiziert und mit Biotin markiert wurde. An das Biotin wird anschließend ein Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex gebunden (Färbung), der in der Lage ist, nach Anregung durch Licht zu fluoreszieren. Diese Fluoreszenz wird mithilfe eines Scanners gemessen und die erhaltenen Daten können anschließend ausgewertet werden.

## **1. 4. Untersuchungsziel**

Ziel dieser Arbeit war es, die Vorgänge der DCIS Entstehung sowie deren Progression zu invasivem Brustkrebs zu untersuchen. Die bessere Charakterisierung von DCIS ist wichtig, da eine frühe Detektion dieser Läsion, für die Senkung der Brustkrebsmortalität von entscheidender Bedeutung ist. Mithilfe von Mikroarrays der Firma Affymetrix sollten Gene identifiziert werden, welche im DCIS sowie im invasiven Mammakarzinom eine stark erhöhte Expression zeigen. Nach primärer Untersuchung eines murinen DCIS Modells, sollten die identifizierten Gene anschließend in humanen Proben bestätigt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2. 1. Molekularbiologische Kits

Agilent RNA 6000 Nano & Pico Chip Kit	Agilent, Waldbronn
DAKO <sup>®</sup> Biotin Blocking System	Dako, Hamburg
GeneChip <sup>®</sup> One-Cycle Target Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip <sup>®</sup> Sample Cleanup Module	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip <sup>®</sup> Two-Cycle Target Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
MEGAscript <sup>®</sup> T7 Kit	Ambion, Darmstadt
RNA UltraSense <sup>™</sup> One-Step qRT-PCR System	Invitrogen, Karlsruhe
RNAesy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden
SuperScript II Reverse Transcriptase Enzyme KIT	Invitrogen, Karlsruhe
TransMessenger Transfection Reagent	Qiagen, Hilden

### 2. 2. Substanzen

10 mM dNTP MIX	Invitrogen, Karlsruhe
Accutase	PAA, Cölbe
Alkalischer Phosphatase	Vector Lab., Burlingame, USA
AllStars Negative Control siRNA	Qiagen, Hilden
Amphotericin B	PAA, Cölbe
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma Aldrich, Steinheim
Calcein AM (1mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC-Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
DMEM Low Glucose without L-Glutamine	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS (10x)	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Cölbe
EDTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Eisessig	Roth, Karlsruhe

Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	Roth, Karlsruhe
FCS Gold	PAA, Cölbe
Formaldehyd-Lösung 5,0 %	Fischar, Saarbrücken
Glycerol	Merck, Darmstadt
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Roth, Karlsruhe
HBSS (Hanks´ Balanced Salt Solution)	PAA, Cölbe
Levamisole	Vector Lab., Burlingame, USA
L-Glutamin (200mM)	PAA, Cölbe
Naphthol-As-Bi-Phosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumnitrit	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Oligo(dT)-Primer	Biotez, Berlin
Pertex <sup>®</sup>	Fa. Medite, Burgdorf
RNaseZap <sup>®</sup>	Ambion, Darmstadt
RPMI 1640 (1x) ohne L-Glut.	PAA, Cölbe
TaqMan Universal Mastermix	Applied Biosys., Carlsbad, USA
TBS (20x)	Appllichem, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (1x)	PAA, Cölbe
Tween <sup>®</sup> 20	Roth, Karlsruhe
Xylol	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### 2. 3. Puffer

Alkalischer Lysepuffer (DNA):	25 mM NaOH 0,2 mM EDTA ad 200 ml H <sub>2</sub> O
Neutralisationspuffer:	40 mM Tris-HCl ad 200 ml H <sub>2</sub> O

TAE 50x:	2 M Tris 57,1 ml Eisessig 0,05 M EDTA ad 1 l H <sub>2</sub> O
Loading Buffer, DNA (10x):	5 ml Glycerol 2 ml TAE 50x 0,25 % Bromphenolblau ad 10 ml H <sub>2</sub> O
Citratpuffer:	0,01 M Zitronensäure
Entwicklerlösung IHC:	Lösung A: 8 ml Entwicklungspuffer 2 ml Propandiol-Lösung 5 mg Levamisol
	Lösung B: 7,5 mg Naphthol-As-Bi-Phosphat 60 µl Dimethylformamid
	Lösung C: 50 µl 4%ige Natriumnitrit-Lösung 20 µl Neufuchsin-Lösung
Färbelösung Zellzyklus:	1 mg/ml RNase A 50 µg/ml Propidiumjodid 500 µl HBSS
FACS-Puffer:	1 g BSA 100 mg Natriumazid 100 ml HBSS

## 2. 4. Geräte, Apparaturen, sonstiges Material

2100 Bioanalyzer	Agilent, Böblingen
384 well Thermowell Gold PCR Plates	Corning Inc., Lowell, USA
ABI PRISM	Applied Biosys., Carlsbad, USA
BioCoat™ Matrigel™ Invasionskammern (8µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
CO2-Inkubator Here Cell 240	Heraeus, Hanau
Dismembrator	B. Braun Biotech Int., Melsungen
DNA Thermal Cycler PCR (PTC-200)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Eppendorf Pipetten Research	Eppendorf, Hamburg
FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Fluoreszenzmessgerät Spectra Fluor	Tecan, Crailsheim
IHC Kammer	Shandon Lipshaw, Frankfurt/M
Mikroskop BX51	Olympus, Hamburg
Mikroskopkamera Spot RT-KE	Visitron System, Puchheim
Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific, Dreieich
Pher-Stab. 500, Electrophoresis Powersupply	Biotec-Fischer, Reiskirchen
Qia-Shredder	Qiagen, Hilden
Schüttler KS250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Shandon Färbeautomat	Shandon, Dreieich-Buchsschlag
Speed Vac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank	BDK, Reutlingen
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Vortexer Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Zellkultur-Einsatz 8µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge CT15RE	VWR, Darmstadt
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Hanau

## 2. 5. Software

ABI SDS 2.2 Realtime-PCR Software	Applied Biosys., Carlsbad, USA
BD CellQuest Software	Becton Dickinson, Heidelberg
Corel PHOTO-PAINT® X3	Corel, Unterschleißheim
Genespring GX 10.0	Agilent, Waldbronn
Microarray Suite 5.0 (MAS5)	Affymetrix , Santa Clara, USA
GeneChip® Operating Software (GCOS)	Affymetrix , Santa Clara, USA
Reference Manager 11	Thomson Reuter, New York, USA
SPSS 16.0	SPSS, Chicago, USA
ONCOMINE	<a href="http://www.oncomine.org">www.oncomine.org</a>

## 2. 6. Versuchstiere

### 2. 6. 1. Das WAP-TNP8 Mausmodell

Das verwendete DCIS-Mausmodell bot die Möglichkeit, den natürlichen Krankheitsverlauf und die molekularbiologischen Veränderungen während der Entstehung von DCIS zu untersuchen. Die verwendeten Mäuse waren transgen. Das bedeutet, dass fremde DNA in den Zellkern von befruchteten Eizellen eingebracht wurde und diese dann in Leihmütter implantiert wurden. Durch das Einfügen der DNA in die Eizelle, wird diese in das Genom der Maus eingebaut. Bei dem verwendeten Mausstamm wurde DNA des SV40 Virus in die Tiere eingebracht. Das genutzte transgene Tiermodell wurde von Schulze-Garg et al. (Schulze-Garg et al. 2000) entwickelt. Für diese Arbeit wurde der Stamm WAP-TNP8 verwendet. Dabei handelt es sich um Balb/C Mäuse, die das SV40 T-Antigen unter der Kontrolle eines WAP-Promoters (WAP = whey acidic milk protein) in sich tragen (WAP-SV40T/t). Aufgrund des WAP-Promoters wird das Onkogen speziell in den Epithelzellen der Brustdrüsen exprimiert (Schulze-Garg et al. 2000; Tzeng et al. 1993). Die Expression des WAP-Proteins beginnt mit der Laktation (Tzeng et al. 1993). Der verwendete Mausstamm zeichnet sich durch ein langsames Fortschreiten der Malignität aus, so dass die Entwicklung eingehend untersucht werden kann. Außerdem weisen die Läsionen histologisch identische Strukturen auf, wie man sie auch im humanem Gewebe findet (Schulze-Garg et al. 2000).



### 2. 6. 1. 1 Simian Virus 40 (SV40)

Das Simian Virus 40 (SV40) ist eins der kleinsten bekannten Tumoviren mit hohem onkogenem Potential. Funktional kann das virale Genom des SV40 in zwei Teile unterteilt werden, eine frühe und eine späte Genomregion. Die frühe Genomregion codiert für zwei Proteine: das große (T) und das kleine (t) Antigen. Die späte Genomregion codiert für drei Capsidproteine (Tzeng et al. 1993). Das T-Antigen ist ein transkriptionsregulierendes Protein, welches sowohl als Repressor, als auch als Aktivator wirkt. Die onkogene Wirkung des SV40 T-Antigens beruht hauptsächlich auf der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie *p53* und mehreren Mitgliedern der Retinoblastom-Familie.

### 2. 6. 1. 2. Haltungsbedingungen

Insgesamt wurden die histologischen Daten von 69 weiblichen, adulten Mäusen des Stammes WAP-TNP8, mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 24-25 g ausgewertet. Die Tierhaltung im Tierhaus des Max-Delbrück-Centrums erfolgt nach Standardbedingungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS). Hierbei wurde eine Temperatur von  $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , eine Raumlufffeuchte von  $65\% \pm 15\%$  und ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 Stunden eingehalten. Die Fütterung erfolgt mit ssniff® M-Z Mausezuchtfutter (autoklavierbar). Die routinemäßige Gesundheitsüberwachung erfolgt nach FELASA-Richtlinien. Zur Überprüfung des Hygienestatus im Bestand, wurden in regelmäßigen Abständen Kot- und Blutproben entnommen. Regelmäßig erfolgten die Bestimmung des Körpergewichtes und die Beobachtung des Allgemeinzustandes.

### 2. 6. 1. 3. Genotypisierung von Mäusen

Für die durchgeführten Analysen wurden ausschließlich Mäuse verwendet, welche heterozygot für das SV40 T-Antigen waren. Dies wurde mittels Genotypisierung überprüft. Da das Konstrukt unter der Kontrolle eines WAP-Promoters stand, wurde das Onkogen ausschließlich in den Epithelzellen der Brustdrüsen exprimiert (Schulze-Garg et al. 2000).

Zur Detektion des SV40-Transgenes, wurde den Mäusen jeweils ein ca. 5 mm langes Stück Schwanzspitze mittels einer Schere entnommen. Zur Isolierung genomischer DNA aus der Schwanzbiopsie wurde diese in 75 µL alkalischen Lysepuffer für 30 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf 4 °C abgekühlt und durch Zugabe von 75 µl Neutralisationspuffer neutralisiert.

Die Genotypisierungen der Mäuse erfolgte mittels PCR. Hierzu wurde 1 µl der isolierten DNA eingesetzt. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl verwendet. Die verwendeten Primer (5'-TATGTCAGCAGAGCCTGTAGAACCAAAC-3' & 5'-GAGAAAGGTAGAAGACCCCAAG-3') ergaben ein PCR Produkt von 765 bp. Die Kontrolle des amplifizierten PCR Produktes erfolgte durch Gelelektrophorese in einem 1 % igem Agarosegel mit 0,003 % Ethidiumbromid bei 100 V. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte unter UV-Licht.

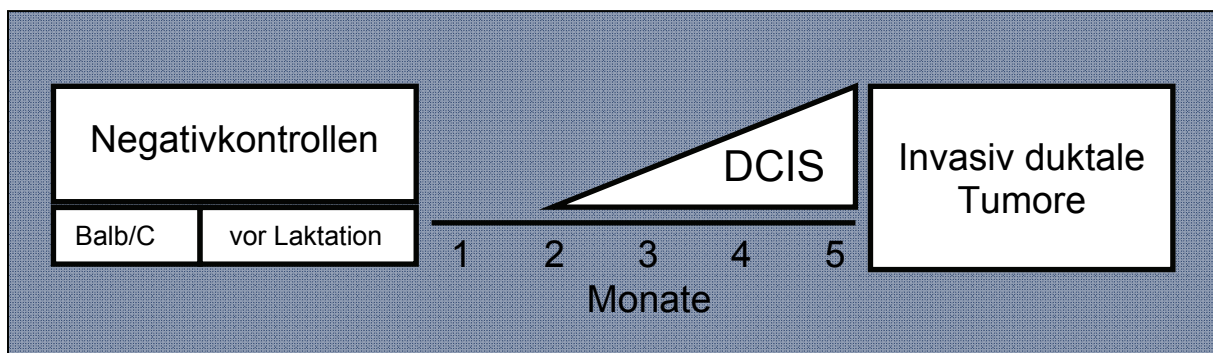
<u>PCR Ansatz:</u>	DNA	1,0 µl
	10x Puffer	2,5 µl
	dNTP's 2mM	2,5 µl
	Primer rev	1,0 µl
	Primer for	1,0 µl
	H <sub>2</sub> O	16,75 µl
	Taq Polymerase	0,25 µl
	-----	
		25 µl

<u>PCR Programm:</u>	95 °C 4:00	
	-----	
	94 °C 0:45	} x 35 Zyklen
	57 °C 0:30	
	72 °C 1:00	
	-----	
	72 °C 10:00	

#### 2. 6. 1. 4. Gruppierung der Mäuse und experimentelle Verwendung

Das Konzept meiner Doktorarbeit sah die Untersuchung des Zeitverlaufs der transgenen Mäuse von der Laktation bis zur Bildung von invasiven Karzinomen vor. Hierbei wurden Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten, ab dem Tag des Werfens untersucht (1 Monat, 2 Monate, 3 Monate, 4 Monate, 5 Monate). Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip den verschiedenen Gruppen (Zeitpunkten nach Laktation) zugeordnet. Diese Vorgehensweise war notwendig, um sicherzustellen, dass für alle Zeitpunkte ausreichend Versuchstiere vorhanden waren. Jede Gruppe beinhaltete mindestens sieben Mäuse. Die histologische Analyse der murinen Milchdrüsen zeigte, dass sich die DCIS-Läsionen circa drei Monate nach dem Laktationsbeginn bildeten. Wildtyp-Mäuse (Balb/C) und Mäuse vor der Laktation, dienten als Negativkontrollen. Als Positivkontrolle dienten invasive Tumore (Abb. 6).

Die operativ entnommenen Milchleisten wurden aufgeteilt. Dabei wurde ein Teil mittels 5 % Paraformaldehyd für die histologische Analyse fixiert, der zweite Teil, welcher für die RNA Isolierung bestimmt war, wurde umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Die für die histologische Untersuchung fixierten Gewebestücke wurden in Paraffin eingebettet und in 2-4 µm dicke Schnitte geschnitten. Diese wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen und pathologisch begutachtet.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die WAP-TNP8 Mäuse. Balb/C sind Wildtypmäuse, eine zusätzliche Negativkontrolle bilden Mäuse vor der Laktation. Die Monate wurden ab dem Zeitpunkt der Laktation (Geburt der Jungen) gezählt. Als Positivkontrolle wurden invasive Tumore von WAP-TNP8 Mäusen verwendet.

## 2. 7. Humane Gewebe

Gefrorenes Frischgewebe wurde aus dem Bestand der Robert-Rössle-Biobank des ECRC (Experimental and Clinical Research Center) entnommen. Darin enthaltene Tumorgewebe wurden spätestens eine Stunde nach der Operation in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Alle Patienten haben vor Entnahme der Gewebe eine schriftliche Einwilligungserklärung unterzeichnet. Die analysierte Gruppe humaner Gewebe bestand aus 9 DCIS Proben, 5 IDC und 5 gesunden Kontrollgeweben, welche bei Reduktionsplastiken entnommen wurden. Alle Proben wurden von einem Pathologen begutachtet. Die histologische Klassifizierung sowie die TNM-Stadien sind in Tab. 4 angegeben. Zusätzlich wurden das Alter und gegebenenfalls der Hormonrezeptor Status angegeben.

**Tab. 4: Übersicht über die pathologischen Befunde der verwendeten humanen Gewebeproben.**  
n/a = Daten nicht verfügbar

Probe	TNM Stadium	Tumorgrad	Alter	Östrogen Rezeptor	Progesteron Rezeptor
DCIS 1	p Tis pN0 M0	G3	85	n/a	n/a
DCIS 2	pT1c pN0 M0	G2	47	+	+
DCIS 3	pTis N0 MX	G3	54	+	-
DCIS 4	P T1c pNX M0	G2	52	-	-
DCIS 5	pTis pN0 M0	G3	56	n/a	n/a
DCIS 6	pT2 N2 M0	G3	53	-	-
DCIS 7	pT1c pN0 M0	G2	52	-	-
DCIS 8	pTis pN0 MX	G3	82	n/a	n/a
DCIS 9	pTis pN0 M0	G3	68	-	-
IDC 1	pT3m N3(15/22) M0	G2	66	+	+
IDC 2	pT2 N3a (16/21) M0	G3	63	-	-
IDC 3	pT2 N1a (1/21) M0	G3	60	-	-
IDC 4	pT2 N1(1/21) M0	G3	68	+	+
IDC 5	pT4 pN0 M0	G2	72	-	-

Das DCIS wird nach dem Aussehen der Zellen und Zellkerne, Nekrosen, Verkalkungen und Architektur bewertet. Alle Merkmale zusammen ergeben einen Grad, der mit G1 bis G3 angegeben wird. Dabei beschreibt G1 den normalen Zellen ähnliche Tumorzellen, während G3-Zellen vergleichsweise stark verändert sind.

Die TNM-Klassifizierung erfolgte nach den Vorgaben der UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Dabei beschreibt T den Primärtumor, N die regionären Lymphknotenmetastasen und M die Fernmetastasen. Wird diese Unterteilung von einem Pathologen

vorgenommen, spricht man von einer pTNM-Klassifizierung. Je nach Tumorgröße werden Zahlen von T1 bis T4 vergeben. Bei der pathologischen Klassifizierung der regionären Lymphknoten (N), wird die Anzahl der befallenen Lymphknoten von allen untersuchten Lymphknoten angegeben. L0 besagt, dass kein Lymphgefäßbefall vorliegt, wohingegen eine Invasion durch L1 zum Ausdruck gebracht wird. Für die Identifizierung von Fernmetastasen (M) muss eine histopathologische Untersuchung des entsprechenden Gewebes erfolgt sein. Da in der Regel nur eine Bildgebung der entsprechenden Organe vorliegt, wird das Fehlen einer histopathologischen Untersuchung durch ein MX zum Ausdruck gebracht.

Beim Brustkrebs werden darüber hinaus häufig spezielle Rezeptoren der Tumorzellen untersucht. Gebräuchlich ist hierbei die Analyse der Hormonrezeptoren, genauer des Östrogenrezeptors (ER) und des Progesteronrezeptors (PR). Der Hormonrezeptorstatus wird in der Regel durch immunhistochemische Färbungen bestimmt. Tumore gelten als hormonrezeptornegativ, wenn keine Färbung für den Östrogenrezeptor und den Progesteronrezeptor vorgefunden wurde. Als hormonrezeptorpositiv werden Tumoren bezeichnet, bei denen mehr als 10 % der Tumorzellen gefärbt sind.

## **2. 8. Brustkrebs-Zelllinie**

Für die Zellkulturversuche wurden MDA-MB231 Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine humane Mammakarzinom-Zelllinie epithelialen Ursprungs, welche adherent wächst. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (PAA), angereichert mit 2 mM L-Glutamin (PAA), 10 ml/l Amphotericin und 10 % FCS bei 37 °C/7 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

## **2. 9. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Um die Strukturen der Gewebe unterscheiden zu können, wurden die Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) unterzogen. Hämatoxylin ist ein basischer Farbstoff, der sich z.B. an die negativ geladene DNA anlagert und dem Zellkern somit eine blaue Färbung verleiht. Bei Eosin hingegen handelt es sich um einen sauren, anionischen Farbstoff, der an kationische Komponenten, u.a. diverse Proteine, bindet und aufgrund dessen das Zytoplasma rot färbt.

Zuerst wurden von dem zu untersuchendem Material 2 bis 4 µm dünne Paraffinschnitte hergestellt. Diese wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend zur Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 % EtOH, H<sub>2</sub>O) geführt. Anschließend

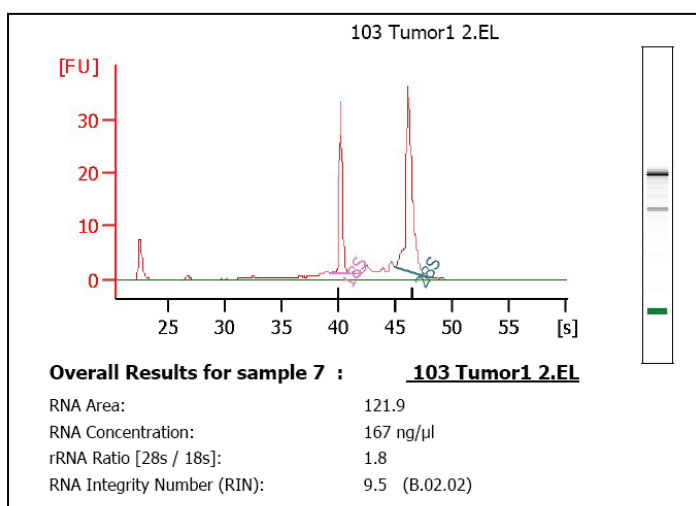
wurden die rehydrierten Schnitte in Hämatoxylin gefärbt und durch dreimaliges Waschen mit Leitungswasser gebläut. Es folgten die Gegenfärbung mit 0,1 % igem Eosin und ein erneuter Waschschrift. An eine aufsteigende Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %), welche der Dehydrierung diente, schloss sich eine kurze Inkubation in Isopropanol an. Zuletzt wurden die Proben in zwei aufeinanderfolgenden Xylolschritten restlos entwässert und mit Pertex eingedeckt. Alle Schritte der HE-Färbung, mit Ausnahme des Eindeckens, erfolgten in einem Färbeautomaten der Firma Shandon (Shandon Varistain). Alle Proben wurden von einem qualifizierten Pathologen begutachtet.

## **2. 10. RNA-Isolierung**

Die Isolierung der RNA aus den murinen Geweben erfolgte mit Hilfe des RNeasy Kits der Firma Qiagen. Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezifische Aufreinigung der Gesamt-RNA über hydrophile Siliziumgel-Säulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Zuerst wurde das Gewebe in einem Guanidin-Thiocyanat enthaltenden Puffer homogenisiert und lysiert. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme des Dissmembrators (Braun Biotech. International, Deutschland). Die im Lysispuffer enthaltenen Salze denaturieren sämtliche Proteine, inklusive vorhandener RNasen und bewahren somit die RNA vor Degradierung. Durch Zugabe von Ethanol werden geeignete Eigenschaften für die Bindung hergestellt und die Lösung auf die Säule gegeben, an die spezifisch RNA Moleküle mit einer Länge von über 200 Nukleotiden binden. Nach mehreren Waschsritten und einem zusätzlichen DNase Verdau wurde die reine RNA in einem bestimmten Volumen Nuklease-freiem Wasser eluiert. Die Isolierung der humanen RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Lipid Tissue Mini Kit der Firma Qiagen. Dies war notwendig, da das humane Brustgewebe sehr fettreich war. Dieser Kit kombiniert eine Phenol/Guanidin-Lyse mit der bewährten RNeasy RNA Isolierung und Aufreinigung. Zuerst wurden die Proben im QIAzol Lysis Puffer homogenisiert. Nach dem Hinzufügen des Chloroforms, wurde das Homogenat mittels Zentrifugation in die wässrige und die organische Phase aufgeteilt. Die RNA befand sich in der oberen wässrigen Phase und wurde abgenommen. Anschließend wurde die RNA-Lösung mit Ethanol versetzt, um optimale Eigenschaften für die Bindung herzustellen. Zuletzt wurden die Proben über eine RNeasy Zentrifugations-Säule aufgereinigt.

## 2. 10. 1. Quantifizierung und Qualitätskontrolle der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer bestimmt. Eine Absorption von 1 OD bei 260 nm entspricht dabei einem Wert von 40 µg RNA pro Milliliter Lösung. Um Proteinverunreinigungen auszuschließen, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt und der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  gebildet. Es wurden ausschließlich reine RNA-Präparationen mit einem Verhältnis von  $E_{260}$  zu  $E_{280}$  von 1,8 bis 2,1 verwendet. Die Integrität der extrahierten RNA wurde anschließend mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, USA) überprüft. Die im Bioanalyzer verwendete Lab-on-a-Chip Technologie basiert auf dem Prinzip der Mikrofluidik, der Steuerung winziger Flüssigkeitsmengen in einem miniaturisierten System. Im Bioanalyzer wird die mit dem RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen farbstoffmarkierte RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert. Die parallele Analyse eines RNA Größenstandards (RNA 6000 Ladder) erlaubte außer der qualitativen Beurteilung der Proben, auch eine Quantifizierung der RNA-Menge. Abbildung 7 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Analyse mit dem Bioanalyzer. Mit Hilfe der dazugehörigen Software, wurden die Messungen automatisch analysiert. Dabei wurde mit einem speziellen Algorithmus eine sogenannte RNA integrity number (RIN) berechnet, wobei die Werte auf einer Skala von 1 (vollständige Degradation) bis 10 (hohe Qualität) liegen. Dies ermöglicht eine objektive und reproduzierbare Aussage über die Qualität der RNA. Die Qualität der RNA ist für die Durchführung von Mikroarray-Experimenten von entscheidender Bedeutung, da nur RNA mit sehr guter Qualität, also möglichst wenig Degradation, für die Analyse geeignet ist. Daher wurden für die Mikroarrayanalyse ausschließlich Proben verwendet, die einen RIN von 7 oder höher aufwiesen.



**Abb. 7:** Beispiel einer im Bioanalyzer gemessenen Probe. Die Ergebnisse sind zum einen als Elektropherogramm dargestellt, zusätzlich wird eine gel-ähnliche Abbildung gezeigt. Auf der x-Achse des Elektropherogramms ist die Laufzeit in Sekunden aufgetragen, wodurch die Molekülgröße ermittelt wird. Auf der y-Achse wird die Fluoreszenz dargestellt. Das gel-ähnliche Bild ist vergleichbar mit einem Northern-Blot. Hierbei sind deutlich zwei scharfe Banden zu erkennen, welche die 28s und 18s RNA darstellen. Die deutlichen Banden im Gelbild sowie die starken, schmalen Peaks im Elektropherogramm, lassen auf eine gute Qualität des Materials schließen. Dies spiegelt auch der RIN-Wert von 9,5 wieder.

## 2. 11. cDNA Synthese

Die mRNA der humanen Proben wurde selektiv in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Bei der reversen Transkription, macht man sich Enzyme (reverse Transkriptasen), die ursprünglich von Retroviren stammen zunutze. Reverse Transkriptasen (RT) können RNA in DNA umschreiben. Die SuperScript™ II ist eine modifizierte RT und ermöglicht die Transkription längerer mRNAs, als die native MMLV-RT es zulässt. Wie andere Polymerasen, benötigt auch die Reverse Transkriptase kurze einzelsträngige Primer, um den komplementären Strang zu synthetisieren. Es wurden Oligo(dT)-Primer verwendet, die komplementär an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA binden. Die Sequenz der verwendeten Oligo(dT)-Primer lautet: T T T T T T T T T T T T T T T T. Die Oligo(dT)-Primer wurden von der Firma Biotex (Berlin) bezogen.

Zuerst wurden die Oligo(dT)-Primer sowie der dNTP Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) zu der umzuschreibenden RNA gegeben. Dieser Ansatz wurde zur Denaturierung der RNA und Anlagerung der Primer für 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Zu dem Ansatz wurde noch DTT, der entsprechende Puffer und das Enzym SuperScript™ II hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Bei diesem Schritt kam es zur Synthese der cDNA. Anschließend wurde der Ansatz bei 70 °C 15 min lang denaturiert und die Probe mit DEPC-Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

## 2. 12. Genexpressionsanalyse

Für die genomweiten Expressionsanalysen, wurde der Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips® bzw. der Mouse Genome 430 2.0 GeneChips® der Firma Affymetrix verwendet. Der Human Genome U133 Plus 2.0 Microarray umfasst 38500 Gene des humanen Genoms, repräsentiert durch 54000 Probe Sets (Affymetrix 2003). Der Mouse Genome 430 2.0 Mikroarray besitzt über 45000 Probe Sets, welche 34000 gut untersuchte murine Gene repräsentieren (Hardiman 2004).

Bei den Mausproben war die Menge an Gesamt-RNA auf 50 ng limitiert. Daher wurde ein spezielles Protokoll gewählt, welches zwei Runden der linearen Amplifizierung beinhaltet (GeneChip® Two-Cycle Target Labeling Protocol, Affymetrix). Es wurden von jedem Untersuchungszeitpunkt 5 Proben analysiert. Hierbei wurde auf eine hohe Qualität der



verwendeten RNA geachtet. Bei den humanen Proben war eine größere Menge RNA verfügbar und es wurde das Standardprotokoll (GeneChip® One-Cycle Target Labeling Kit, Affymetrix) verwendet. Insgesamt wurden 19 humane Proben für die Mikroarrayanalyse verwendet.

Beide verwendeten Protokolle begannen mit der Synthese doppelsträngiger cDNA. Dies erfolgte unter Verwendung eines T7-Oligo(dT)-Primers. Als Konsequenz daraus trugen alle gebildeten cDNA Moleküle den bakteriophagen T7 Promotor.

Bei dem One-Cycle Protokoll wurde sogleich mit der Aufreinigung der cDNA fortgefahren und anschließend mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase eine *In-vitro*-Transkription durchgeführt, wobei biotinylierte Nukleotide verwendet wurden. Daraus resultierte die fertige cRNA. Im Gegensatz zur cDNA Synthese, kam es hierbei zu einer 100 bis 200 fachen Amplifizierung, da ein cDNA Molekül mehrere Male als Matrize diente. Bei dem Two-Cycle Protokoll wurde noch ein weiterer Amplifizierungsschritt eingebaut. Dabei wurde mit Hilfe der cDNA zwar auch eine *In-vitro*-Transkription durchgeführt, allerdings ohne markierte Nukleotide. Die entstandene cRNA wurde unter Verwendung von Random Primern abermals in cDNA umgeschrieben, um anschließend bei der zweiten *In-vitro*-Transkription, mit Biotin markierten Nukleotiden, die endgültige cRNA zu gewinnen. Dadurch kam es zu einer wiederholten Amplifizierung. Bei beiden Protokollen wurde die Biotin markierte cRNA aufgereinigt und durch eine metallische Hydrolyse auf eine durchschnittliche Länge von 35 bis 200 Nukleotide fragmentiert. Eine schematische Darstellung über den Ablauf der beiden Protokolle ist in Abb. 8 zu finden.

Die Fragmentation wurde anschließend mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers überprüft. Durch die Fragmentierung sollten die Voraussetzungen für die Hybridisierung optimiert werden, indem die Länge der Biotin markierten cRNA an die Länge der auf der Chipoberfläche fixierten Oligonukleotide (25 Basen), weitestgehend angeglichen wurde. Schließlich wurde die gelabelte, fragmentierte cRNA für 16 Stunden bei 45 °C und 60 U/min auf die entsprechenden Affymetrix Oligonukleotid Mouse Genome 430 2.0 oder die Human Genome U133 plus 2.0 Arrays hybridisiert. Danach wurden die Arrays gewaschen, mit einem Streptavidin-Phycoerythrin Komplex gefärbt und mit dem Affymetrix GeneChip® Scanner 3000® gescannt.

Zur Sicherstellung, dass die nach dem Hybridisieren und Scannen des Chips erhaltenen Daten auch verwertbar waren, wurde eine Qualitätskontrolle durchgeführt. Hierzu wurden mit Hilfe der Affymetrix Microarray Suite 5.0 Software (MAS5), die Affymetrix Qualitätskontrollmaße ermittelt und überprüft. Das Durchführen einer Qualitätskontrolle ist von

Bedeutung, da bereits ein fehlerhafter Chip die Analyse erheblich negativ beeinflussen kann (Heber and Sick 2006). Bei der Kontrolle der Affymetrix Qualitätsmaße wurde darauf geachtet, dass der Background (Autofluoreszenz) bei allen Chips vergleichbar und keinesfalls zu hoch war (Heber and Sick 2006). Unter Background versteht man bei den GeneChips® die durch unspezifisch gebundene Zelltrümmer, Salze oder Streptavidin-Phycoerythrin-Reste verursachten Signale. RawQ (Noise/Rauschen) misst die Pixel zu Pixel Variation der Sondenzellen (Probe Cells) und sollte zwischen 1,5 und 3 liegen (Heber and Sick 2006). Der Scaling Factor (SF) sollte sich innerhalb eines Experimentes nicht mehr als um das Dreifache unterscheiden (Heber and Sick 2006). Unterschiedliche Scaling Factors sind ein Hinweis auf unterschiedliche Mengen und insbesondere eine unterschiedliche Qualität der RNA. Der Anteil der detektierten Signale (Percent Present), sollte zwischen den Mikroarrays eines Experimentes vergleichbar sein, variiert aber von Spezies zu Spezies und auch zwischen unterschiedlichen Geweben. Außerdem wurde von den internen Kontrollen *ACTB* und *GAPDH*, jeweils das 3'- zu 5'-Verhältnis ermittelt und darauf geachtet, dass dieses den Faktor 3 möglichst nicht überschritt. Aus dem Verhältnis der 3'- und 5'-Signale lassen sich Rückschlüsse auf eine mögliche Degradation dieser spezifischen RNA und damit indirekt, auf alle RNAs der Probe ziehen. RNasen bauen RNA bevorzugt vom 5'-Ende her ab. Somit ist das Signal der 5'-Sonde bei degradierten Proben schwächer, als das der 3'-Sonde. Bei dem Two-Cycle Protokoll mit zusätzlicher Amplifizierung, sind 3'- und 5'-Signale bis zu einem Wert von 7 akzeptabel.

Die Bild-Rohdaten wurden unter Verwendung der Affymetrix GeneChip® Operating Software (GCOS) in CEL-Files umgewandelt. Die weitere Analyse der Chips erfolgte mit dem Programm GeneSpring GX 10.0 der Firma Agilent. Dieses bietet umfassende statistische Analyse Möglichkeiten sowie eine Vielzahl an Visualisierungs-Tools. Bevor jedoch mit der Analyse der GeneChips® begonnen werden konnte, mussten die Signalintensitäten aller Proben „normalisiert“ werden. Die Normalisierung dient dazu, Differenzen in den Markierungs- und Detektionseffizienzen zu regulieren. Demzufolge werden verschiedene Mikroarrays miteinander vergleichbar. Es erfolgt eine Reduktion der technischen Varianz, wohingegen die biologische Varianz erhalten bleiben soll. Diese Normalisierung erfolgte nach der GCRMA Methode (Wu Z et al. 2004). GCRMA (RMA = Robust Multi-Array Analysis) ist ein Methode, die zum einen, einen Hintergrundabgleich durchführt, welcher die MM (Mismatch) Intensitäten ignoriert; zum anderen werden Sequenzinformationen der Probenzellen (GC-Gehalt) berücksichtigt. Diese Methode führt in einem einzigen Schritt eine Normalisierung innerhalb eines Chips und zwischen den verschiedenen Chips durch.

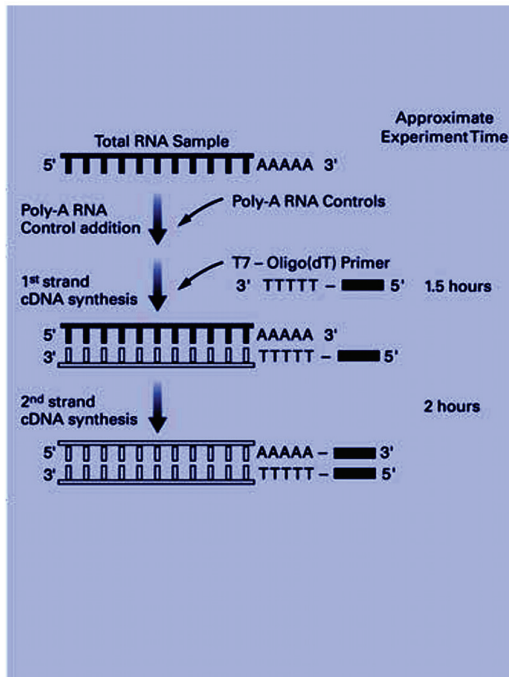
Zusätzlich führte GeneSpring GX 10.0 noch eine  $\log_2$  Normalisierung durch, so dass sich die Werte um Null zentrierten.

Mit Hilfe der GeneSpring GX 10.0 Software, wurde eine weitere Qualitätskontrolle aller verwendeten Chips durchgeführt, um sicher zu gehen, dass sich keine Ausreißer unter den zu analysierenden Chips befanden. Hierzu wurden ein Korrelations-Plot und ein PCA-Plot angefertigt. Für den Korrelationsplot wurden die Korrelationskoeffizienten für jedes GeneChip®-Paar berechnet und als Heatmap dargestellt. Die PCA (Principal Component Analysis) ist ein Verfahren der multivariaten Statistik. Sie dient dazu, die umfangreichen Datensätze zu strukturieren, zu vereinfachen und zu veranschaulichen. Dies gelingt, indem eine Mehrzahl der statistischen Variablen durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen (Hauptkomponenten/Principal Components) ersetzt wird. Dabei wird die größte Abweichung innerhalb der zu analysierenden Daten erfasst. Die Daten werden als Punktwolke, in einem n-dimensionalen, kartesischen Koordinatensystem dargestellt. Im Idealfall sollen die Mikroarrays einer Gruppe zusammen clustern und von den anderen Gruppen separiert liegen.

# GeneChip® Expressionsanalyse

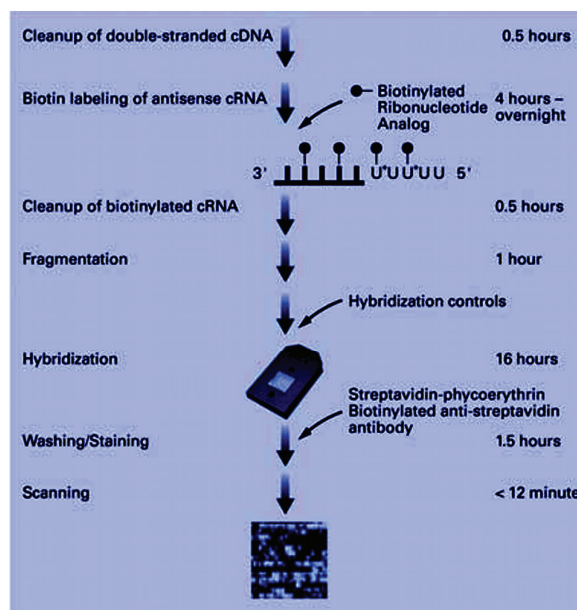
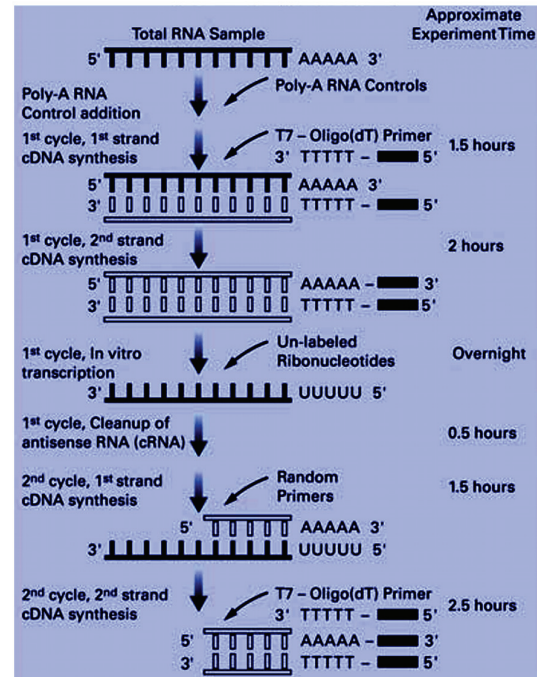
## One-Cycle Target Labeling

1-15 µg total RNA



## Two-Cycle Target Labeling

10-100 ng total RNA



### Legende

- TTTT RNA
- TTTTT DNA
- T7 promoter
- Biotin
- U<sup>\*</sup> - Pseudouridine

Abb. 8: Grafische Darstellung des Ablaufes der verwendeten Affymetrix Labeling Protokolle, dem One-Cycle und dem Two-Cycle Target Labeling Protokoll. Das Two-Cycle Protokoll ist bei geringen RNA Mengen anzuwenden und beinhaltet eine zusätzliche Amplifizierungsrunde im Vergleich zur One-Cycle Protokoll.

Um Gene zu identifizieren, die bereits sehr früh auf die Existenz eines DCIS hinweisen, wurden Proben von Mäusen, kurz nach der Laktation (Monat 2-3), mit den Kontrolltieren verglichen. Die Proben, die einen Monat nach Beginn der Laktation entnommen wurden, mussten aufgrund von Laktations-Artefakten von allen folgenden Analysen ausgeschlossen werden. Außerdem wurden Proben von invasiven duktalem Karzinomen (IDC) ebenfalls mit den Negativkontrollen verglichen. Die Analyse wurde durchgeführt, unter Zuhilfenahme des Welch-Tests (unpaired t-Test; unequal variance) mit Benjamini-Hochberg FDR (False Discovery Rate). Es wurden nur Gene berücksichtigt, deren FC (Fold Change) über 5 lag und deren p-Wert kleiner 0,01 war. Die Visualisierung der t-Tests erfolgte anhand von Volcano-Plots. Der Volcano-Plot ermöglicht ein schnelles Wahrnehmen der Signifikanz und der Größe der Veränderung der Expression (Fold Change) einer bestimmten Menge an Genen zwischen zwei Gruppen. Hierbei gibt die x-Achse des Volcano-Plots den Fold Change (FC) zwischen den beiden Gruppen an. Dieser wird im logarithmischen Maßstab aufgetragen, damit die Hoch- und Runterregulierung symmetrisch wirkt. Die y-Achse zeigt die p-Werte der t-Tests. Somit gibt die x-Achse die biologische Auswirkung der Veränderung wieder, die y-Achse zeigt den statistischen Beweis, bzw. die Glaubwürdigkeit dieser Veränderung.

Von Interesse waren Gene, die in beiden Vergleichen (Gesund/2-3M & Gesund/IDC) eine erhöhte Expression zeigten, da es sich hierbei um Gene handelt, die schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt aktiviert wurden. Zu diesem Zeitpunkt waren histologisch noch keine, bzw. nur sehr wenige DCIS-Läsionen zu diagnostizieren. Außerdem waren diese Gene immer noch im IDC hochreguliert, was zeigte, dass es sich um tumorassoziierte Gene handelt. Unter Verwendung eines Venn-Diagramms, wurden jene Gene herausgesucht, die in beiden Vergleichen zu identifizieren waren. Letztendlich ergab sich eine Liste aus 173 Probe Sets, welche 140 Gene repräsentierten, als endgültige Kandidatengruppe. Alle Probe Sets wurden mit Hilfe der Affymetrix NetAffx™ Datenbank auf ihre Annotation überprüft.

Mit den 173 Probe Sets der Kandidatengene, wurde ein hierarchisches Clustering durchgeführt. Die hierarchische Clusteranalyse untersucht die Ähnlichkeit zwischen allen Objekten im Datensatz und diese Information wurde in Form eines zweidimensionalen Diagramms, dem sogenannten Dendrogramm, dargestellt. Man nennt die Cluster hierarchisch, da große Gruppen in immer kleinere Gruppen unterteilt werden, bis schließlich jede Gruppe nur noch aus einem Objekt besteht. Zuerst müssen die Ähnlichkeiten zwischen den einzelnen Objekten berechnet werden, dazu wird jedes Objekt seinem eigenen Cluster zugeteilt. Eine Möglichkeit ist die Bestimmung des Abstandes. Dazu wurde in der vorliegenden Analyse der euklidische Abstand genutzt. Dieser ist die mathematische Definition des normalen

Abstandes. Sind die Abstände zwischen den Clustern berechnet, werden die Cluster mit dem kleinsten Abstand, unter Berücksichtigung des Complete-Linkage-Verfahrens, vereinigt. So wurde weiter verfahren, bis nur noch ein einziges Cluster übrig war, welches alle Objekte enthielt.

Anhand der Durchführung einer GO-Analyse (GO = Gene Ontology™) der identifizierten Genliste wurde überprüft, ob darin bestimmte GO-Kategorien überrepräsentiert waren. Für die GO-Analyse wurde wiederum das Programm GeneSpring GX 10.0 verwendet. Die GO-Datenbank, entwickelt durch das Gene Ontology-Konsortium (<http://www.geneontology.org>), ordnet Gene entsprechend ihrer Eigenschaften, oder ihrer Lage in der Zelle bestimmten Kategorien zu (Ashburner et al. 2000; Harris et al. 2004), wodurch man einen guten Überblick über die identifizierten Gene erhält. Diese Zuordnungen zu den GO-Kategorien werden kontinuierlich erweitert und aktualisiert. Primär werden drei Ontologiegruppen unterschieden: molekulare Funktionen, biologische Prozesse, zelluläre Komponenten. Jedes Gen erhält mehrere Annotationen (GO-Terme/GO-Kategorie), die mit allgemeinen Begriffen beginnen und zunehmend spezifischer werden. Diese GO-Terme werden hierarchisch miteinander verknüpft und werden grafisch entsprechend ihrer Häufigkeit als Tortendiagramm dargestellt. Zur Berechnung der Signifikanz der Häufigkeit, verwendet GeneSpring GX die Hypergeometrische Verteilung, wobei eine Fehlerkorrektur nach Benjamini Yekutieli mit einbezogen wird. Es werden nur GO-Kategorien berücksichtigt, die einen korrigierten p-Wert von unter 0,05 aufzeigen.

Aus den 140 Kandidatengenen wurden die sieben vielversprechendsten herausgesucht. Diese wurden ebenfalls in einem hierarchischen Clustering abgebildet. Zur Veranschaulichung der Expression jedes einzelnen Gens in den verschiedenen Gruppen, (Kontrollen, unterschiedliche Zeitpunkte und ICD) wurde diese grafisch, mittels Boxplots, dargestellt. Der Boxplot (auch Box-Whisker-Plot) ist ein Diagramm, das zur grafischen Darstellung einer Reihe numerischer Daten verwendet wird. Der Boxplot fasst verschiedene Maße der zentralen Tendenz, Streuung und Schiefe in einem Diagramm zusammen (Median, obere und untere Quartil und Extremwerte). Als Box, welche 50 % der Daten umfasst, wird das durch die Quartile bestimmte Rechteck bezeichnet. Durch die Länge der Box ist die Interquartildifferenz abzulesen. Der Median ist in der Box eingezeichnet und gibt somit Hinweise auf die Schiefe der Daten. Ausreißer werden als Kreis dargestellt und sind mehr als das 1,5-fache vom oberen bzw. unteren Quartil entfernt. Extremwerte werden als Stern dargestellt und sind mehr als das Dreifache vom oberen bzw. unteren Quartil entfernt.

Die Analyse der humanen Proben erfolgte in analoger Weise. Es wurde jedoch der Fokus auf die sieben, im Mausmodell gefundenen Gene, gelegt. Auch für die humanen Proben erfolgte eine grafische Darstellung über ein hierarchisches Clustering und Boxplots.

## 2. 13. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative RT-PCR wird unter Verwendung von TaqMan® Gene Expression Assays der Firma ABI (Applied Biosystems) und des ABI Prism™ 7900 HT Sequence Detection System ebenfalls von der Firma ABI (Applied Biosystems) durchgeführt. Die verwendeten Gen Expressions Assays (Assay on Demand™) sind in den Tabellen 5 und 6 aufgeführt. Die vorgefertigte Assays enthalten jeweils zwei bereits getestete Primer, für das entsprechende Gen sowie eine Fluoreszenzsonde (TaqMan Probe).

**Tab. 5: Übersicht über die verwendeten humanen Assays on Demand™**

Gen	Assay on Demand ID
<i>MUC1</i>	Hs00159357_m1
<i>SPP1</i>	Hs00959010_m1
<i>RRM2</i>	Hs01072069_g1
<i>FOXMI</i>	Hs00153543_m1
<i>EXO1</i>	Hs01116190_m1
<i>DEPDC1</i>	Hs00854841_g1
<i>NUSAP1</i>	Hs01006195_m1
<i>ACTB</i>	HS99999903_m1

**Tab. 6: Übersicht über die verwendeten murinen Assays on Demand™**

Gen	Assay on Demand ID
<i>Muc1</i>	Mm00449604_m1
<i>Spp1</i>	Mm01611440_mH
<i>Rrm2</i>	Mm01287170_g1
<i>Foxm1</i>	Mm00514924_m1
<i>Exo1</i>	Mm00516302_m1
<i>Depdc1</i>	Mm00780966_s1
<i>Nusap1</i>	Mm00505602_m1
<i>Actb</i>	4352341E

Das Prinzip der Quantifizierung beruht auf der Messung eines Fluoreszenzsignals, welches im Laufe der PCR entsteht. An die für die RT-PCR verwendeten, genspezifischen Sonden, sind

zwei Farbstoffe gekoppelt. Am 5'-Ende sitzt ein Reporter-Farbstoff (R), am 3'-Ende ein Quencher-Farbstoff (Q). Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Farbstoffe, wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes unterdrückt (Abb. 9). Dieses Phänomen nennt man FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). Zunächst hybridisieren die sequenz-spezifische fluoreszenzmarkierte Sonde und die spezifischen Primer an den Matrizen-Strang. Bei der Amplifizierung verdrängt die Polymerase, die den Matrizen-Strang vom 3'-Ende zum 5'-Ende abliest, die Sonde und hydrolysiert diese. Dabei wird der Reporter-Farbstoff vom Quencher-Farbstoff räumlich getrennt, so dass der Reporter-Farbstoff nun ein Fluoreszenzsignal erzeugt. Dieses Fluoreszenzsignal wird im Anschluss an jeden PCR-Zyklus gemessen.

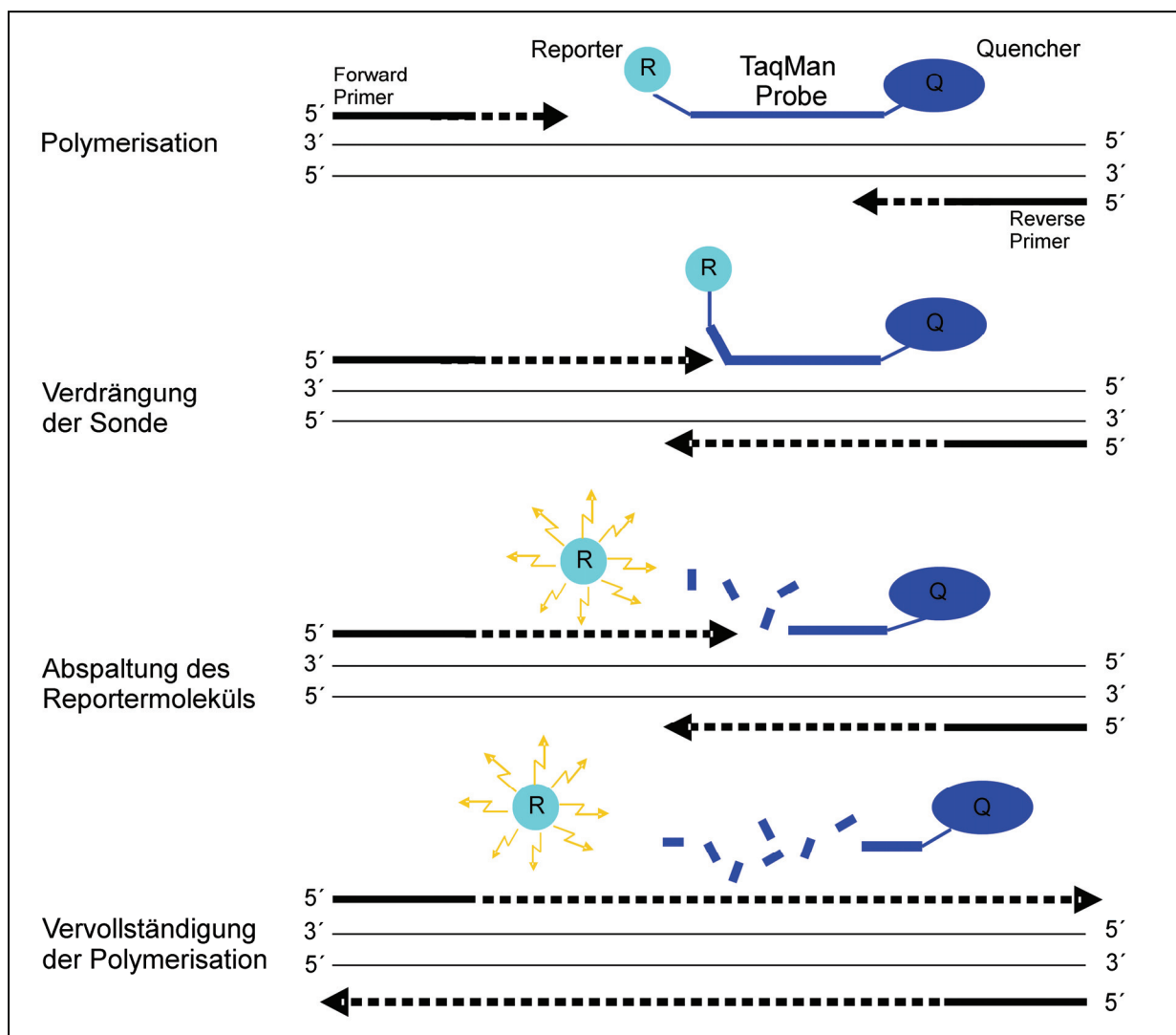


Abb. 9: Prinzip der TaqMan PCR. Zu Beginn der Reaktion lagern sich Primer und Probe an die cDNA an. Dabei ist das Fluoreszenzsignal, aufgrund der Nähe der beiden Farbmoleküle, unterdrückt. Durch die Strang-Verlängerung der Polymerase, kommt es zur Verdrängung und Hydrolyse der Sonde und zu einer Trennung von Reporter und Quencher. Dadurch wird die Fluoreszenz nicht länger unterdrückt und wird nachweisbar. (R = Reporter, Q = Quencher)



Die eigentliche Quantifizierung der zu untersuchenden Probe, erfolgte durch die Analyse des Anstieges des Fluoreszenzsignals. Mit jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich die Menge des Amplifikats und dementsprechend auch das Fluoreszenzsignal der Probe. Dies lässt sich in einer logarithmischen Funktion, in der die Menge des entstehenden Amplifikats gegen die Zyklenzahl aufgetragen wird, darstellen. Der Ct-Wert (Threshold Cycle) ist die Zyklenzahl, ab der die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, der gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht ist. Wird ein Gen in einem Gewebe stark exprimiert, so liegen zu Beginn der PCR-Reaktion entsprechend viele cDNA-Kopien vor und der festgelegte Schwellenwert wird nach wenigen Zyklen überschritten, im Gegensatz zu einem Gewebe mit niedriger Expression. Somit dient der Ct-Wert als Maß zur Quantifizierung der Ausgangsmenge.

Bei den humanen Proben wurde vor Durchführung der qRT-PCR eine cDNA Synthese durchgeführt, sodass das Standard-Protokoll der Firma ABI zum Einsatz kam. Die PCR-Analyse erfolgte nach dem Protokoll der Firma ABI. Die verwendeten Sonden waren an ihrem 5'-Ende mit dem fluoreszenten Reporter-Farbstoff FAM markiert, am 3'-Ende (Quencher) mit dem Farbstoff TAMRA. Es wurde ein Endvolumen von jeweils 10 µl in einer 384-Well Platte für die PCR eingesetzt. Diese enthielt, für die jeweils zu untersuchenden Zielsequenzen, 1 µl cDNA-Probe, 5 µl TaqMan® Universal Master Mix, 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay (Target Primer & Probe) sowie 3,5 µl RNase freies Wasser. Die Amplifizierung erfolgte nach dem unten aufgeführten Protokoll, welches insgesamt 40 Zyklen, aus sich abwechselnden Denaturierungs- und Annealingschritten enthielt:

PCR Programm:

50 °C	2:00	
95 °C	10:00	
-----		
95 °C	0:15	} x 40 Zyklen
60 °C	1:00	
-----		

Bei den Mausproben wurde aufgrund der limitierten RNA Menge, auf eine cDNA Synthese verzichtet und der Kit „RNA Ultra Sense One Step qRT-PCR System“ (Invitrogen) verwendet, bei welchem direkt mit der Gesamt-RNA gearbeitet wurde. Der Kit enthielt

optimierte Komponenten, die es erlaubten, die Reverse Transkription und die PCR in einem Reaktionsgefäß durchzuführen.

Dabei wurde genau nach dem mitgelieferten Protokoll der Firma Invitrogen gearbeitet und das Programm für die Analyse entsprechend angepasst. Zuerst erfolgte die Reverse Transkription für 15 min bei 50 °C. Daran schloss sich der PCR Aktivierungsschritt (2 min bei 95 °C) an. Dabei wurde die Polymerase aktiviert, die Reverse Transkriptase inaktiviert und das cDNA Template denaturiert. Anschließend folgte für 50 Zyklen ein Wechsel von 15 s 95 °C und 30 s 60 °C.

PCR Programm:

50 °C	15:00	
95 °C	2:00	
-----		
95 °C	0:15	} x 50 Zyklen
60 °C	0:30	
-----		

Für alle qRT-PCR Versuche wurde *ACTB* als Housekeeping-Gen verwendet, da aufgrund der Microarray Ergebnisse klar war, dass dieses Gen, in allen zu untersuchenden Proben, gleichermaßen exprimiert war. Außerdem wurden alle Proben als Triplikat untersucht.

### 2. 13. 1. Berechnung nach der $\Delta\Delta C_t$ Methode

Die relativen Unterschiede in der Genexpression der untersuchten Gene, wurden anhand der  $\Delta\Delta C_t$  Methode ermittelt. Zuerst wurde die Expression der untersuchten Gene auf die Expression des Housekeeping Gens *ACTB* normalisiert. Dazu wurde der  $\Delta C_t$  Wert berechnet. Dieser ergab sich aus der Differenz zwischen dem  $C_t$  des untersuchten Gens und dem  $C_t$  des Housekeeping Gens. Der  $\Delta\Delta C_t$  Wert wurde dann über die Differenz von den  $\Delta C_t$  Werten der zu vergleichenden Proben berechnet. Der relative Expressionsunterschied (R) zwischen zwei Proben konnte über die Formel  $R = 2^{-\Delta\Delta C_t}$  bestimmt werden. Dieser wurde zuletzt anhand eines Box-Plots für jede Gruppe grafisch dargestellt.

## 2. 14. Immunhistochemie

Immunhistochemische Verfahren gehören heute bei zahlreichen pathohistologischen Fragestellungen zum Standard. Hierbei können im Gewebe vorhandene Antigene mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Dabei nutzt man die Spezifität der Antikörper, um die zelluläre und subzelluläre Verteilung und Häufigkeit von bestimmten Antigenen an histologischen Gewebeschnitten zu visualisieren. Ein Antigen lässt sich direkt oder indirekt nachweisen, wobei der indirekte Nachweis gebräuchlicher ist. Hierbei ist der primäre Antikörper unkonjugiert. Zur Visualisierung werden hochspezifische, gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtete, sekundäre Antikörper verwendet, die ihrerseits mit einem Enzym gekoppelt werden. Die Nachweisreaktion erfolgt analog zur direkten Methode, wobei das indirekte Verfahren um einiges sensitiver ist, da durch Verwendung von zwei Antikörpern eine Signalverstärkung entsteht.

Für diese Arbeit wurde die Streptavidin-Biotin-Methode, als Variante des indirekten Antigennachweises, eingesetzt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst in Xylol deparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert und kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen. Das anschließende sogenannte Antigenretrieval - hiermit werden Antigene im Gewebe demaskiert und für die entsprechenden Antikörper zugänglich gemacht - erfolgte durch ein fünfminütiges Aufkochen der Schnitte in 0,01 M Natriumcitratpuffer pH 6,0 in einem handelsüblichen Schnellkochtopf. Nach Druckausgleich und Öffnung des Deckels, wurden Topf und Inhalt langsam (ca. 20 min) unter fließendem Wasser abgekühlt und die Schnitte anschließend in TBS gewaschen. Zur Inhibierung der unspezifischen Interaktion des Detektionssystem mit endogenem Biotin, wurden die Schnitte mit dem DAKO® Biotin Blocking System (Dako, Dänemark), entsprechend den Angaben des Herstellers, vorbehandelt. Es folgte die zweistündige Inkubation mit dem primären Antikörper, welcher in 20 % FCS/TBS verdünnt wurde. Diese Inkubation fand bei Raumtemperatur, in einer feuchten Kammer, (Shandon Lipshaw, Frankfurt/M) statt. Die verwendeten Konzentrationen sowie die Bezugsquellen der verwendeten Antikörper, wurde in Tabelle 7 angegeben. An die Inkubation des Primärantikörpers anschließend, wurden die Schnitte in mehreren Schritten gewaschen (H<sub>2</sub>O; Tween/TBS (0,1 %); H<sub>2</sub>O; TBS), um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde der passende biotinylierte, sekundäre Antikörper (Tab. 8) auf die Schnitte gegeben (30 min, Raumtemperatur). Wiederum wurden die Schnitte in TBS gewaschen und anschließend mit der Streptavidin-Alkalischen-Phosphatase (Vector Laboratories, USA) inkubiert (30 min, Raumtemperatur). Nach erneutem Waschen mit TBS, wurde die

Farbreaktion durch das Auftropfen der Substrat-Chromogen-Lösung hervorgerufen und nach Erreichen der gewünschten Signalintensität mit H<sub>2</sub>O abgestoppt. Bei der Verwendung von alkalischer Phosphatase als Reporterenzym, wurden Neufuchsin als Chromogen und Naphthol-As-Bi-Phosphat als Substrat benutzt. Durch die anschließende Gegenfärbung der Schnitte mit Hämatoxylin (ca. 1-2 min, Raumtemperatur), wurde eine Zuordnung der immun-histochemisch, detektierten Proteine im Gewebekontext möglich. Nach Entwässerung der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe und abschließender Xylol-Fixierung, wurden die Schnitte mit Entellan (Merck) eingedeckt.

Als Kontrolle der unspezifischen Färbung, dienten Schnitte, bei denen der primäre Antikörper durch TBS ersetzt wurde. Die aus der Enzymreaktion resultierende rosa Färbung, wurde lichtmikroskopisch sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Kamerasystems dokumentiert.

**Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper**

Antikörper	Poly/mono	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Hersteller
MUC1	Polyklonal	1:50	Kaninchen	US Biological
SPP1	Polyklonal	1:100	Ziege	Imgenex
RRM2	Monoklonal	1:100	Maus	Abnova
FOXM1	Polyklonal	1:100	Ziege	Imgenex
DEPDC1	Monoklonal	1:100	Maus	abcam
NUSAP1	Polyklonal	1:100	Maus	Abnova

**Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper**

Antikörper	Konjugat	Katalog-Nr.:	Hersteller
Anti - Kaninchen IgG	Biotin	BA - 1000	Vector Laboratories
Anti - Ziege IgG	Biotin	BA - 5000	Vector Laboratories
Anti - Maus IgG	Biotin	BA - 2000	Vector Laboratories

## 2. 15. Transfektion humaner Brustkrebszellen mit siRNA gegen *DEPDC1*

RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt einen hoch konservierten Mechanismus für posttranskriptionelles Gen-Silencing, bei dem die Expression eines Gens gezielt durch spezifische kurze RNA-Moleküle, sogenannte small interfering RNAs (siRNAs) inhibiert wird (Fire et al. 1998; Kurreck 2009). Meist werden künstlich synthetisierte siRNAs in die Zelle eingebracht, um einen Knockdown des Zielgens zu erreichen. Charakteristisch für diese siRNA-Moleküle ist eine Länge von 21 Nukleotiden sowie der beidseitige Überhang von zwei Basen an den 3'-Enden (Elbashir et al. 2001). Außerdem ist von entscheidender Bedeutung, dass Homologien der siRNA Sequenz zu anderen Genen, als dem eigentlichen Zielgen vermieden werden, um unspezifische Nebeneffekte zu vermeiden.

Wird die siRNA mittels Transfektion in die Zelle eingebracht, so bindet diese an den RISC-Komplex (RNA-Induced Silencing Complex). Im RISC-Komplex wird die Helix der siRNA entwunden und der Sense-Strang entfernt, es verbleibt nur der Antisense-Strang im RISC-Komplex. Dieser aktivierte RISC-Komplex, bindet an die komplementäre mRNA der Zielgens und spaltet diese mittig. Die gespaltene mRNA wird anschließend degradiert.

Die Transfektion von siRNA gegen *DEPDC1* in MDA - MB 231 Zellen wurde mit dem Kit TransMessenger™ Transfection Reagent (Qiagen) durchgeführt. Die verwendete siRNA wurde ebenfalls von der Firma Qiagen bezogen, hierbei wurde eine kommerziell zu erwerbende siRNA gegen *DEPDC1* (Hs-DEPDC1\_8HP siRNA; SI03241616) ausgewählt. Auch die als Negativkontrolle verwendete AllStar siRNA stammte von der Firma Qiagen. Bei der Transfektion wurde sich an die Empfehlungen des Herstellers gehalten. Pro Well einer 6-Well-Platte wurden, am Vortag der Transfektion,  $7 \times 10^4$  Zellen eingesät. Für die Transfektion wurden pro Well 500 ng siRNA eingesetzt. Das Verhältnis von eingesetzter Nukleinsäuremenge, zu TransMessenger Volumen, zu Enhancer Volumen (in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) betrug dabei 1: 20: 40. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und für 7 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden 2 ml RPMI 1640 Medium dazugegeben, um die Reaktion abzustoppen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mittels qRT-PCR, der Knockdown-Effekt überprüft und die funktionalen Analysen durchgeführt.

## 2. 15. 1. Wachstumskurve

Um die Wachstumsrate von siRNA behandelten MDA-MB 231 Zellen zu bestimmen, wurden  $3 \times 10^4$  Zellen in die Vertiefungen einer 24-Wellplatte eingesät. Es wurden vier Zellzahlbestimmungen als Dreifachbestimmungen in einem Intervall von jeweils 24 Stunden durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 20 min bei 37 °C mit Accutase (PAA) gelöst und anschließend mit PSB gewaschen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei jeweils vier Gesichtsfelder ausgezählt wurden. Die einzelnen Werte wurden in drei unabhängigen Versuchen bestimmt.

## 2. 15. 2. Migrations-Assay

Mit diesem Versuch sollte der Einfluss von *DEPDC1* auf das Migrationsverhalten von humanen Brustkrebszellen (MDA-MB 231) untersucht werden. Dazu wurden spezielle Inserts (cell culture insert BD Biosciences) verwendet, welche eine Porengröße von 8 µm haben. Diese Poren mussten von den Zellen, welche in das Insert eingesät wurden, durchwandert werden, um in das in der unteren Kammer befindliche Vollmedium zu gelangen.

Zunächst wurden je ein Insert in die Vertiefung einer 24-Well Platte eingehängt und  $2,5 \times 10^4$  Zellen in 200 µl serumfreiem Medium eingesät. In den unteren Teil des Wells wurden 500 µl RPMI + 20 % FCS gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 20 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. An die Inkubation schloss sich eine 45-minütige Färbung der lebenden Zellen mit Calcein AM an. Calcein AM wird von lebenden Zellen aufgenommen und durch intrazelluläre, unspezifische Esterasen zum Fluoreszenzfarbstoff Calcein gespalten. Das Absorptionsmaximum von Calcein liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum bei 517 nm. Die durch die Membran gewanderten und sich somit auf der Unterseite der Membran befindlichen Zellen, wurden zuletzt mit Hilfe von Trypsin/EDTA abgelöst und deren Fluoreszenz in einem Fluoreszenz-Messgerät (Tecan) bestimmt.

### 2. 15. 3. Invasions-Assay

Der Invasions-Assay erfolgte unter Verwendung spezieller BD BioCoat™ Matrigel™ Invasions-Kammern (BD Biosciences). Es handelt sich hierbei, analog zum Migrations-Assay, um Inserts mit 8 µm Porengröße, wobei die Membran auf der Innenseite zusätzlich mit einer künstlichen extrazellulären Matrix (Matrigel™) beschichtet ist.

Die Platten mit den Invasions-Kammern wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 500 µl serumfreiem Medium gefüllt und 2 h bei 37 °C im Inkubator rehydriert. Anschließend wurde das Medium der oberen Kammer, gegen frisches, ebenfalls serumfreies Medium mit  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ausgewechselt. In die untere Kammer wurden 750 µl Vollmedium gegeben und der Ansatz für 20 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden nicht migrierte Zellen, welche sich noch immer auf der Oberseite des Matrigels befanden, mit einem Wattestäbchen entfernt. Die migrierten Zellen, welche sich auf der Membranunterseite befanden, wurden für 2 min mit 100 % Ethanol fixiert und gefärbt. Die Färbung erfolgte für 2 min mit 1 % Toluidinblau. Zum Entfärben wurde wiederholt mit H<sub>2</sub>O gespült. Die gefärbte Membran wurde getrocknet, ausgestanzt und mit Hilfe von Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako) auf einem Objektträger fixiert. Von jeder Membran wurden mit Hilfe eines Mikroskops, die durch die Membran gewanderten Zellen gezählt und der Mittelwert gebildet.

### 2. 15. 4. Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse basiert auf der Anfärbung der nukleären DNA mit Propidiumiodid. Der DNA-Gehalt der Zellkerne verdoppelt sich während eines Zellzyklus, so dass je nach DNA-Gehalt, eine Zuordnung der Zellen zu einer bestimmten Zellzyklusphase möglich ist. Propidiumiodid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit der DNA interkaliert.

Die Zellen wurden mit Hilfe von 300 µl Accutase abgelöst, mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 % igem Ethanol fixiert. Nach einmaligem Waschen mit HBSS-Puffer, wurden die Zellen für 30 min bei 37 °C mit der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung enthielt 50 µg/ml Propidiumiodid (PI) sowie 1 mg/ml RNase A, gelöst in HBSS-Puffer. Nach der Färbung wurden die Zellen erneut mit HBSS-Puffer gewaschen und für die Messung in FACS-Puffer aufgenommen.

Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des FACSCalibur™ (BD Biosciences) durchflusszytometrisch gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit der CellQuest Software (BD Biosciences). Anhand des DNA Gehalts konnten die Zellzyklusphasen (Sub G1, G0/G1, S oder G2/M) ermittelt und im Histogramm dargestellt werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3. 1. Histologische Charakterisierung des verwendeten Mausstammes

Wie bereits im Methodenteil erläutert, wurden die WAP-TNP8 Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten, berechnet ab dem Tag der Laktation, untersucht. Zusätzlich wurden die Mäuse regelmäßig palpiert. Waren vor dem geplanten Zeitpunkt Tumore spürbar, wurde das entsprechende Tier euthanasiert und die Milchleisten somit vorzeitig entnommen. Von jedem Versuchstier wurden mehrere Gewebeproben der Milchleiste resiziert und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden HE-Schnitte hergestellt, welche von einer fachkundigen Pathologin begutachtet wurden. Insgesamt wurden die histologischen Befunde von 69 Mäusen ausgewertet. In Abbildung 10 sind beispielhaft, je ein gesunder Milchgang, ein DCIS sowie ein invasives Mammakarzinom abgebildet. Hierbei ist deutlich die Differenz zwischen einem gesunden Milchgang, welcher ein leeres Lumen aufweist und einem DCIS befallenen Milchgang, welcher durch Tumorzellen obliteriert ist, zu erkennen. Umgeben sind die Milchgänge von Fettgewebe. Im Fall des invasiv duktales Karzinoms, sind die bekannten Gewebestrukturen kaum mehr zu erkennen, die Tumorzellen sind komplett in das umliegende Gewebe infiltriert.

Abbildung 11 zeigt die Anzahl der histologisch nachweisbaren DCIS-Läsionen zu den verschiedenen untersuchten Zeitpunkten. Wie zu sehen ist, war einen Monat nach Beginn der Laktation und somit der Aktivierung des Onkogens, histologisch bei keinem Versuchstier ein DCIS nachzuweisen. Nach zwei Monaten wiesen etwa 14 % der WAP-TNP8 Mäuse DCIS-Läsionen auf, nach drei Monaten etwa 35 %. Mit Zunahme der seit der Aktivierung des Onkogens vergangenen Zeit, nahmen auch die histologisch nachweisbaren DCIS zu. So waren vier Monate nach Beginn der Laktation bei 50 % der Mäuse DCIS nachzuweisen. Zu diesem Zeitpunkt stieg ebenso das Auftreten von invasiven Tumoren deutlich an. Fünf Monate nach Aktivierung des Onkogens, wurden bei 43 % der Tiere DCIS nachgewiesen. Das Absinken der DCIS Häufigkeit in dieser Gruppe, ist mit der kleinen Gruppengröße zu erklären. Diese ist der Tatsache geschuldet, dass viele Tiere bereits zuvor euthanasiert werden mussten, da sie bereits invasive Tumore zeigten. Die Mäuse der Gruppen 4 und 5 Monate wiesen etwa zu 70 % invasive Tumore auf.



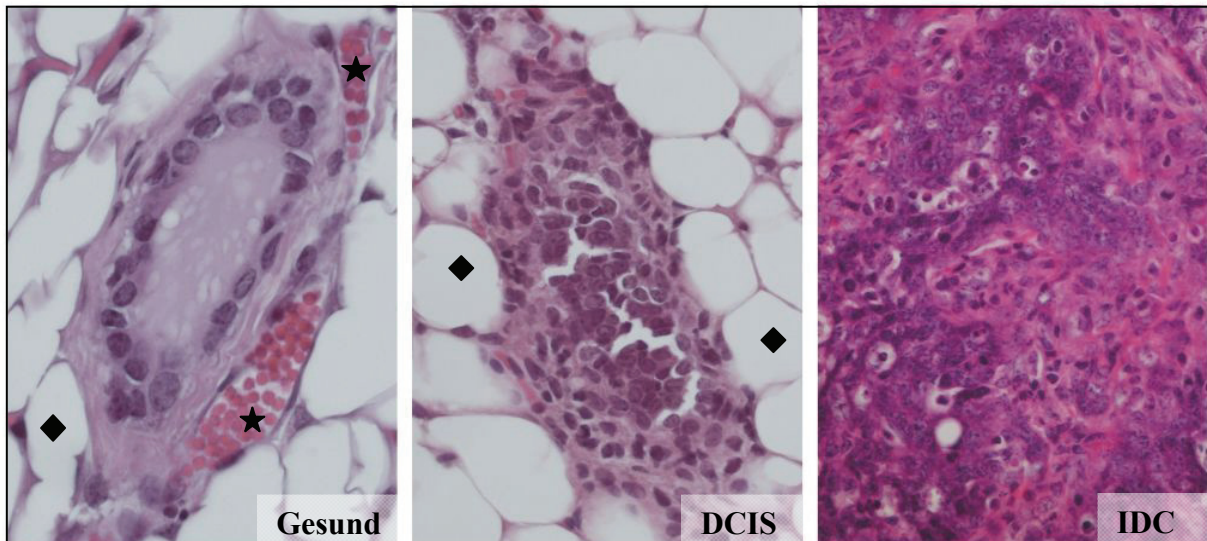


Abb. 10: Abbildung der häufigsten, histologisch nachgewiesenen Befunde in dem WAP-TNP8 Mausmodell. Die linke Abbildung zeigt einen gesunden Milchgang, die mittlere Abbildung eine DCIS und die rechte Abbildung ein invasives Mammakarzinom. Bei der Darstellung des gesunden Milchgangs sowie des DCIS, ist jeweils zentral der Milchgang zu erkennen, welcher von Fettzellen (Rauten) umgeben ist. In der Abbildung des gesunden Milchganges, sind überdies mit Erythrozyten gefüllte Blutgefäße zu erkennen (Sternchen). Bei den gezeigten Abbildungen handelt es sich um HE-Färbungen, welche in 400-facher Vergrößerung aufgenommen wurden.

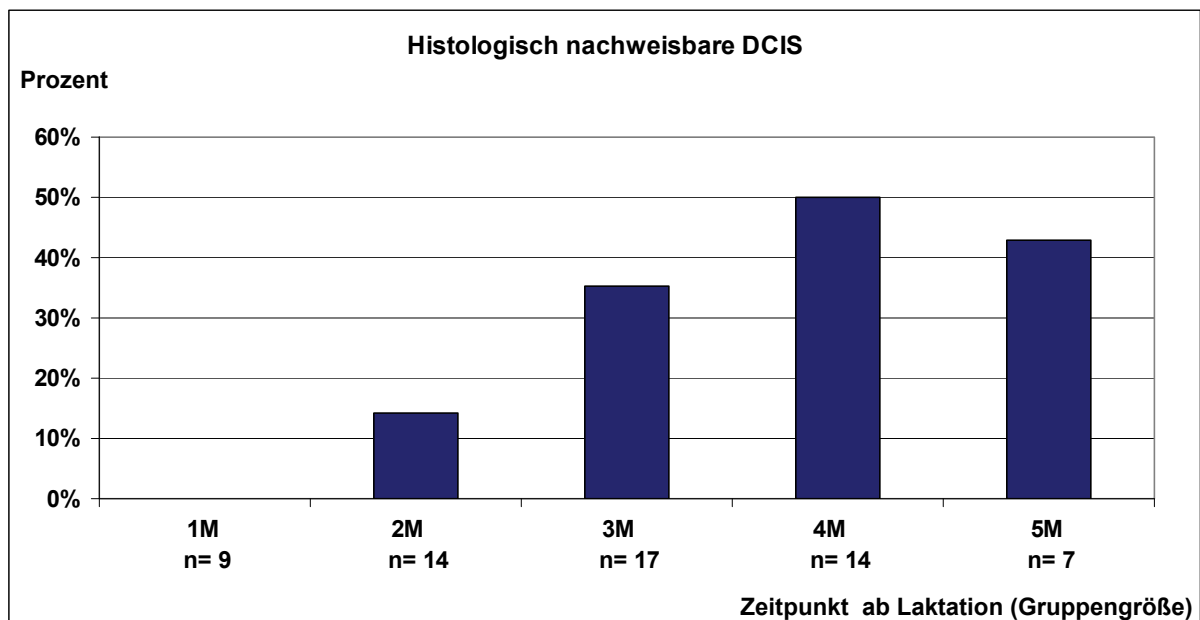


Abb. 11: Grafische Darstellung der in den WAP-TNP8 Mäusen nachgewiesenen DCIS-Läsionen. Die Monate (1M-5M) wurden ab dem Zeitpunkt des Werfens (= Laktationsbeginn) berechnet. Unter der Gruppenbezeichnung ist jeweils die Anzahl der untersuchten Mäuse angegeben.

## 3. 2. Genexpressionsanalyse des Mausmodells

Für die genomweiten Expressionsanalysen wurde der Mouse Genome 430 2.0 GeneChip® der Firma Affymetrix verwendet. Aufgrund der limitierten RNA Menge wurde eine Amplifizierung in das Aufbereitungsprotokoll mit eingefügt (GeneChip® Two-Cycle Target Labeling Protocol, Affymetrix). Die gelabelten Proben wurden auf den Chip hybridisiert und die Fluoreszenzsignale gemessen. Die Werte der einzelnen Proben wurden mit Hilfe der Affymetrix GeneChip® Operating Software in sogenannten Cel-Files gespeichert. Diese wurden für die weitere Analyse genutzt. Es wurden pro Gruppe fünf Mäuse untersucht. Somit wurden insgesamt 35 Mouse Genome GeneChips® ausgewertet.

### 3. 2. 1. Qualitätskontrolle der murinen GeneChip® Mikroarrays

Zuerst wurden die Affymetrix Qualitäts-Kontrollmaße aller murinen Mikroarrays überprüft (Anhang, Tab.14). Es wurde darauf geachtet, dass der Background (Autofluoreszenz) bei allen Chips vergleichbar war, außerdem sollte der Background einen Wert zwischen 50 und 100 aufzeigen. Die Mehrheit der Mikroarrays hatte Background-Werte um den Wert 100, was entsprechend der Angaben des Herstellers war. RawQ sollte zwischen 1,5 und 3 liegen. Zwei GeneChips® zeigten mit einem RawQ Wert von 4 leicht erhöhte Werte. Der Scaling Factor sollte sich innerhalb eines Experimentes nicht mehr als um das Dreifache unterscheiden, was in diesem Experiment zutraf. Die Tatsache, dass sich der Scaling Factor innerhalb der analysierten GeneChips® nur um 0,5 unterschied, ist auf die gute Qualität der RNA zurückzuführen. Außerdem wurde von den internen Kontrollen, *Actb* und *Gapdh* jeweils das 3'- zu 5'-Verhältnis ermittelt und darauf geachtet, dass dieses den Faktor 7 möglichst nicht überschritt. Dieses war für alle analysierten GeneChips® gegeben. Da anhand der Affymetrix Qualitäts-Kontrollmaße keine Ausreißer unter den GeneChips® ermittelt werden konnten, wurden alle GeneChips® für die weitere Analyse verwendet. Eine weitere Qualitätskontrolle erfolgte mit Hilfe des Programms GeneSpring GX 10.0 der Firma Agilent. Vor der Analyse der GeneChips® wurde eine Normalisierung nach der GCRMA Methode (Wu Z et al. 2004) durchgeführt. Die Expressionswerte aller Gene, für jeden Chip, nach der Normalisierung sind in Abbildung 12 A dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Boxplots, welche eine sehr geringe Interquartildifferenz aufweisen, um den Wert Null zentriert haben. Dies zeigt, dass die Normalisierung, sowohl innerhalb eines jeden Chips, als auch zwischen den ver-

schiedenen Chips, erfolgreich durchgeführt wurde. Die Chips zeigen ein einheitliches und somit vergleichbares Expressionsprofil.

Zur Überprüfung der Ähnlichkeit der verschiedenen GeneChips®, wurde ein Korrelations-Plot angefertigt (Abb. 12 B). Dabei sind die errechneten Korrelationskoeffizienten für jedes GeneChip®-Paar als Heatmap dargestellt. Anhand des angegebenen Farbcodes kann man den Korrelationskoeffizienten ablesen. Innerhalb des Korrelationsplots ist bereits eine Identifizierung bestimmter Muster und Strukturen zwischen verschiedenen Mikroarrays möglich. So ist zu erkennen, dass auf Grund des niedrigeren Korrelationskoeffizienten (rötliche Färbung), die invasiv duktales Karzinome (IDC) in verminderter Intensität mit den restlichen Proben korrelieren. Allerdings korrelieren die IDC untereinander sehr gut, was zeigt, dass sie untereinander sehr gut vergleichbar sind. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Negativkontrollen sehr gut miteinander korrelieren, jedoch mit den Proben der verschiedenen Monate in geringerem Maße korrelieren. Die geringste Korrelation ist zwischen den Kontrollen und den invasiven Tumoren auszumachen. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass in den IDC eine Vielzahl der Gene eine veränderte Expression zeigen. Außerdem ist zu erkennen, dass diese Veränderung in den WAP-TNP8 Mäusen schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt eintritt.

Der PCA-Plot (Abb. 12 C) zeigt die Daten als Punktwolke in einem n-dimensionalen Raum. Dabei steht jeder Punkt für einen GeneChip®. Die Punkte sind, entsprechend der Gruppen, gefärbt und ihre Größe soll die Lage im Raum verdeutlichen. Wie zu erwarten war, liegen die Mikroarrays einer Gruppe aufgrund ihrer Ähnlichkeit näher beieinander, als Mikroarrays verschiedener Gruppen. Dies ist besonders gut an den invasiven Tumoren zu erkennen. Die Balb/C Mäuse liegen ebenfalls deutlich separiert. Insgesamt ist zu erkennen, dass alle GeneChips® einer Gruppe verhältnismäßig dicht beieinander liegen und somit untereinander gut vergleichbar sind.

Abbildung 12 D zeigt ein Unsupervised Hierarchical Clustering. Unsupervised bedeutet, dass für das Clustern alle Gene, ohne vorherige Selektion, verwendet wurden. Das dargestellte hierarchische Clustering (Dendrogramm) spaltet sich primär in zwei Arme auf, wobei der eine Arm die invasiven Tumore (IDC) enthält, der andere die übrigen Proben. Dies bestätigt, die schon bei der Analyse des Korrelationsplots angestellte Vermutung, dass in den IDCs die Expression vieler Gene stark verändert ist. Innerhalb des Dendrogramm-Armes, welcher die Kontrollen und die Proben der verschiedenen Monate enthält, gibt es eine weitere Aufspaltung in zwei große Unterarme.

Der erste dieser Unterarme umfasst 9 der 10 Negativkontrollen sowie zwei Proben der 2 Monats-Gruppe und je eine Probe der Monate 3 und 5. Dabei bilden die zuletzt genannten Proben zusammen mit einer Kontrollprobe, erneut einen neuen Unterarm. Dadurch entsteht ein zweiter Unterarm, welcher ausschließlich Proben der Kontrollgruppen enthält. Dies zeigt, dass sich die Kontrollen hinsichtlich ihrer Expression stark ähneln.

Der zweite große Unterarm enthält den überwiegenden Teil der Proben der verschiedenen Monate. Hierbei ist zu erkennen, dass die Proben einer Gruppe partiell zusammen clustern. Dies ist besonders gut im Fall der 1 und 3 Monats-Gruppen zu beobachten. Dies impliziert, dass sich die Expression schrittweise verändert und dass die Proben einer Gruppe eine ähnliche Expression aufweisen.

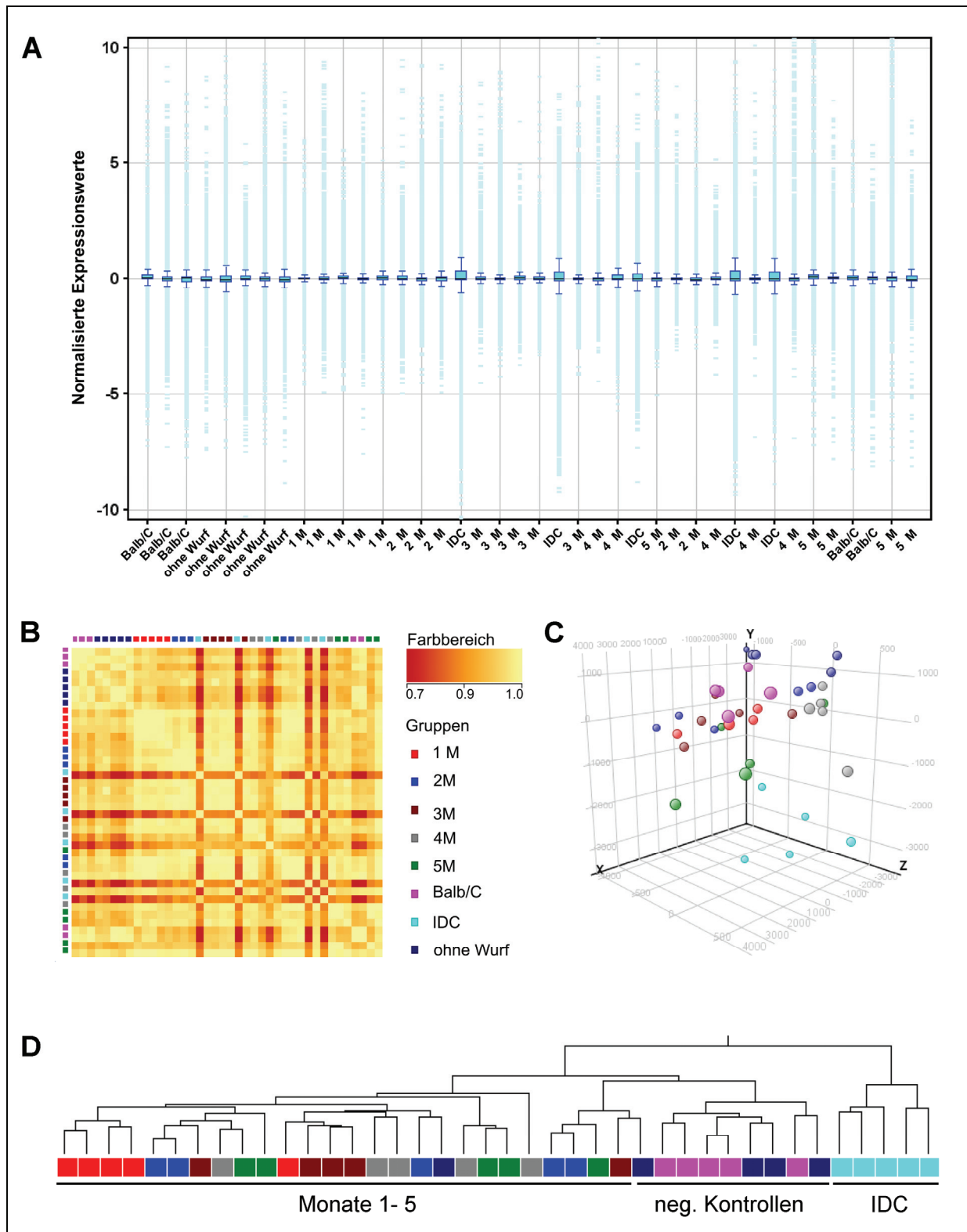


Abb. 12: Qualitätskontrolle der Mouse Genome 430 2.0 GeneChips®. A: Boxplots für die nach der Normalisierung erhaltenen Expressionsdaten. Für jeden Mikroarray ist ein Boxplot abgebildet, welcher sämtliche Gene des GeneChips® umfasst. Die hellblauen Striche markieren Gene (Ausreißer), welche mehr als das 1,5-fache oberhalb bzw. unterhalb der Quartile des Boxplots liegen. B: Korrelations-Plot in Form einer Heatmap. Jeder Chip ist gegen alle anderen und sich selbst aufgetragen. Die Farbe jedes Quadrates der Heatmap ergibt sich aus dem Korrelationskoeffizienten des jeweiligen GeneChip®-Paares. Zur Unterscheidung der verschiedenen Gruppen wurde jeder Gruppe eine spezifische Farbe zugeteilt (siehe B). C: PCA-Plot. Jeder Punkt stellt einen Chip dar. Die Chips jeder untersuchten Maus-Gruppe haben dieselbe Farbe. D: Unsupervised Hierarchical Clustering. Die Gruppen sind anhand des in Abbildung B und C bereits verwendeten Farbschemas zu erkennen.

### 3. 2. 2. Statistische Analyse zur Identifikation von DCIS-Markern

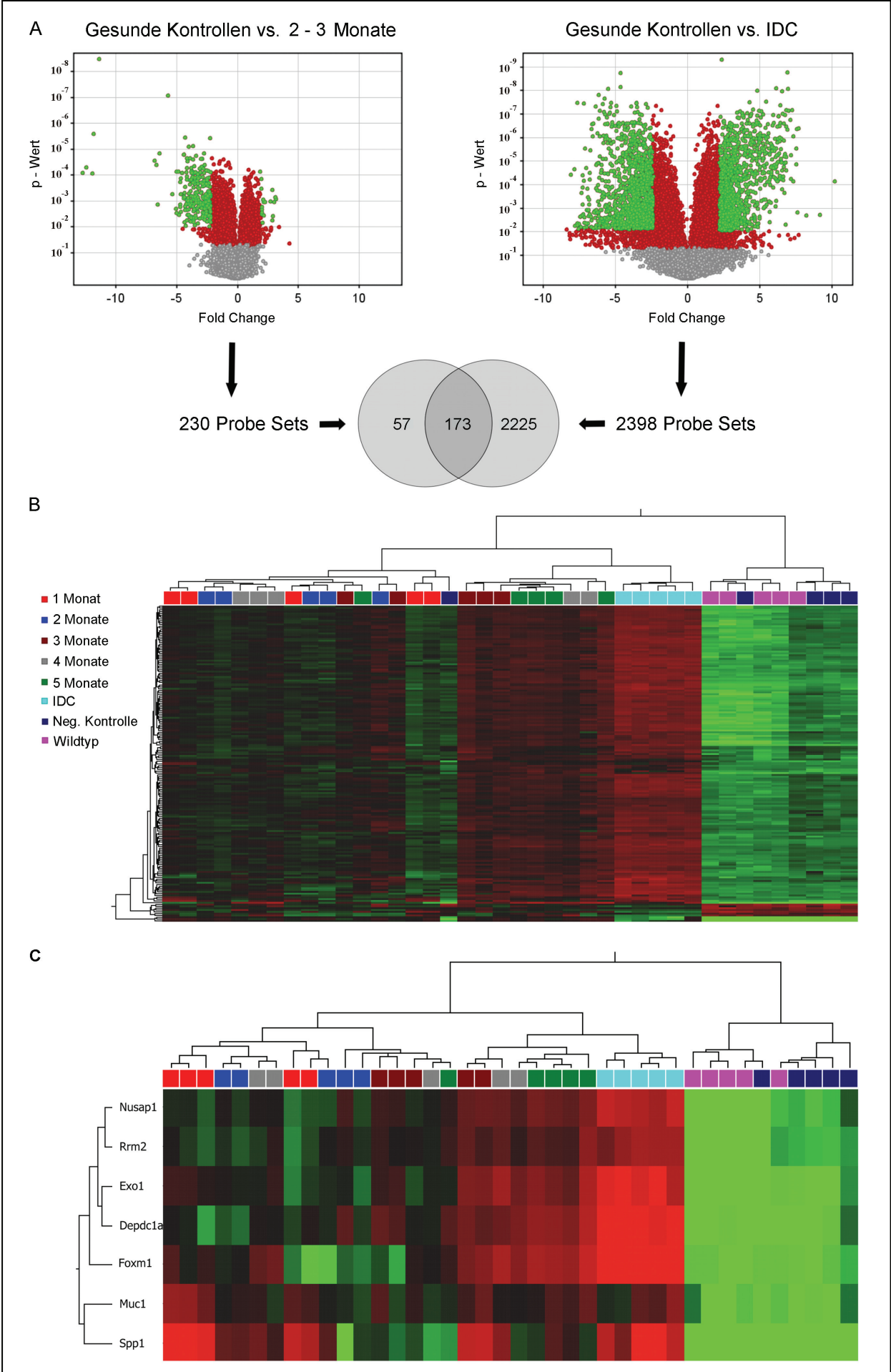
Um Gene zu identifizieren, die bereits sehr früh auf die Entstehung und Progression eines DCIS hinweisen, wurden Proben von WAP-TNP8 Mäusen kurz nach der Laktation (Monat 2-3) mit den Kontrolltieren verglichen. Außerdem wurden Proben von invasiven duktalem Karzinomen (IDC), ebenfalls mit den Negativkontrollen verglichen. Diese Analyse wurde mit Hilfe des Welch-Tests unter Einbeziehung der Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR) durchgeführt. Es wurden ausschließlich Gene berücksichtigt, deren Fold Change über 5 lag und deren p-Wert kleiner 0,01 war. Die Ergebnisse des Welch-Tests wurden in einem Volcano-Plot visualisiert. Gene, die die festgelegten Kriterien erfüllten, wurden als grüne Punkte dargestellt.

Abbildung 13 A zeigt zum einen, den Volcano-Plot für den Vergleich gesunde Kontrollen, gegen die Monate 2-3, zum anderen den Vergleich gesunde Kontrollen gegen invasive Karzinome (IDC). Der Vergleich der Kontrollen mit den Monaten 2-3 zielt darauf ab, Gene zu identifizieren, die schon vergleichsweise früh im Entstehungsprozess des DCIS verstärkt exprimiert werden. An den grün markierten Probe Sets ist zu erkennen, dass sich relativ wenige Probe Sets zwischen den beiden Gruppen unterscheiden. Insgesamt konnten 230 Probe Sets identifiziert werden, die bei einem festgelegten p-Wert von kleiner 0,01 und einem Fold Change über fünf eine veränderte Expression zeigen. Dabei lag die Mehrheit der Punkte auf der linken Seite des Diagramms, was bedeutet, dass die Mehrheit der verändert exprimierten Gene eine erhöhte Expression aufwies. Der Vergleich, gesunde Kontrollen gegen IDC, zeigte deutlich mehr veränderte Probe Sets. Insgesamt wurden unter Verwendung derselben Kriterien (p-Wert 0,01,  $FC > 5$ ) 2398 verändert exprimierte Probe Sets identifiziert. Durch Verwendung eines Venn-Diagramms wurden anschließend Probe Sets identifiziert, welche in beiden Vergleichen auftraten. Diese Probe Sets sind somit tumorspezifisch und für die frühe Entdeckung von DCIS geeignet. Insgesamt waren 173 Probe Sets in beiden Listen vertreten (Anhang, Tab. 15). Diese 173 Probe Sets repräsentieren 140 Gene, welche potenzielle DCIS-Marker darstellen.

Mit Hilfe der identifizierten 173 Probe Sets wurde anschließend ein Supervised Hierarchical Clustering durchgeführt (Abb. 13 B). Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die beiden Negativkontrollen separiert clustern, sie unterscheiden sich, bezüglich der Expression dieser 140 Gene, stark von den anderen Proben. Da die Länge des Dendrogramm-Armes zwischen den Negativkontrollen sehr kurz ist und sich diese sogar teilweise mischen, ist festzustellen, dass sich die beiden Gruppen in ihrer Expression, bezogen auf die ausgewählten 173 Probe

Sets, stark gleichen. Die Expression der ausgewählten 173 Probe Sets ist in den Kontrollgruppen verringert. Die Dendrogramm-Armlänge zwischen dem Kontrollarm und dem Arm der malignen und prämaligen Proben ist sehr lang. Dies unterstreicht die Annahme, dass die prämaligen Gewebe bereits eine deutlich veränderte Expression besitzen und eher den IDC ähneln. Innerhalb des prä-/malignen Arms, gibt es wiederum eine Aufspaltung in 2 Unterarme. Dabei enthält der eine Unterarm die IDCs und einen Großteil der Proben der Monate 3-5, der andere die Proben der Monate 1-2 sowie einige Proben der Monate 3-4. Der Unterarm, welcher die IDC und einige 3, 4 und 5 Monatsproben enthält, unterteilt sich wiederum in einem Arm, welcher ausschließlich die invasiv, duktales Karzinome enthält und einen zweiten, welcher die verschiedenen Proben der Monate 3-5 aufweist. Das Expressionsmuster dieses gesamten Unterarms sieht jedoch sehr einheitlich aus. Die Mehrheit der Probe Sets ist hochreguliert, wobei die Expression bei den invasiven Karzinomen etwas stärker ist, als bei den Proben der Monate 3-5. Der Unterarm, welcher die Proben der Monate 1 und 2 sowie einige der folgenden Monate enthält, zeigt eine starke Durchmischung der Proben und eine weniger starke Veränderung im Expressionsprofil.

Betrachtet man zusammenfassend die Regulierung der Probe Sets insgesamt, erkennt man, dass Probe Sets, welche in den Tumoren eine verstärkte Expression zeigen, auch in den Monaten 3-5 eine deutliche Überexpression aufweisen. Hingegen zeigen die Kontrollen eine deutlich reduzierte Expression, bezüglich der ausgewählten Probe Sets.





**Abb. 13: Statistische Analyse der Mouse Genome 430 2.0 GeneChips®. A: Volcano-Plots zeigen die Ergebnisse der durchgeführten Welch-Tests, unter Verwendung der Benjamini-Hochberg False Discovery Rate. Es wurden zwei Vergleiche durchgeführt, gesunde Kontrollen gegen Proben von Mäusen der Monate 2-3 und gesunde Kontrollen gegen invasive Tumore (IDC). Das Ziel war tumorassoziierte frühe Marker für das DCIS zu identifizieren. Der Volcano-Plot zeigt alle Probe Sets entsprechend ihres p-Wertes und Fold Changes. Dabei zeigt die x-Achse des Volcano-Plots den Fold Change zwischen den beiden Gruppen an, die y-Achse die p-Werte (grün = p-Wert < 0.01, FC > 5; rot = p-Wert < 0.01, aber FC > 5; grau = nicht signifikant). Für den Vergleich der Monate 2-3 gegen die gesunden Kontrollen wurde eine Probe Set Liste von 230 ermittelt. Für den Vergleich IDC gegen die gesunden Kontrollen erfüllten 2398 Probe Sets die erforderlichen Kriterien. Durch Vergleich beider Listen (Venn-Diagramm) wurde eine Kandidatenliste von 173 Probe Sets (= 140 Gene) ermittelt. B: Supervised Hierarchical Clustering unter Verwendung der 173 Probe Set Liste. Die Länge und die Unterteilung der Arme zeigt die Ähnlichkeit der Proben, bezogen auf die 173 Probe Sets, an. Jede Gruppe besteht aus fünf Mäusen. Die angegebenen Monate wurden, ab dem ersten Tag der Laktation berechnet (rot steht für überexprimiert, grün für eine verringerte Expression, schwarz bedeutet keine Veränderung). C: Supervised Hierarchical Clustering unter Verwendung der ausgewählten sieben Kandidatengene. Zur Darstellung des hierarchischen Clusters wurde jeweils das Probe Set mit der am stärksten veränderten Expression ausgewählt.**

### 3. 2. 2. 1. Funktionelle Einordnung differentiell exprimierter Gene mittels GO-Analyse

Für die GO-Analyse wurde wiederum das Programm GeneSpring GX 10.0 verwendet. Hierzu wurde die aus der statistischen Analyse der murinen GeneChips® erhaltene 173 Probe Set Liste verwendet. Die GO-Analyse sollte einen besseren Überblick über einen möglichen funktionellen Zusammenhang der 140 Gene liefern. Außerdem wurde überprüft, ob bestimmte GO-Kategorien in der identifizierten Genliste signifikant überrepräsentiert waren. Dies geschah, indem die einzelnen GO-Kategorien einer Frequenzanalyse unterzogen wurden. Insgesamt wurden innerhalb der 173 Probe Set Liste 76, signifikante GO-Kategorien identifiziert. Eine Übersicht über den prozentualen Anteil sowie über die korrigierten p-Werte, gibt Tabelle 16 (Anhang). Abbildung 14 zeigt die GO-Kategorien der drei Bereiche „biological process“, „cellular component“ und „molecular function“. Der Analyse der GO-Kategorien für den Bereich „biological process“, wurde die meiste Aufmerksamkeit geschenkt. Hierbei ist zu erkennen, dass ein großer Teil der Gene der GO-Kategorie „cellular process“ angehören. Diese GO-Kategorie enthält vor allem GO-Kategorien, welche mit der Zellteilung in Zusammenhang stehen, wie z.B. „cell division“, „cell cycle“, „cell cycle process“ und „chromosome segregation“. Dies sind auch die GO-Kategorien mit den niedrigsten p-Werten. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der DCIS Entstehung Gene, welche mit der Zellteilung im Zusammenhang stehen, von entscheidender Bedeutung sind. Der Bereich „molecular function“ beinhaltet die GO-Kategorien „motor activity“ und „binding“, der Bereich „cellular component“ die GO-Kategorien „cell“, „cell part“, „organelle“, „organelle part“ und „macromolecular complex“. Auch bei der Analyse

der GO-Kategorien des Bereiches „cellular component“ fiel auf, dass sehr häufig Bestandteile des Zytoskeletts signifikant überrepräsentiert waren, welche ebenfalls für die Zellteilung von Bedeutung sind. Somit lässt sich sagen, dass die identifizierten Gene, der 173 Probe Set Liste mehrheitlich mit der Zellteilung assoziiert sind.

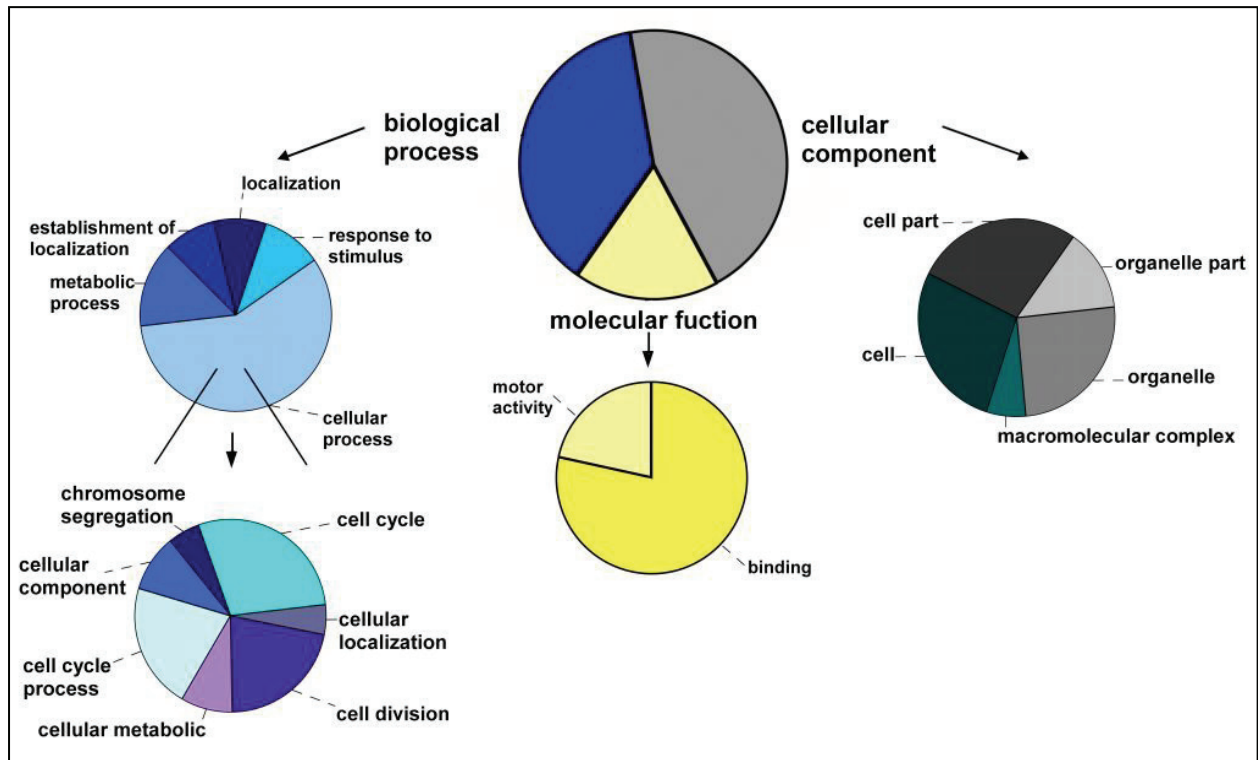


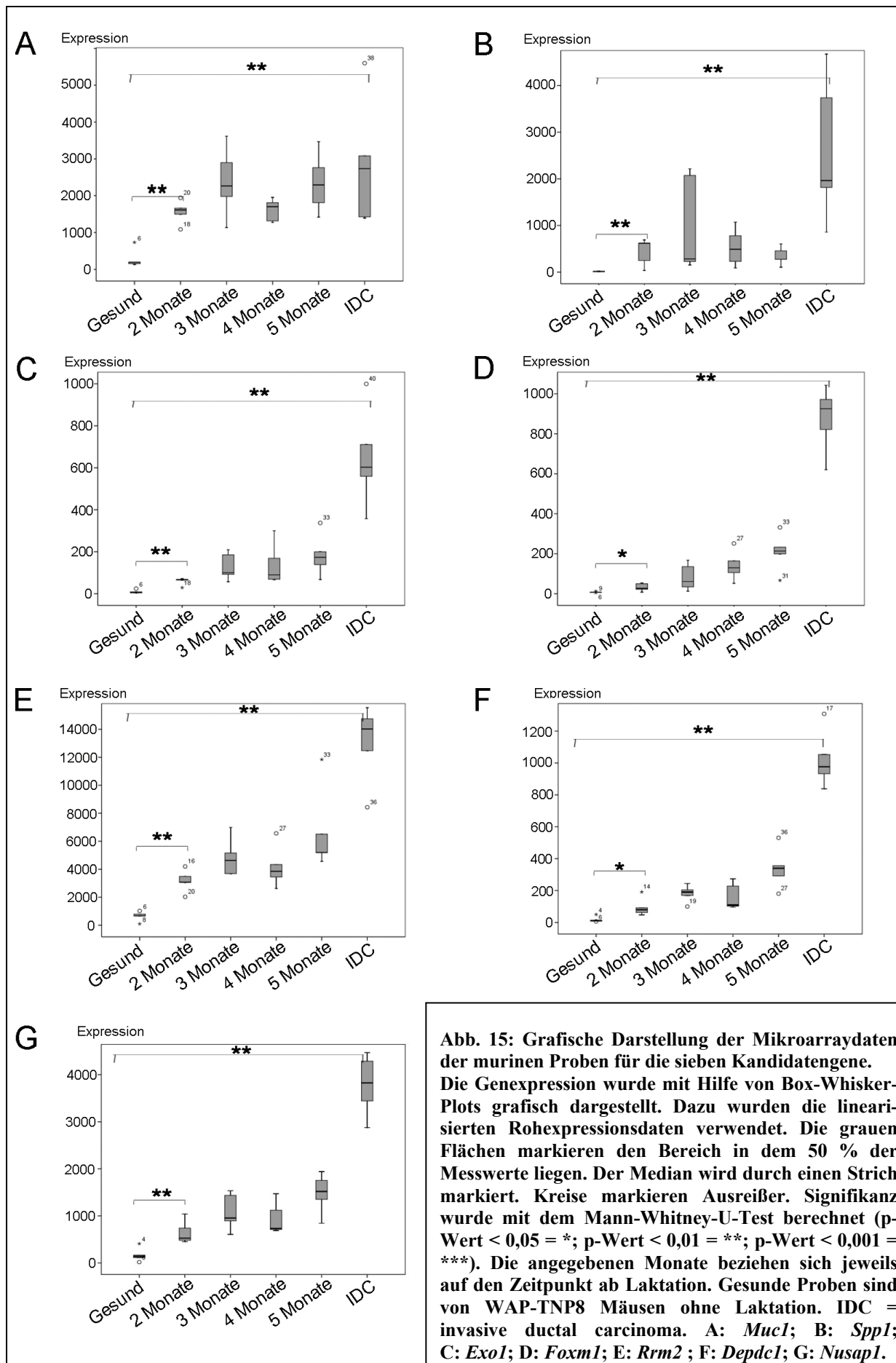
Abb. 14: Ergebnisse der GO-Analyse. Die Tortendiagramme zeigen die prozentualen Anteile der jeweiligen GO-Kategorien. In der oberen Hälfte der Darstellung liegt zentral das Diagramm mit den drei untersuchten Bereichen. Für die Bereiche „molecular function“ und „cellular component“ wurde jeweils ein Diagramm dargestellt. Für den Bereich „biological process“ wurde zusätzlich noch die tiefere Aufgliederung der GO-Kategorie „cellular process“ dargestellt.

### 3. 2. 2. 2. Selektion von DCIS-Markern

Aus den 140 Kandidatengenomen sollten selektiv die vielversprechendsten Gene herausgesucht werden. Dazu wurde die Expression der einzelnen Gruppen (Gesund, Monatsgruppen, IDCs) als Boxplots dargestellt. Hierzu wurden die linearisierten Rohexpressionsdaten verwendet. Von besonderem Interesse waren, wie durch die Analyse der Mikroarrays schon angestrebt, Gene, welche in den Kontrollgruppen eine deutlich geringere Expression zeigten, als in den anderen Gruppen. Die Expression der verschiedenen Monate, bis hin zu den invasiven Tumoren, sollte kontinuierlich ansteigend bzw. rasch ansteigend und dann kontinuierlich hoch bleibend sein. Zusätzlich sollte die Interquartildifferenz der Boxplots möglichst klein sein und wenige oder keine Ausreißer und Extremwerte vorliegen. Insgesamt wurden sieben potenzielle DCIS-Marker identifiziert, deren Expressionsdaten in Abbildung 15 dargestellt wurden. Bei den identifizierten Genen handelt es sich um: *Muc1*, *Spp1*, *Exo1*, *Foxm1*, *Rrm2*, *Depdc1* und *Nusap1*. In Abb. 15 A wurde die Expression von *Mucin 1 (Muc1)* dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Expression von *Muc1* bereits zwei Monate nach Laktationsbeginn signifikant erhöht war und dass die Expression mit voranschreitender Zeit weiter leicht zunahm. Dies ist auch anhand der in Tabelle 9 angegebenen Fold Changes zu erkennen. So ist die Expression nach 2-3 Monaten um das 7,5-fache erhöht, in den invasiven Tumoren um das 10,2-fache. In Abbildung 15 B ist zu sehen, dass die Expression von *Osteopontin (Spp1)* ebenfalls bereits in der 2 Monats-Gruppe signifikant erhöht war, jedoch war die Expression in den IDC um ein Vielfaches höher. Das belegen die in Tabelle 9 angegebenen Fold Changes. Die Expression von *Spp1* in der 2-3 Monats-Gruppe war um den Faktor 25,6 erhöht, in den IDC um den Faktor 142. Die Darstellungen der Expressionswerte von *Exo1 (Exonuklease I)* (Abb. 15 C) und *Foxm1 (forkhead box M1)* zeigte ein ähnliches Muster wie das von *Spp1*. Die Expression war nach 2-3 Monaten signifikant um das 14,6-fache (*Exo1*) bzw. um das 5,7-fache (*Foxm1*) erhöht, die IDCs weisen eine um 107,5-fach (*Exo1*) bzw. 122,7-fach (*Foxm1*) erhöhte Expression auf (Tab. 9). In Abbildung 15 E sind die Expressionswerte von *Rrm2 (ribonucleotide reductase M2 polypeptide)* dargestellt. Die Expression der Proben der Monate 2-3 war signifikant um das 11,5-fache erhöht, die Expression der invasiven Karzinome war um den Faktor 39 erhöht (Tab. 9). Die Expression von *Depdc1 (DEP domain containing 1)* in den verschiedenen Gruppen ist in Abbildung 15 F dargestellt. Es war auch hier ein deutlicher Anstieg der Expression in der 2 Monats-Gruppe zu sehen (11,5-fach). Die Expression von *Depdc1* in den invasiven Karzinomen war auffällig hoch (96,5-fach erhöht). Abbildung 15 G zeigt den Anstieg der Expression von *Nusap1 (nucleolar and spindle*

*associated protein 1*) in den prämaligen und malignen Geweben. So war die Expression nach 2-3 Monaten um das 11,6-fache erhöht, in den IDC um das 54,4-fache. Zusammenfassend zeigen die Abbildungen deutlich, welches Potential die identifizierten Gene haben, da sie alle bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt, signifikant überexprimiert sind. Zu diesem Zeitpunkt waren histologisch nur wenige DCIS nachweisbar.

Die Expression der sieben Kandidatengene wurden zusätzlich in einem hierarchischen Clustering (Dendrogramm) dargestellt (Abb. 13 C). Das Dendrogramm spaltet sich deutlich in zwei Arme auf, wobei der eine Arm die Kontrolltiere enthält und der andere Arm die verbleibenden Proben. Folglich ist es möglich, mit Hilfe dieser sieben Gene, maligne von gesunden Geweben zu unterscheiden. Der Arm, welcher sämtliche malignen und prämaligen Proben enthält, ist wiederum in zwei Unterarme aufgespalten. Dabei enthält der eine Unterarm die IDCs und einem Teil der Proben der Monate 3-5, der andere sämtliche Proben der Monate 1-2 sowie Proben der Monate 3-4. Wie auch in dem hierarchischen Clustering mit der 173 Probe Set Liste, bilden die IDCs innerhalb des erst genannten Unterarms, eine eigene Gruppe. Anhand des Farbcodes ist zu erkennen, dass die Expression der sieben Kandidatengene in dem Unterarm, welcher auch die IDCs enthält, stark erhöht ist. Der Unterarm, welcher die Proben der Monate 1 und 2 sowie einige Proben der folgenden Monate enthält, zeigt eine leichte Durchmischung der Proben, wobei häufig Proben des gleichen Monats zusammen clustern. Die Expression ist in diesem Unterarm geringer, als in dem Arm der IDCs. Die Expression der Kandidatengene in den Kontrollgruppen ist stark herabgesetzt. Insgesamt ist zu erkennen, dass sich die beiden hierarchischen Clusterings (Abb. 13 B + C) sehr ähneln. Dies zeigt, dass die ausgewählten sieben Gene ebenso gut zwischen den gesunden und den malignen Proben unterscheiden, wie die 140 Gene der 173 Probe Set Liste.



**Abb. 15: Grafische Darstellung der Mikroarraydaten der murinen Proben für die sieben Kandidatengene. Die Genexpression wurde mit Hilfe von Box-Whisker-Plots grafisch dargestellt. Dazu wurden die linearisierten Rohexpressionsdaten verwendet. Die grauen Flächen markieren den Bereich in dem 50 % der Messwerte liegen. Der Median wird durch einen Strich markiert. Kreise markieren Ausreißer. Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (p-Wert < 0,05 = \*; p-Wert < 0,01 = \*\*; p-Wert < 0,001 = \*\*\*). Die angegebenen Monate beziehen sich jeweils auf den Zeitpunkt ab Laktation. Gesunde Proben sind von WAP-TNP8 Mäusen ohne Laktation. IDC = invasive ductal carcinoma. A: *Mucl1*; B: *Spp1*; C: *Exo1*; D: *Foxm1*; E: *Rrm2*; F: *Depdc1*; G: *Nusap1*.**

Tab. 9: p-Werte und Fold Change der sieben Kandidatengene in den Mouse Genome 430 2.0 GeneChips®. Wenn für ein Gen mehrere Probe Sets vorhanden waren, wurde ausschließlich das Probe Set mit der am stärksten veränderten Expression aufgelistet. Der korrigierte p-Wert ergibt sich nach der Benjamini-Hochberg False Discovery Rate.

	Gen	Probe Set ID	p-Wert	Korr. p-Wert	Fold Change
Kontrollen vs. 2 - 3 M	<i>Nusap1</i>	1416309_at	$4,4 \times 10^{-05}$	$2,4 \times 10^{-03}$	11,6
	<i>Exo1</i>	1418026_at	$9,6 \times 10^{-09}$	$2,4 \times 10^{-05}$	14,6
	<i>Depdc1a</i>	1424292_at	$2,9 \times 10^{-08}$	$4,4 \times 10^{-05}$	11,5
	<i>Rrm2</i>	1434437_x_at	$1,8 \times 10^{-05}$	$1,4 \times 10^{-03}$	11,5
	<i>Muc1</i>	1449199_at	$2,1 \times 10^{-07}$	$1,2 \times 10^{-04}$	7,5
	<i>Spp1</i>	1449254_at	$3,4 \times 10^{-06}$	$5,9 \times 10^{-04}$	25,6
	<i>Foxm1</i>	1453107_s_at	$2,1 \times 10^{-04}$	$6,3 \times 10^{-03}$	5,7
Kontrollen vs. IDC	<i>Nusap1</i>	1416309_at	$8,8 \times 10^{-07}$	$3,7 \times 10^{-05}$	54,4
	<i>Exo1</i>	1418026_at	$1,3 \times 10^{-10}$	$1,1 \times 10^{-07}$	107,5
	<i>Depdc1a</i>	1424292_at	$1,1 \times 10^{-10}$	$1,0 \times 10^{-07}$	96,5
	<i>Rrm2</i>	1434437_x_at	$3,8 \times 10^{-07}$	$2,0 \times 10^{-05}$	39,0
	<i>Muc1</i>	1449199_at	$7,2 \times 10^{-05}$	$1,1 \times 10^{-03}$	10,2
	<i>Spp1</i>	1449254_at	$1,6 \times 10^{-06}$	$5,7 \times 10^{-05}$	141,8
	<i>Foxm1</i>	1453107_s_at	$1,3 \times 10^{-12}$	$8,4 \times 10^{-09}$	122,7

Tabelle 10 zeigt die GO-Kategorien für die sieben ausgewählten Kandidatengene. Einige der identifizierten Kandidatengene sind im Zellkern lokalisiert (*Muc1*, *Foxm1*, *Exo1*, *Depdc1*, *Nusap1*), andere befinden sich extrazellulär (*Spp1*, *Muc1*) oder im Zytoplasma (*Muc1*, *Rrm2*, *Nusap1*). Für manche der sieben Gene sind auch mehrere Lokalisationen angegeben (*Muc1*, *Nusap1*). Betrachtet man die Funktionen sowie die biologischen Prozesse, an denen die Gene beteiligt sind, zeigt sich ein sehr heterogenes Bild. Grob zusammengefasst kann man sagen, dass *Rrm2*, *Foxm1* und *Nusap1* an der Zellteilung beteiligt sind, wohingegen *Muc1* und *Spp1* in der Hormon- bzw. der Knochenbildung aktiv sind. *Depdc1* wird mit Signalkaskaden in Verbindung gebracht.

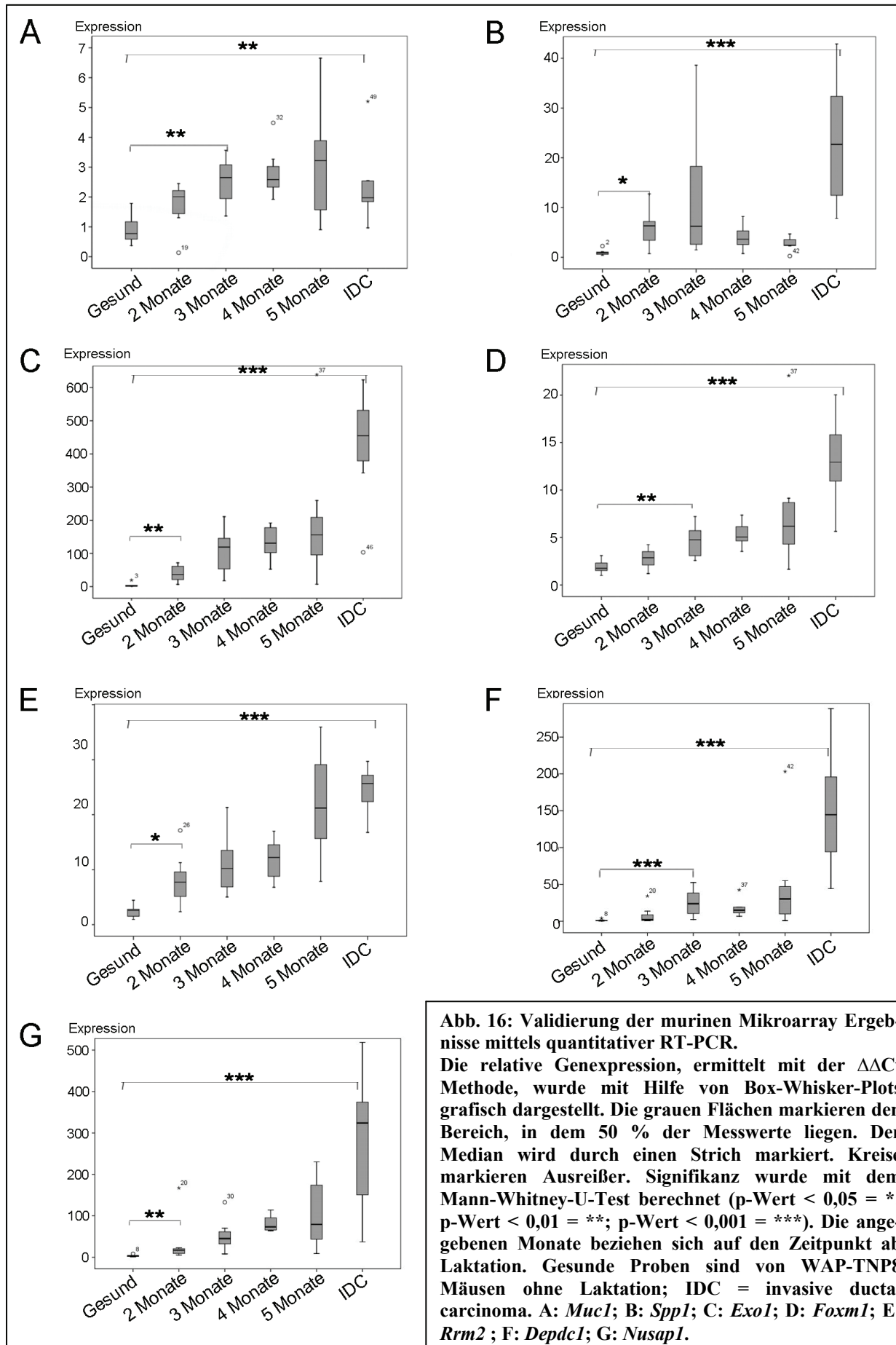
**Tab. 10: Überblick über die GO-Kategorien der sieben Kandidatengene. Die GO-Kategorien „biological process“ und „molecular function“ wurden in einer Spalte zusammengefasst.**

<b>Symbol</b>	<b>Name</b>	<b>Go terms: biological process &amp; molecular function</b>	<b>GO terms: cellular component</b>
<i>Muc1</i>	mucin 1, cell surface associated	hormone activity	extracellular region, nucleus, cytoplasm, integral to membrane
<i>Spp1</i>	secreted phosphoprotein 1	ossification, cell adhesion; cytokine activity, protein binding	extracellular region
<i>Rrm2</i>	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	DNA replication, deoxyribonucleoside diphosphate metabolic process, oxidation reduction; ribonucleoside-diphosphate reductase activity, iron ion binding, protein binding, oxidoreductase activity	cytoplasm, cytosol
<i>Foxm1</i>	forkhead box M1	regulation of transcription, DNA-dependent, vasculogenesis, positive regulation of cell proliferation; DNA binding, transcription factor activity, protein binding	nucleus
<i>Exo1</i>	exonuclease 1	DNA repair, mismatch repair, DNA recombination, immune response, meiosis; DNA binding, catalytic activity, exonuclease activity, endonuclease activity, ribonuclease H activity, protein binding, hydrolase activity	nucleus
<i>Depdc1</i>	DEP domain containing 1	signal transduction, intracellular signaling cascade; GTPase activator activity	intracellular, nucleus
<i>Nusap1</i>	nucleolar and spindle associated protein 1	mitotic sister chromatid segregation, cell cycle, mitosis, establishment of mitotic spindle localization, cell division; DNA binding, microtubule binding	nucleus, cytoplasm, microtubule

### 3. 2. 3. Validierung der murinen GeneChip® Ergebnisse mittels qRT-PCR

Zur Validierung der in den Mikroarray Experimenten gefundenen Ergebnisse, wurde die Expression der sieben Kandidatengene mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan) untersucht. Zur Veranschaulichung der Expression der sieben Gene in den verschiedenen Gruppen (Gesund, unterschiedliche Zeitpunkte und IDC), wurde diese grafisch dargestellt (Abb. 16). Die relative Expression wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$  Methode berechnet und ist auf der y-Achse aufgetragen. Bei der Expression von *Muc1* (Abb. 16 A) ist zu erkennen, dass nach 3 Monaten eine signifikant erhöhte Expression vorliegt, diese steigt bis zum Monat 5 kontinuierlich an und fällt in den IDC wieder auf das Expressionsniveau der 2 Monats-Gruppe. Die Fold Changes entsprechen denen der Mikroarray Ergebnisse und sind in Tabelle 11 angegeben. Das mittels qRT-PCR erhaltene Expressionsprofil für *Spp1* ist mit dem der Mikroarrays identisch (Abb. 16 B), auch die Fold Changes sind vergleichbar (Tab. 11). Die für das Gen *Exo1* ermittelten Werte ähneln stark denen der Mikroarray Analyse (Abb. 16 C), wobei die sich ergebenden Fold Changes mit einer 37-fachen Erhöhung in der Gruppe 2-3 Monate und einer 276,5-fachen Erhöhung in den IDC, je im Vergleich zu den Negativkontrollen, deutlich höher sind. *Foxm1* zeigt in der qRT-PCR einen nicht so kräftigen Anstieg, wie in der Mikroarray Analyse zu beobachten war (Abb. 16 D). Jedoch ist die Expression nach 2-3 Monaten signifikant erhöht. Die Expression von *Rrm2* (Abb. 16 E) steigt in den mittels qRT-PCR ermittelten Werten ebenfalls etwas geringer an, als in den mittels Mikroarray ermittelten Werten. Dennoch war die Expression nach 2 Monaten signifikant um das 4,6-fache erhöht. Für das Gen *Depdc1* wurde in der qRT-PCR ein stärkerer Anstieg der Expression ermittelt, als in der Analyse der Mikroarrays (Abb. 16 F). So ist die Expression im Vergleich zu den Kontrollen in der 2-3 Monats Gruppe, bereits um das 21,3-fache erhöht, in den invasiven Karzinomen ist die Expression sogar um das 292,7-fache erhöht (Tab. 11). Auch die für *Nusap1* ermittelten Werte übersteigen die Expressionswerte der Mikroarray Analyse (Abb. 16 G). In der Gruppe der Proben der Monate 2-3 ist die Expression identisch mit den Werten der Mikroarray Analyse, wobei aber die in den IDCs ermittelte Expression in der qRT-PCR eine 159-fache Erhöhung zeigte. Zusammenfassend kann man sagen, dass die durch die quantitative RT-PCR ermittelten Expressionswerte die mittels GeneChip®-Analyse gefundenen Ergebnisse widerspiegeln.





**Abb. 16: Validierung der murinen Mikroarray Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR.**

Die relative Genexpression, ermittelt mit der  $\Delta\Delta Ct$  Methode, wurde mit Hilfe von Box-Whisker-Plots grafisch dargestellt. Die grauen Flächen markieren den Bereich, in dem 50 % der Messwerte liegen. Der Median wird durch einen Strich markiert. Kreise markieren Ausreißer. Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (p-Wert < 0,05 = \*; p-Wert < 0,01 = \*\*; p-Wert < 0,001 = \*\*\*). Die angegebenen Monate beziehen sich auf den Zeitpunkt ab Laktation. Gesunde Proben sind von WAP-TNP8 Mäusen ohne Laktation; IDC = invasive ductal carcinoma. A: *Muc1*; B: *Spp1*; C: *Exo1*; D: *Foxm1*; E: *Rrm2*; F: *Depdc1*; G: *Nusap1*.

**Tab. 11: p-Werte und Fold Changes der Taqman Untersuchung der murinen Proben. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des durchgeführten Vergleichs (t-Test) an. Der Fold Change steht für die x-fache Veränderung der Genexpression zwischen den verglichenen Gruppen.**

	Gen	p-Wert	Fold Change
<b>Kontrollen vs. 2 - 3 M</b>	<i>Muc1</i>	$1,5 \times 10^{-06}$	6,0
	<i>Spp1</i>	$2,6 \times 10^{-03}$	18,5
	<i>Rrm2</i>	$3,0 \times 10^{-05}$	4,6
	<i>Foxm1</i>	$3,3 \times 10^{-04}$	2,3
	<i>Exo1</i>	$3,2 \times 10^{-04}$	37,1
	<i>Depdc1</i>	$2,8 \times 10^{-03}$	21,3
	<i>Nusap1</i>	$3,5 \times 10^{-03}$	11,6
<b>Kontrollen vs. IDC</b>	<i>Muc1</i>	$1,5 \times 10^{-04}$	5,7
	<i>Spp1</i>	$2,4 \times 10^{-06}$	122,8
	<i>Rrm2</i>	$3,0 \times 10^{-05}$	15,2
	<i>Foxm1</i>	$6,0 \times 10^{-08}$	9,5
	<i>Exo1</i>	$6,6 \times 10^{-08}$	276,5
	<i>Depdc1</i>	$3,8 \times 10^{-06}$	292,7
	<i>Nusap1</i>	$1,2 \times 10^{-05}$	159,0

### 3. 3. Genexpressionsanalyse der humanen Proben

Der zweite Teil des Projektes bestand in der Analyse humaner Gewebe. Hierbei wurden mit Hilfe von Affymetrix U133 Plus 2.0 Mikroarrays neun DCIS, fünf invasiv duktales Tumore und fünf Proben gesundes Brustgewebe untersucht.

#### 3. 3. 1. Qualitätskontrolle der Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips®

Die Qualitätskontrollen wurden analog der Analyse der murinen GeneChips® durchgeführt. Die Affymetrix Qualitäts-Kontrollmaße sind im Anhang in Tabelle 17 aufgeführt. Der Background betrug bei allen humanen GeneChips® etwas 50. Dies entspricht den von Affymetrix angegebenen Vorgaben, ferner waren die Werte sehr einheitlich. Auch RawQ und der Scaling Factor lagen im vorgegebenen Bereich. Die für die internen Kontrollen *ACTB* und *GAPDH* ermittelten 3'- zu 5'-Verhältnisse lagen zum großen Teil, wie angegeben, unter drei. Allerdings war bei einigen GeneChips® für *ACTB* dieser Wert leicht erhöht und zeigte Werte

zwischen 4 und 6. Die weiteren Qualitätskontrollen erfolgten wiederum mit Hilfe des Programms GeneSpring GX 10.0 der Firma Agilent.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der mittels der Software GeneSpring GX 10.0 durchgeführten Qualitätskontrolle dargestellt. Zuerst wurde überprüft, ob die Normalisierung die Daten entsprechend vereinheitlicht hat. Dazu wurden Boxplots aller humanen GeneChips® mit der Expression aller Gene dargestellt (Abb. 17 A). Es ist zu erkennen, dass die Boxplots sehr uniform sind und eine sehr geringe Interquartildifferenz aufweisen. Dies bedeutet, dass die Normalisierung erfolgreich war und die Mikroarray miteinander verglichen werden können.

Der Korrelationsplot (Abb. 17 B) zeigt die für jedes GeneChip®-Paar errechneten Korrelationskoeffizienten als Heatmap. Anhand des angegebenen Farbcodes kann man den Korrelationskoeffizienten ablesen. Hierbei ist zu erkennen, dass die gesunden Proben minimal mit den DCIS und den invasiven Tumoren korrelieren (niedrigerer Korrelationskoeffizient), sie korrelieren aber sehr gut untereinander (hoher Korrelationskoeffizient). Somit kann man sagen, dass die gesunden Proben sich in ihrer Expression stark ähneln. Da die Korrelation der gesunden Proben mit den DCIS Proben relativ schwach ist, lässt sich daraus schließen, dass die DCIS in ihrer Expression eher den IDC ähneln, als den gesunden Geweben. Dies wird durch die vergleichsweise hohen Korrelationskoeffizienten zwischen den DCIS und den IDC bestärkt.

Im PCA-Plot (Abb. 17 C) liegen die einzelnen Gruppen deutlich voneinander separiert, dies entspricht der Erwartung dieser Analyse. So liegen Chips mit einer ähnlichen Expression in räumlicher Nähe zueinander, wohingegen Chips mit unterschiedlicher Expression eher voneinander entfernt liegen. Abbildung 17 D zeigt das Unsupervised Hierarchical Clustering der humanen GeneChips®. Dabei spaltet sich das Dendrogramm in zwei Arme auf. Der eine Arm enthält, mit einer Ausnahme, alle gesunden Proben, wohingegen der zweite Arm die malignen Proben umfasst. Dieser Arm spaltet sich sogleich in zwei Unterarme auf, wobei einer sämtliche invasiven Proben sowie vier DCIS Proben enthält, der andere enthält die restlichen fünf DCIS Proben sowie eine gesunde Kontrolle.

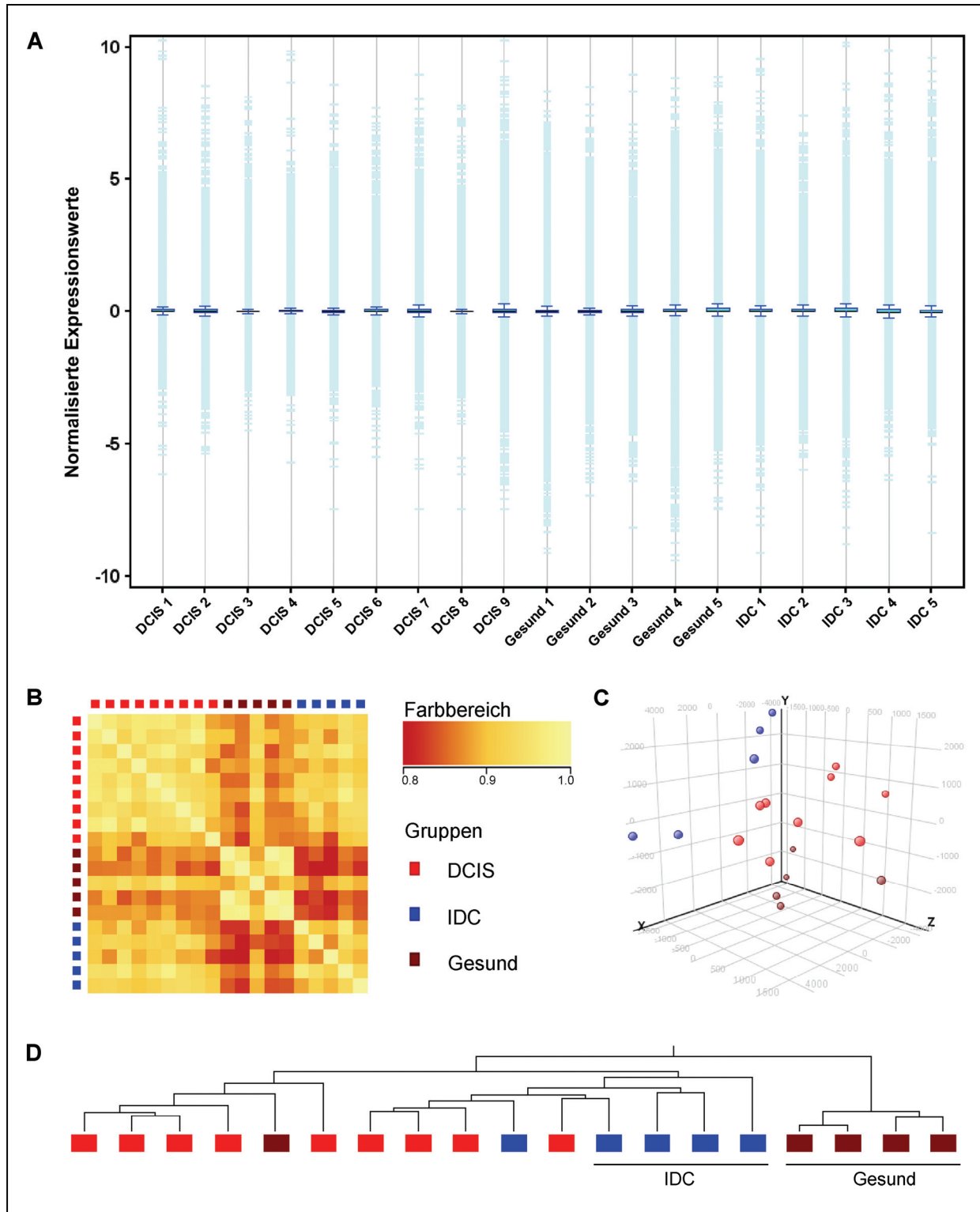


Abb. 17: Qualitätskontrolle der Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips®. A: Expressionswerte nach Normalisierung. Die Expressionswerte sämtliche Gene aller Mikroarrays sind in Form eines Boxplots abgebildet. In hellblau sind Gene dargestellt, die mehr als das 1,5-fache oberhalb bzw. unterhalb der Quartile des Boxplots liegen (sog. Ausreißer). B: Korrelations-Plot in Form einer Heatmap. Jeder Chip ist gegen alle anderen und sich selbst aufgetragen. Die Farben ergeben sich aus dem Korrelationskoeffizienten des jeweiligen GeneChip®-Paars. Der entsprechende Korrelationskoeffizient ist am dargestellten Farbbereich abzulesen. C: PCA-Plot. Die GeneChip® liegen entsprechend ihrer Expression in einem n-dimensionalen Raum. Die Chips jeder untersuchten Gruppe von Proben (Gesund, DCIS, IDC) haben dieselbe Farbe. D: Unsupervised Hierarchical Clustering der humanen U133 Plus 2.0 Chips. Farbschema der untersuchten Gruppen wie in den Abbildungen B und C.

### 3. 3. 2. Statistische Analyse der Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips®

Zur Überprüfung der im Mausmodell identifizierten potentiellen DCIS-Marker, wurden diese in den humanen Proben näher betrachtet. Abbildung 18 A zeigt einen Volcano-Plot für den Vergleich gesunde Gewebe gegen DCIS. Alle rot markierten Punkte sind signifikant verändert und haben einen Fold Change von mindestens 1,5. Die grün markierten Punkte sind die im Mausmodell identifizierten potentiellen DCIS-Marker. Der Volcano-Plot zeigt deutlich, dass die identifizierten DCIS-Marker in den humanen DCIS Proben, eine signifikant erhöhte Expression aufweisen.

Zusätzlich wurde mit den sieben DCIS-Markern ein Supervised Hierarchical Clustering durchgeführt (Abb. 18 B). Hierbei ist zu erkennen, dass mit Hilfe der identifizierten DCIS-Marker, eine deutliche Unterscheidung zwischen gesundem Gewebe und malignem Gewebe möglich ist. Die gesunden Gewebe bilden einen separaten Arm im Dendrogramm. Die Länge des Abstandes zum Knotenpunkt dieses Arms ist sehr lang, was anzeigt, dass die gesunden Gewebe sich deutlich von den malignen Geweben unterscheiden. Der zweite Arm des Dendrogramms spaltet sich in eine größere Gruppe auf, welche beinahe alle malignen Gewebe enthält und in eine kleinere Gruppe, welche nur zwei DCIS Proben enthält. Weshalb diese beiden DCIS Proben ein leicht abweichendes Expressionsprofil zeigen, konnte nicht ermittelt werden. Da sie aber im „malignen Arm“ clustern, ist dies durchaus vertretbar. In der großen Gruppe, welche die Mehrheit der malignen Gewebe beinhaltet, mischen sich die IDC und die DCIS Proben. Auch anhand des Farbcodes ist zu sehen, dass die Expression der malignen Gewebe, bezogen auf die identifizierten DCIS-Marker, relativ einheitlich ist.

Die Expression der sieben DCIS-Marker in den drei Gruppen (gesund, DCIS, IDC) wurde außerdem anhand von Boxplots dargestellt (Abb. 19). Es wurden die linearisierten Rohexpressionsdaten abgebildet. Die Expression der sieben Marker ist in allen DCIS Proben sowie in allen invasiven Karzinomen signifikant erhöht. Die Expression der sieben DCIS-Marker in den gesunden Proben ist deutlich geringer. Außerdem zeigen die gesunden Proben ein sehr einheitliches Expressionsprofil, welches an der geringen Interquartildifferenz der Boxplots zu erkennen ist. Dies stimmt mit der bereits im Korrelations-Plots festgestellten starken Korrelation der gesunden Proben überein. Bei der Expression für das Gen *MUC1* ist zu erkennen, dass die Expression in den DCIS Proben sogar die der invasiven Karzinome übertrifft, jedoch ist *MUC1* in beiden Gruppen mit einem Fold Change von 39,7 bzw. 22,7 stark überexprimiert (Abb. 19 A). Bei den übrigen sechs Genen ist die Expression in den DCIS Proben entweder geringer oder gleich der der invasiven Karzinome (Abb. 19 B - G). Die p-Werte sowie die Fold Changes sind in Tabelle 12 angegeben.

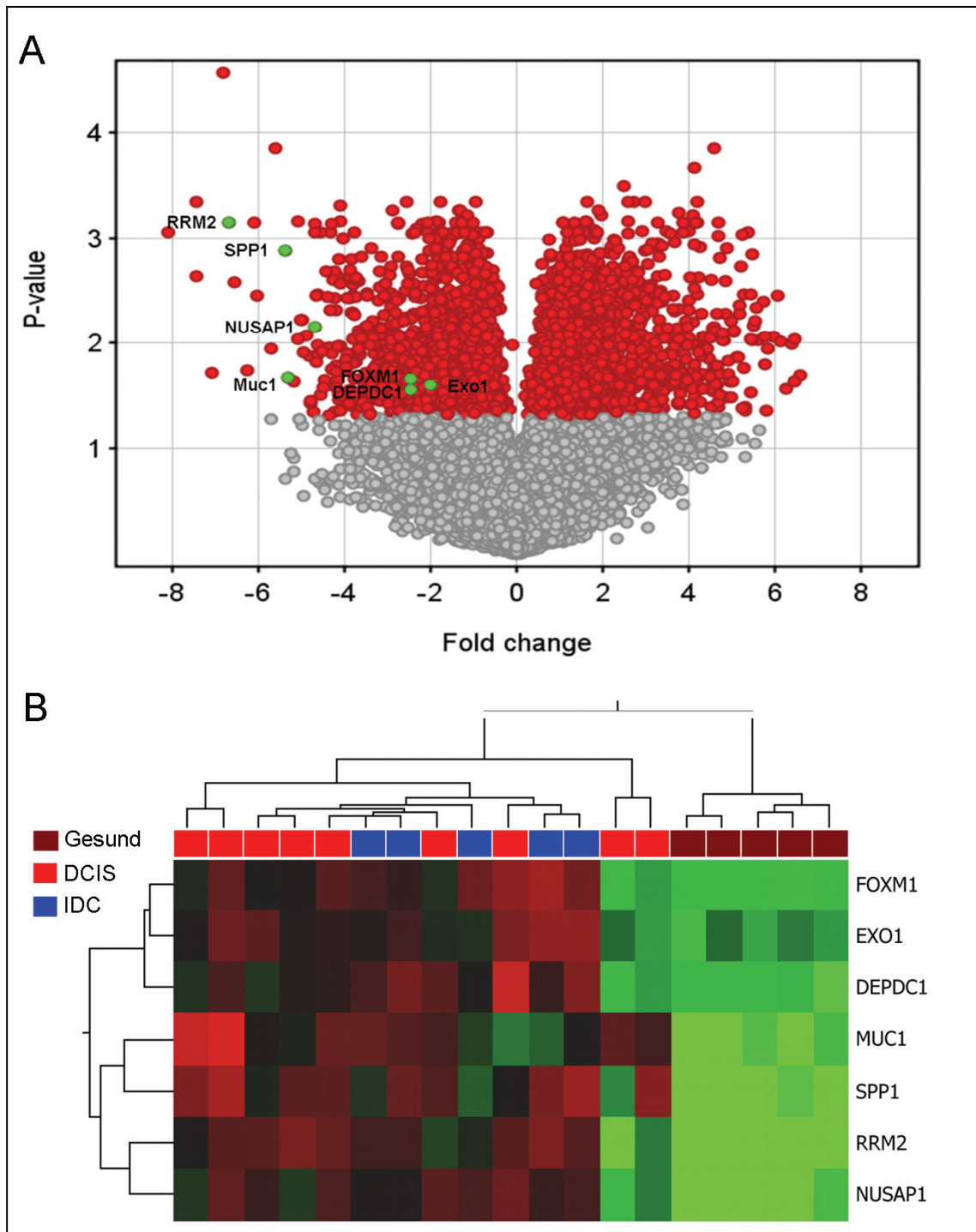
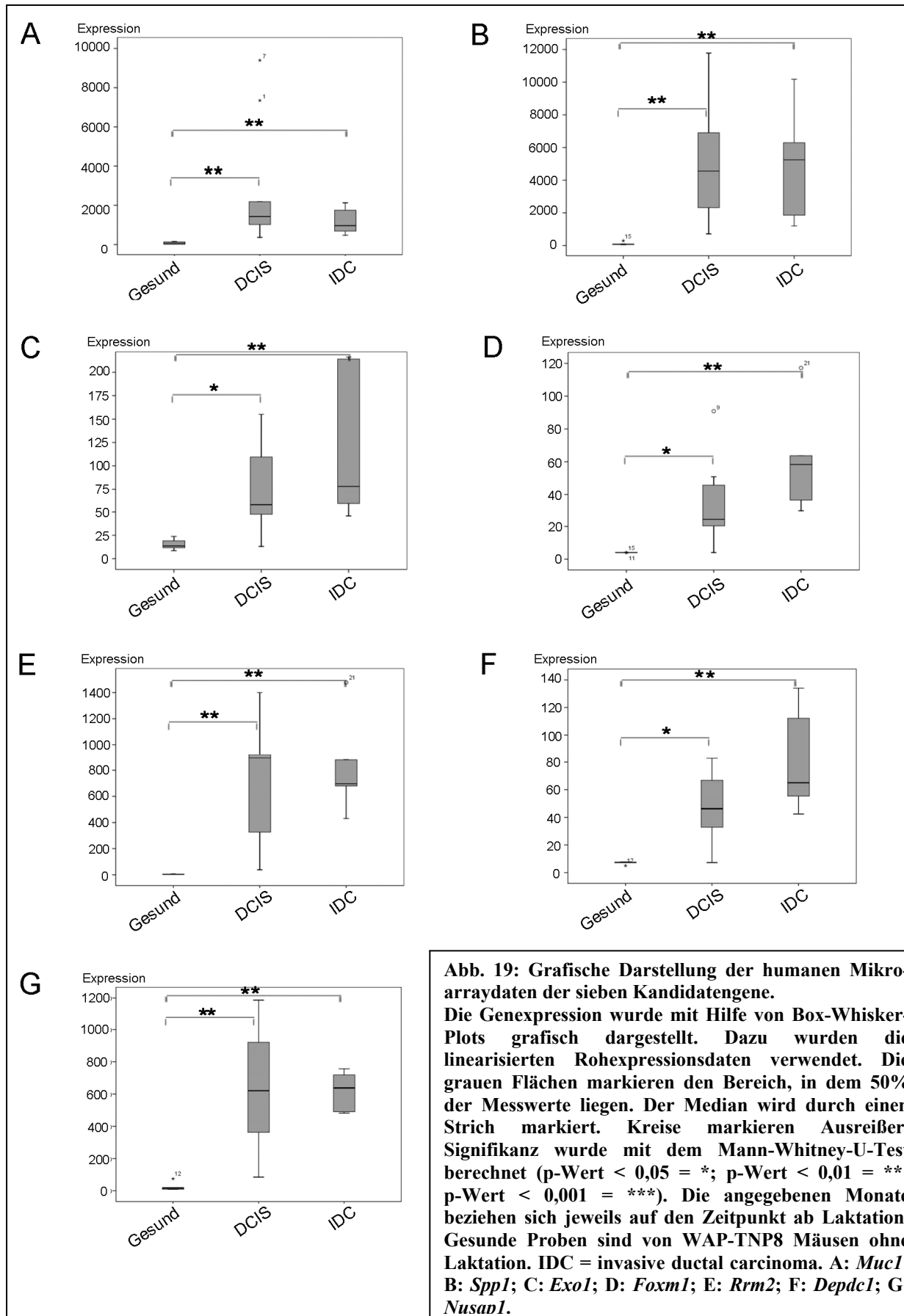


Abb. 18: Statistische Auswertung der Mikroarrays der humanen Proben. A: Grafische Darstellung eines t-Tests (Volcano-Plot), wobei die DCIS Proben mit den gesunden Geweben verglichen wurden. Im Volcano-Plot werden die Probe Sets nach ihrem jeweiligen p-Wert und ihrem Fold Change grafisch dargestellt, graue Punkte zeigen nicht signifikante Probe Sets, rot Punkte sind signifikante Probe Sets, in grün sind die ausgewählten Kandidatengene markiert. B: Hierarchisches Clustering unter Verwendung der sieben identifizierten DCIS-Marker (Supervised). Im hierarchischen Cluster steht jede Reihe für ein Gen und jede Spalte für eine Gewebeprobe. Mittels der identifizierten DCIS-Marker können gesunde von malignen Proben unterschieden werden. Rot, erhöhte Expression; Grün, verringerte Expression; Schwarz, unverändert.



**Abb. 19: Grafische Darstellung der humanen Mikroarraydaten der sieben Kandidatengene.** Die Genexpression wurde mit Hilfe von Box-Whisker-Plots grafisch dargestellt. Dazu wurden die linearisierten Rohexpressionsdaten verwendet. Die grauen Flächen markieren den Bereich, in dem 50% der Messwerte liegen. Der Median wird durch einen Strich markiert. Kreise markieren Ausreißer. Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (p-Wert < 0,05 = \*; p-Wert < 0,01 = \*\*; p-Wert < 0,001 = \*\*\*). Die angegebenen Monate beziehen sich jeweils auf den Zeitpunkt ab Laktation. Gesunde Proben sind von WAP-TNP8 Mäusen ohne Laktation. IDC = invasive ductal carcinoma. A: *Mucl1*; B: *Spp1*; C: *Exo1*; D: *Foxm1*; E: *Rrm2*; F: *Depdc1*; G: *Nusap1*.

**Tab. 12: p-Werte und Fold Change der sieben DCIS-Marker in den Human Genome U133 Plus 2.0 GeneChips®. Wenn für ein Gen mehrere Probe Sets vorhanden waren, wurde ausschließlich das Probe Set mit der am stärksten veränderten Expression aufgelistet. Der korrigierte p-Wert ergibt sich nach der Benjamini-Hochberg False Discovery Rate.**

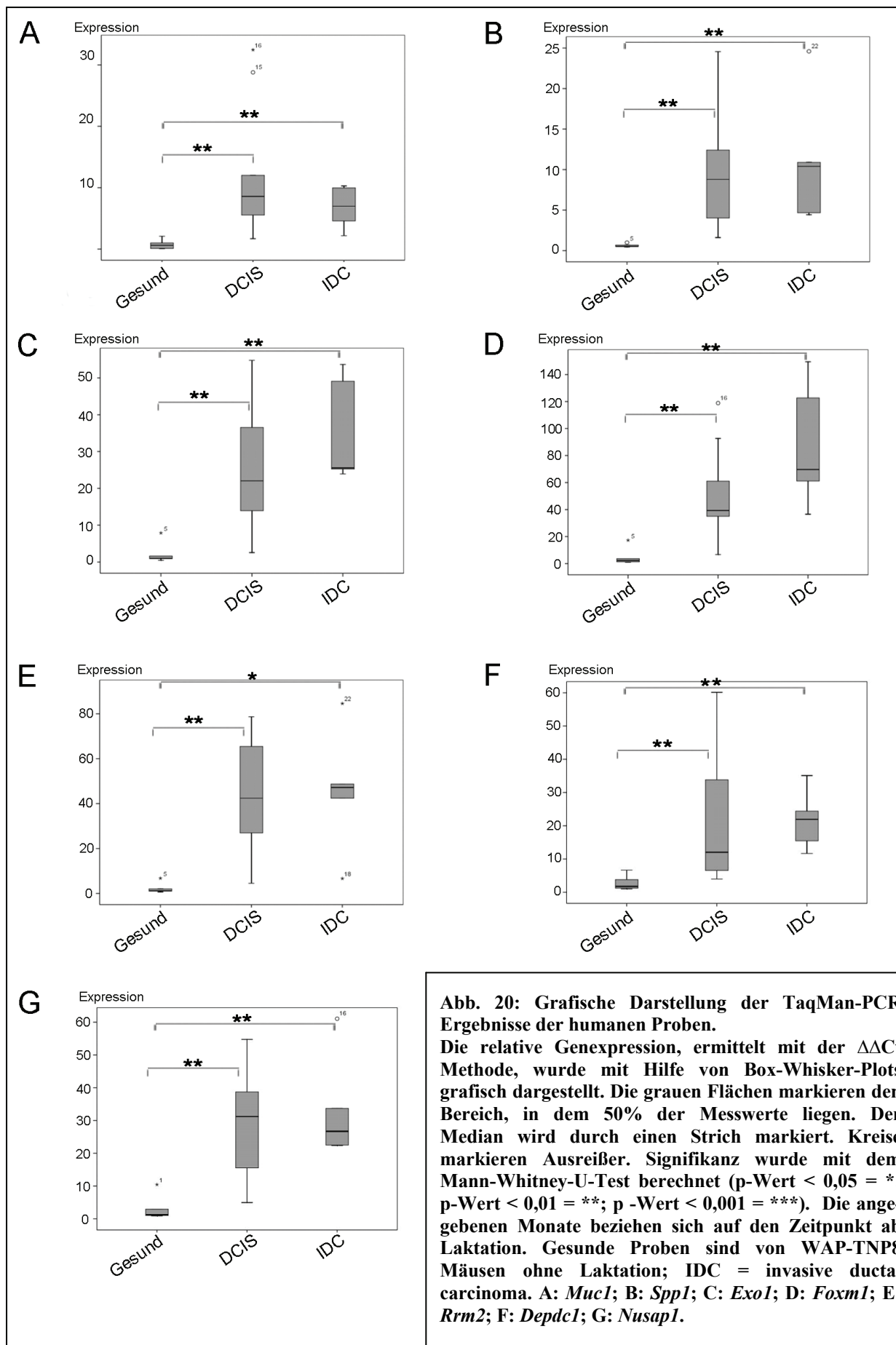
	Gen	Probe Set ID	p-Wert	Korr. p-Wert	Fold Change
Gesund vs. DCIS	<i>FOXMI</i>	202580_x_at	$8,6 \times 10^{-04}$	$2,2 \times 10^{-02}$	5,5
	<i>EXO1</i>	204603_at	$1,1 \times 10^{-03}$	$2,5 \times 10^{-02}$	4,0
	<i>MUC1</i>	207847_s_at	$8,0 \times 10^{-04}$	$2,1 \times 10^{-02}$	39,7
	<i>RRM2</i>	209773_s_at	$6,7 \times 10^{-07}$	$7,2 \times 10^{-04}$	103,4
	<i>SPPI</i>	209875_s_at	$3,3 \times 10^{-06}$	$1,3 \times 10^{-03}$	41,6
	<i>NUSAPI</i>	218039_at	$1,0 \times 10^{-04}$	$7,0 \times 10^{-03}$	25,6
	<i>DEPDC1</i>	222958_s_at	$1,2 \times 10^{-03}$	$2,7 \times 10^{-02}$	6,0
Gesund vs. IDC	<i>FOXMI</i>	202580_x_at	$4,1 \times 10^{-04}$	$2,2 \times 10^{-02}$	13,3
	<i>EXO1</i>	204603_at	$1,8 \times 10^{-03}$	$4,5 \times 10^{-02}$	6,9
	<i>MUC1</i>	207847_s_at	$2,6 \times 10^{-03}$	$5,4 \times 10^{-02}$	22,7
	<i>RRM2</i>	209773_s_at	$2,3 \times 10^{-07}$	$1,2 \times 10^{-03}$	168,1
	<i>SPPI</i>	209875_s_at	$1,1 \times 10^{-04}$	$1,1 \times 10^{-02}$	40,5
	<i>NUSAPI</i>	218039_at	$5,0 \times 10^{-04}$	$2,4 \times 10^{-02}$	33,0
	<i>DEPDC1</i>	222958_s_at	$1,3 \times 10^{-04}$	$1,2 \times 10^{-02}$	10,8

### 3. 3. 3. Validierung der humanen Mikroarraydaten Ergebnisse mittels qRT-PCR

Auch bei den humanen Proben wurde die Expression der sieben DCIS-Marker mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR validiert. Hierbei ist zu erkennen, dass die Expression der sieben DCIS-Marker in der qRT-PCR den Expressionsdaten der Mikroarrays entspricht. Für alle Gene konnte die Expression in den verschiedenen Gruppen erfolgreich validiert werden.

Die Expression der sieben Marker ist in allen malignen Geweben signifikant erhöht. Wobei in den DCIS Proben die Expression der untersuchten Marker in allen Fällen einen p-Wert von 0,01 unterschreitet (Tab. 13). In den gesunden Proben zeigt sich, wie schon im Mikroarray, dass die Expression der sieben DCIS-Marker sehr niedrig ist. Auch die Expression von *MUC1* zeigt das gleiche Profil, welches schon in den Mikroarrays beobachtet wurde (Abb. 20 A). So ist die Expression von *MUC1* in den DCIS Proben höher als in den invasiven Karzinomen. Die Gene *EXO1*, *FOXMI* und *DEPDC1* zeigen einen kontinuierlichen Anstieg der Expression von den DCIS Proben zu den invasiven Karzinomen (Abb. 20 C, D, F). Bei den Genen *SPPI*, *RRM2* und *NUSAPI* steigt die Expression in den DCIS Proben bereits auf etwa das Expressionsniveau der IDCs an (Abb. 20 B, E, G). Die entsprechenden p-Werte sowie die Fold Changes der quantitativen RT-PCR, sind in Tabelle 13 angegeben.





**Abb. 20: Grafische Darstellung der TaqMan-PCR Ergebnisse der humanen Proben.**

Die relative Genexpression, ermittelt mit der  $\Delta\Delta Ct$  Methode, wurde mit Hilfe von Box-Whisker-Plots grafisch dargestellt. Die grauen Flächen markieren den Bereich, in dem 50% der Messwerte liegen. Der Median wird durch einen Strich markiert. Kreise markieren Ausreißer. Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet (p-Wert < 0,05 = \*; p-Wert < 0,01 = \*\*; p-Wert < 0,001 = \*\*\*). Die angegebenen Monate beziehen sich auf den Zeitpunkt ab Laktation. Gesunde Proben sind von WAP-TNP8 Mäusen ohne Laktation; IDC = invasive ductal carcinoma. A: *Muc1*; B: *Spp1*; C: *Exo1*; D: *Foxm1*; E: *Rrm2*; F: *Depdc1*; G: *Nusap1*.

**Tab. 13: p-Werte und Fold Changes der TaqMan Untersuchung der humanen Proben. Der p-Wert gibt die statistische Signifikanz des durchgeführten Vergleichs (t-Test) an. Der Fold Change steht für die x-fache Veränderung der Genexpression zwischen den verglichenen Gruppen.**

	Gen	p-Wert	Fold Change
Gesund vs. DCIS	<i>MUC1</i>	$1,7 \times 10^{-02}$	13,9
	<i>SPP1</i>	$5,6 \times 10^{-03}$	16,8
	<i>RRM2</i>	$1,7 \times 10^{-03}$	35,5
	<i>FOXMI</i>	$6,5 \times 10^{-03}$	16,9
	<i>EXO1</i>	$5,2 \times 10^{-03}$	22,0
	<i>DEPDC1</i>	$5,0 \times 10^{-02}$	6,8
	<i>NUSAPI</i>	$2,7 \times 10^{-03}$	25,0
Gesund vs. IDC	<i>MUC1</i>	$2,8 \times 10^{-03}$	11,3
	<i>SPP1</i>	$1,4 \times 10^{-03}$	14,4
	<i>RRM2</i>	$4,0 \times 10^{-03}$	39,5
	<i>FOXMI</i>	$2,2 \times 10^{-03}$	29,9
	<i>EXO1</i>	$5,5 \times 10^{-04}$	25,6
	<i>DEPDC1</i>	$9,9 \times 10^{-04}$	12,4
	<i>NUSAPI</i>	$1,9 \times 10^{-03}$	21,4

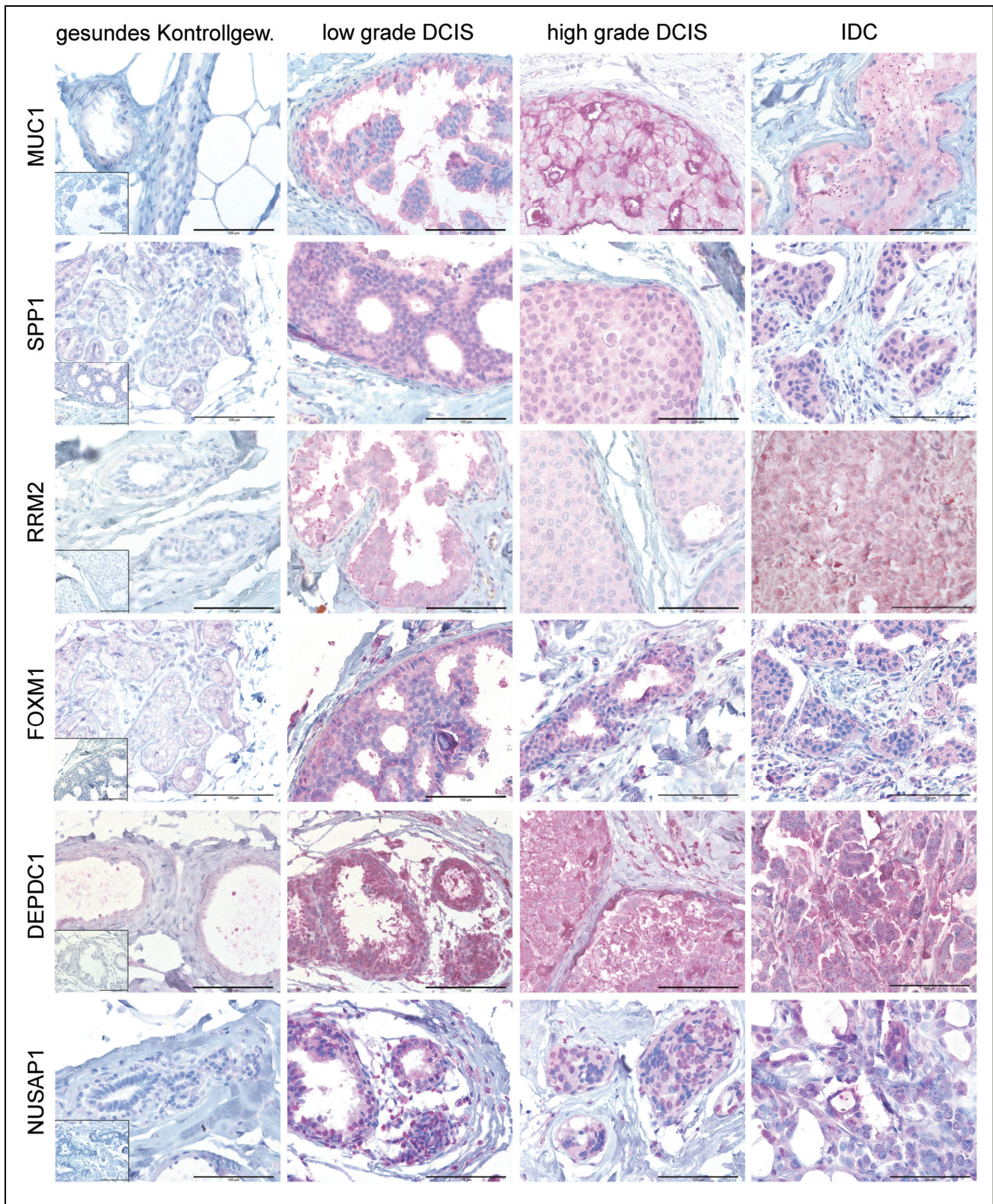
### 3. 3. 4. Analyse der Proteinexpression der identifizierten DCIS-Marker

Um die Expression der identifizierten DCIS-Marker auch *in vivo* auf zellulärer Ebene näher zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen mit Hilfe spezifischer Antikörper durchgeführt. Dazu wurde eine von den bisher verwendeten Proben, unabhängige Gruppe humaner Gewebe, verwendet. Für jedes Protein wurde eine Serie von fünf Färbungen je Gruppe (Gesund, low-grade DCIS, high-grade DCIS, IDC) durchgeführt. Exemplarisch wurde je ein Bild für jede Gruppe dargestellt. Für das Protein EXO1 wurde kein Antikörper gefunden, der für die Verwendung in der Immunhistochemie geeignet war.

Abbildung 21 zeigt die spezifische Färbung der Proteine: MUC1, SPP1, RRM2, FOXM1, DEPDC1 und NUSAPI. Für die sechs abgebildeten DCIS-Marker ist deutlich zu erkennen, dass die Expression des jeweiligen Proteins in den DCIS-Geweben deutlich ansteigt. Dies ist durch ein Auftreten bzw. durch eine deutliche Intensivierung der rosa Färbung auszumachen. Als Negativkontrolle dienten Schnitte, bei denen der primäre Antikörper während der Inkubation ausgespart wurde. Diese Schnitte wurden anschließend ebenfalls mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert, um eine unspezifische Färbung des sekundären Antikörpers auszuschließen. Die Negativkontrollen der untersuchten Proteine zeigten keine Färbung. Die gesunden Kontrollen der Proteine MUC1, RRM2 sowie NUSAPI waren

negativ, wohingegen sich bei den Proteinen SPP1, FOXM1 und DEPDC1 eine geringgradige Färbung zeigte. Diese geringgradige Färbung ist ein Zeichen dafür, dass die Proteine in geringem Maße, auch im gesunden Zustand in der Zelle exprimiert werden. In den DCIS Geweben (sowohl low-grade, als auch high-grade) stieg die Expression aller sechs untersuchten Proteine stark an und war in den invasiven Karzinomen ebenso stark. Die Färbung in den DCIS Proben war im Lumen der Milchgänge festzustellen, dabei waren die gefärbten Zellen epithelialen Ursprungs. Die sich im Milchgang befindlichen Epithelzellen wurden durch die Basalmembran vom umliegenden Stroma abgegrenzt. Dieses Stroma setzte sich aus gefäßführendem Binde- und Fettgewebe zusammen. Generell konnte keine Färbung des Fett- sowie des Bindegewebes gezeigt werden. Bei den DCIS Proben für die Proteine MUC1, SPP1 und RRM2 ist deutlich zu erkennen, dass ausschließlich die epithelialen Bestandteile gefärbt waren. Bei den Proteinen FOXM1, DEPDC1 und NUSAP1 waren neben den epithelialen Bestandteilen, auch im Stroma einzelne Zellen gefärbt. Hierbei handelte es sich um Immunzellen. Die Färbung der untersuchten Proteine lag vorwiegend zytoplasmatisch vor. Im Fall von MUC1 (high-grade) konnte aber auch eine Färbung der Epithelzell-Membran nachgewiesen werden.

Histologisch betrachtet ist zu erkennen, dass im Vergleich zu den gesunden Proben, schon bei den low-grade DCIS eine deutliche Zellproliferation innerhalb des Duktus stattgefunden hat. Im Falle der high-grade DCIS sind nahezu alle Dukti obliteriert. Die invasiv duktales Karzinome zeigten nur noch schwach die gewohnten Gewebestrukturen, da die Tumorzellen die Basalmembran durchbrochen haben und in das umliegende Gewebe infiltriert sind.



**Abb. 21:** Analyse der Proteinexpression der identifizierten DCIS-Marker. Die Expression wurde mittels Immunhistochemie an Formaldehyd fixierten, in Paraffin eingebetteten Schnitten dargestellt. Die Expression wurde für jedes der gezeigten Gene in Geweben mit zunehmender Malignität (Gesund, low-grade DCIS, high-grade DCIS, invasives Mammakarzinom) gezeigt. Die Expression der Proteine zeichnet sich durch eine rosa Färbung aus, wobei zusätzlich eine blaue Gegenfärbung mit Hämatoxylin erfolgte. Die Negativkontrollen sind als Insert dargestellt. (Vergrößerung: 400x; Balken: 100 µm)

### 3. 3. 5. Validierung der identifizierten DCIS Marker mittels ONCOMINE

Die Online-Datenbank ONCOMINE ([www.oncomine.org](http://www.oncomine.org)) (Rhodes et al. 2004) fasst mittels Mikroarray-Technologie ermittelte krebsspezifische Expressionsprofile zusammen und ermöglicht eine studienübergreifende Suche nach Biomarkern und Kandidatengen. In der ONCOMINE-Datenbank existieren momentan über 91 Microarray-Studien, welche sich mit den unterschiedlichsten Expressionsprofilen des Mammakarzinoms beschäftigen. Die ONCOMINE-Datenbank wird regelmäßig aktualisiert.

Durch die ONCOMINE-Datenbanksuche konnten die identifizierten DCIS-Marker weiter validiert werden. So wurden bei dem Vergleich, gesunder Brustgewebe gegen invasiven Brustkrebs mittels ONCOMINE, sechs der sieben DCIS-Marker in dem Datensatz von Richardson et al. (Richardson et al. 2006) als signifikant hochreguliert identifiziert (Abb. 22). Nur *MUC1* war in dieser Analyse nicht signifikant hochreguliert. In Abbildung 22 sind zum einen die Boxplots der Vergleiche Gesund gegen invasiven Brustkrebs sowie eine Heatmap, welche die Expression der sechs Gene in den unterschiedlichen Geweben als Farbcode darstellt, gezeigt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die Expression der invasiven Mammakarzinome (rot) deutlich höher ist, als die der gesunden Gewebe (blau). Es lag in ONCOMINE kein Datensatz vor, welcher DCIS mit gesundem Gewebe verglich.

Außerdem war es mit Hilfe von ONCOMINE möglich, Datensätze nach Merkmalen wie Tumorgrad und Prognose zu untersuchen. Da für die unterschiedlichen Gene eine unterschiedliche Menge signifikanter Datensätze zu der jeweiligen Fragestellung ermittelt wurde, wurde lediglich die Anzahl der signifikanten Datensätze gezählt und in Abbildung 23 grafisch dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass die Anzahl der Datensätze auf der Analyse von 17.06.2009 beruhen und dass nur Datensätze gezählt wurden, welche mindestens einem p-Wert von 0,001 aufwiesen. Es ist zu sehen, dass bezüglich des Tumorgrades mit Ausnahme von *MUC1* und *SPPI*, alle Gene mit einem hohen Tumorgrad korrelieren (Abb. 23 A). So wurden für die Gene *EXO1*, *DEPDC1* und *NUSAP1* jeweils acht Datensätze identifiziert, in denen diese Gene in den Proben mit einem höheren Tumorgrad überexprimiert waren. Für die Gene *RRM2* und *FOXMI* wurden sogar jeweils zwölf signifikante Datensätze identifiziert. Für die Prognose-Analyse wurden mit Ausnahme von *MUC1* für alle Gene signifikante Datensätze gefunden (Abb. 23 B). Die Anzahl der identifizierten Datensätze schwankte zwischen vier Datensätzen für *SPPI* und jeweils zehn signifikanten Datensätze für die Gene *RRM2* und *NUSAP1*. Zusammenfassend lässt sich aus der mit Hilfe von ONCOMINE

durchgeführten Analyse schließen, dass die identifizierten DCIS-Marker, mit Ausnahme von *MUC1*, auch eine prognostischen Relevanz haben.

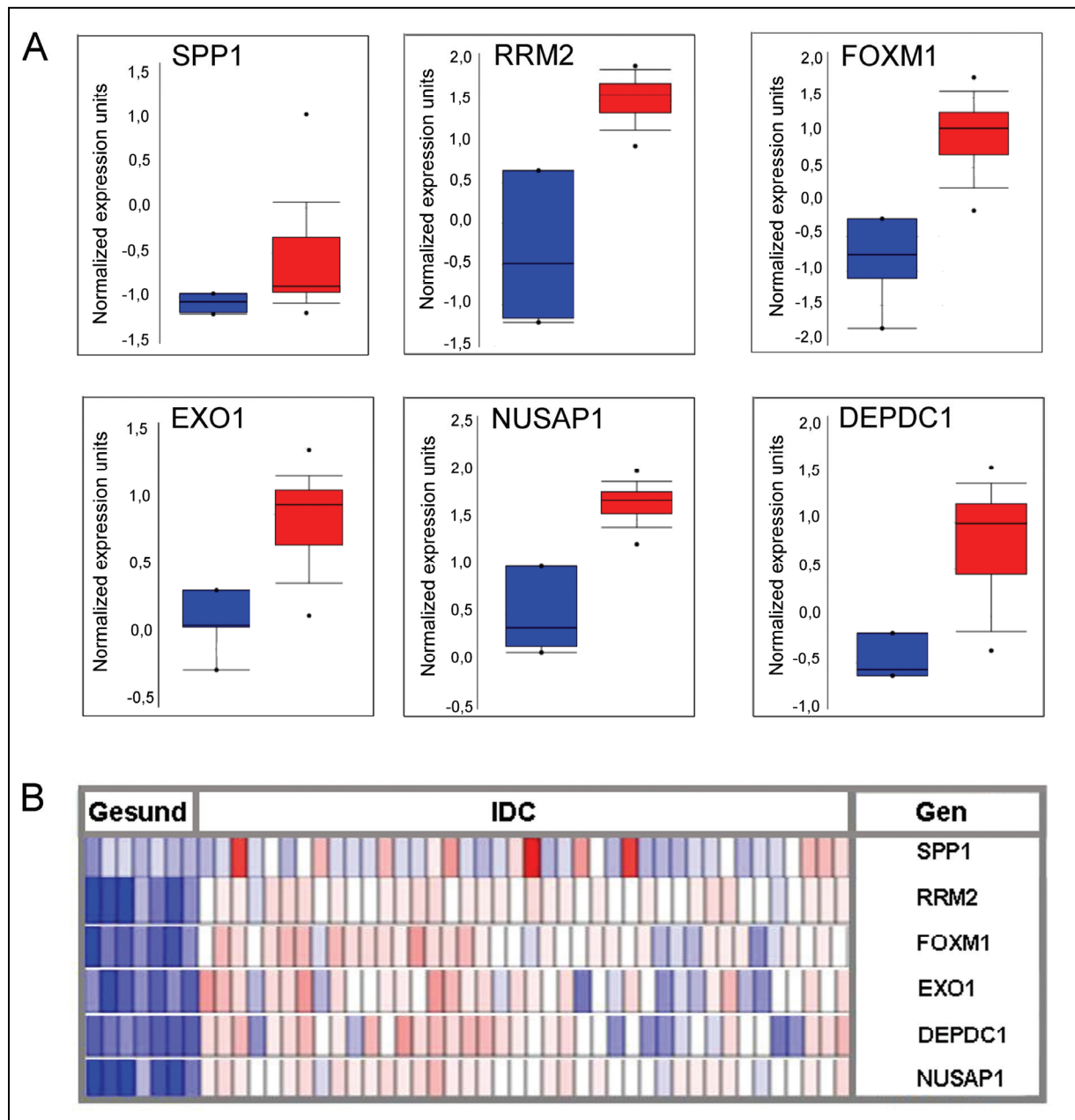


Abb. 22: Ergebnisse des mittels der Datenbank ONCOMINE durchgeführten Vergleichs zwischen gesundem Brustgewebe und invasivem Brustkrebs. Dargestellt sind die Daten von Richardson et al. **A:** Boxplots der sechs signifikanten Gene. Dabei sind die gesunden Gewebe blau dargestellt, die invasiven Karzinome rot. **B:** Heatmap der gleichen Daten, wobei jedes Kästchen eine Gewebeprobe darstellt. Blau steht für eine verringerte Expression, rosa-rot für eine erhöhte Expression.

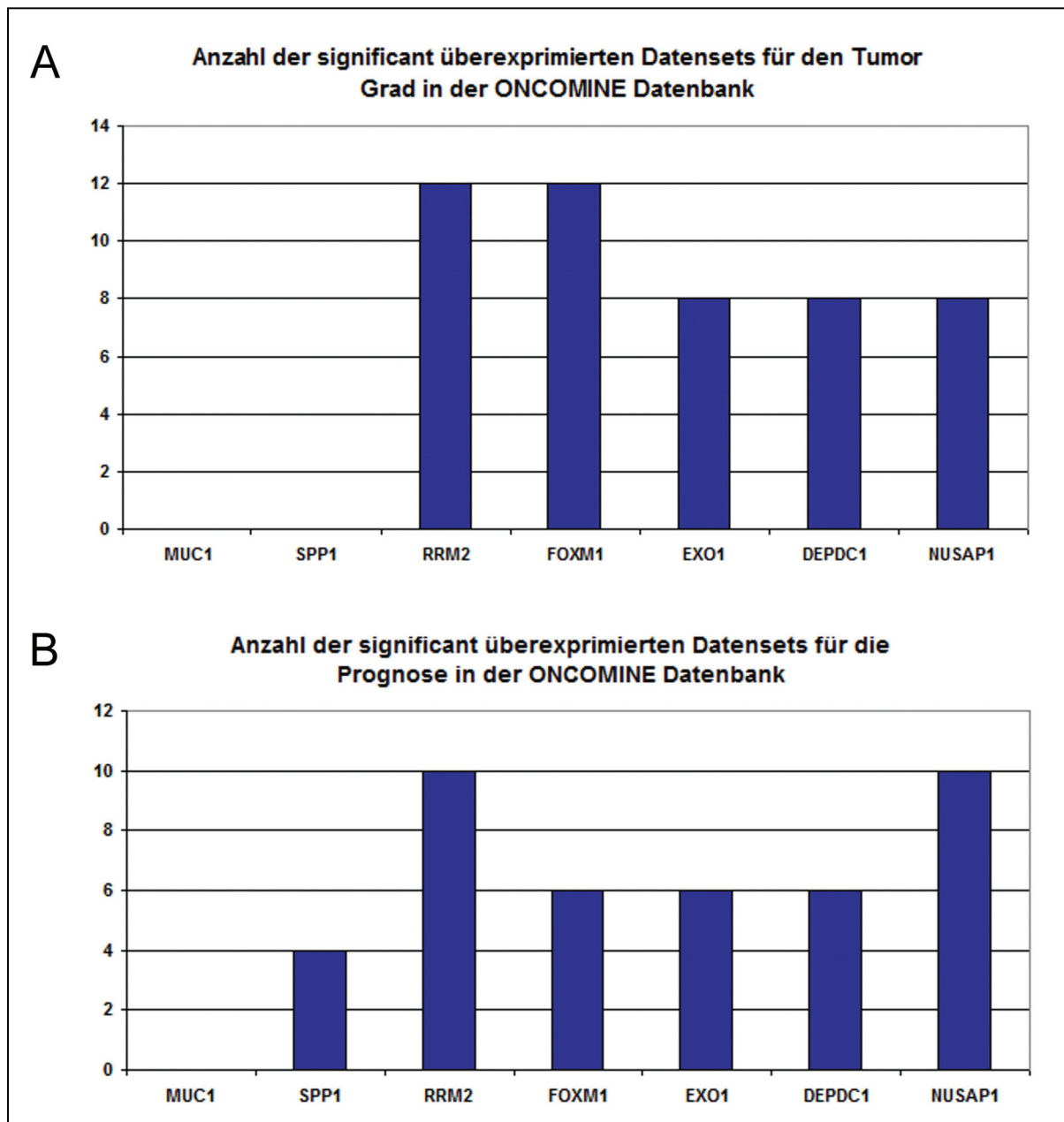


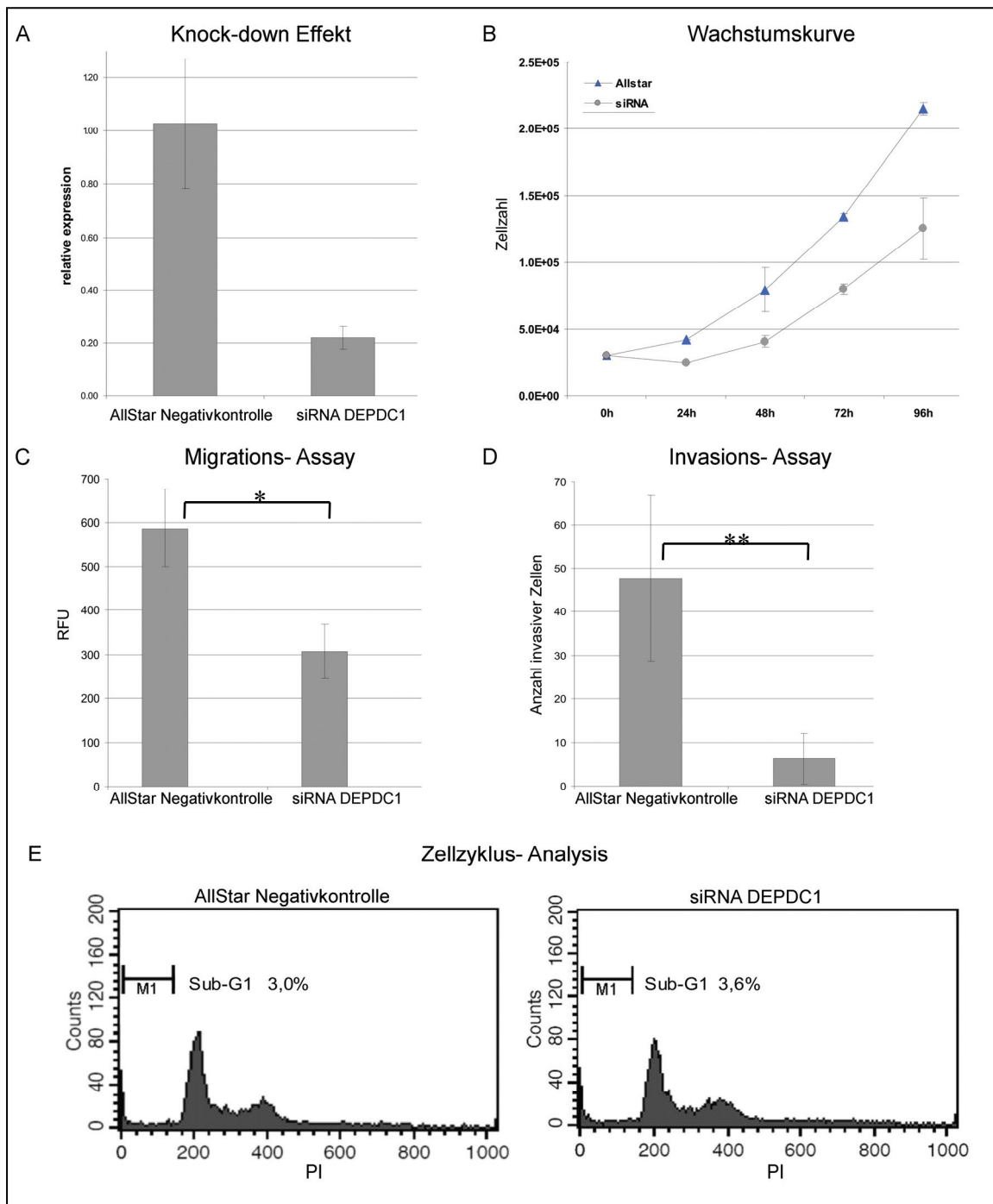
Abb. 23: Ergebnisse des mittels ONCOMINE durchgeführten Analysen bezüglich des Tumorgrades und der prognostischen Eigenschaft für die sieben identifizierten DCIS-Marker. A: Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Datensätze, welche bezüglich der Tumorgrades signifikant waren. Dies bedeutet, dass die untersuchten Gene in den entsprechenden Datensätzen signifikant mit einem hohen Tumorgrad korrelierten. B: Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Datensätze, bei denen das untersuchte Gen signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert war.

### 3. 4. Funktionelle Analyse von DEPDC1 mittels RNA-Interferenz

Um die Effizienz des durchgeführten Gene Silencings mittels siRNA gegen *DEPDC1* zu bestimmen, wurde die Menge des Transkriptes mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR ermittelt. Als Referenz diente eine Standard Negativkontrolle der Firma Qiagen (AllStar siRNA). Mit der verwendeten siRNA gegen *DEPDC1* wurde in den MDA-MB 231 Zellen, gemessen an der AllStar Negativkontrolle, ein Knockdown-Effekt von 81 % erreicht (Abb. 24 A). Anschließend wurden sowohl mit den *DEPDC1* siRNA als auch mit den AllStar siRNA behandelten Zellen funktionelle Analysen durchgeführt. Zuerst wurde das Wachstumsverhalten der beiden Transfektanten verglichen. Hierzu wurde über einen Zeitraum von vier Tagen, alle 24 Stunden, die Zellzahl bestimmt (Abb. 24 B). Hierbei war zu erkennen, dass die *DEPDC1* siRNA behandelten Zellen ein signifikant geringeres Wachstum zeigten, als sie AllStar siRNA behandelten Zellen. So unterschied sich, bei gleicher Einsaat von 30.000 Zellen je Well, nach vier Tagen die Zellzahl um etwa 90.000 Zellen. Des Weiteren wurde ein Migrations-Assay durchgeführt, um zu überprüfen, ob der Knockdown von *DEPDC1* einen Einfluss auf das Migrationsverhalten der MDA-MB 231 Zellen hat. Hierzu wurde den Zellen 20 Stunden Zeit gegeben, eine Membran mit 8 µm Porengröße zu durchwandern. Anschließend wurde anhand einer Fluoreszenz-Messung, die Menge der durch die Membran gewanderten Zellen, bestimmt. Diese wurden zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein gefärbt. Die gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) wurden anschließend grafisch dargestellt (Abb. 24 C). Es ist zu erkennen, dass die Migrationsfähigkeit der *DEPDC1* siRNA behandelten Zellen beinahe um die Hälfte reduziert ist. Einen noch größeren Einfluss zeigte das durchgeführte Invasions-Assay, wo das Invasionspotential der AllStar siRNA behandelten Zellen etwa um das siebenfache höher war, als das der *DEPDC1* siRNA behandelten Zellen (Abb. 24 D). Der Versuchsablauf des Invasions-Assays war ähnlich dem des Migrations-Assay, nur dass zusätzlich zu der Membran noch eine Schicht aus sogenanntem Matrigel™ durchwandert werden musste. Nach erfolgter Invasion wurden Zellen, welche durch das Matrigel™ gewandert waren, mit Toluidinblau gefärbt und ausgezählt. Die Anzahl der gezählten, invasiven Zellen wurde grafisch dargestellt (Abb. 24 D). Es ist zu erkennen, dass die *DEPDC1* siRNA behandelten Zellen ein deutlich geringeres invasives Potential zeigen und *DEPDC1* somit für die Invasion von Zellen ein wichtiger Faktor ist. Zuletzt wurde eine Zellzyklus-Analyse durchgeführt. Die Zellzyklus-Analyse basiert auf der Anfärbung der nukleären DNA mit Propidiumiodid (PI), einem Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. Durch die Messung der PI Fluoreszenz war



es möglich, den DNA-Gehalt der Zellen zu bestimmen und diese somit einer bestimmten Zellzyklusphase zuzuordnen. Von besonderem Interesse war hierbei die Sub-G1 Phase, da diese anzeigt, wie viele Zellen apoptotisch sind. Die in Abbildung 24 E dargestellten Histogramme für die beiden Transfektanten zeigen, dass kein Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen zu beobachten war. So lag die Anzahl der apoptotischen Zellen gemessen an der Gesamtzahl zwischen drei und vier Prozent. Dies bedeutet, dass die Expression von *DEPDC1* keinen Einfluss auf das apoptotische Verhalten der MDA-MB 231 Zellen hat.



**Abb. 24: Ergebnisse der funktionellen Analyse von *DEPDC1*.** A: Darstellung des erreichten Knockdown Effektes. Durch die verwendete siRNA gegen *DEPDC1* konnte die Expression von *DEPDC1* in den verwendeten MDA-MB 231 Zellen um 81 % gesenkt werden. B: Wachstumskurve über einen Zeitraum von vier Tagen. Das Wachstum der MDA-MB 231 Zellen mit verringerter *DEPDC1* Expression ist signifikant vermindert. C: Migrations-Assay. Auf der y-Achse ist die Anzahl der migrierten Zellen anhand der gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) dargestellt. Die Migrationsfähigkeit von Zellen mit verringerter *DEPDC1* Expression nimmt signifikant ab. D: Invasions-Assay. Die y-Achse zeigt die Anzahl der invasiven Zellen. Die Invasionsfähigkeit von Zellen mit verringerter *DEPDC1* Expression ist stark gehemmt. E: Zellzyklus-Analyse. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenz des Farbstoffes Propidiumiodid (PI) aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Zellzahl. Die Anzahl der Zellen in der SubG1-Phase ist unverändert. Daher ist kein Einfluss von *DEPDC1* auf die Apoptose zu erkennen.

## 4. Diskussion

Für die Detektion von DCIS stellt die Mammographie derzeit den Goldstandard dar. Wenn auch, durch Einführung der Mammographie Screenings die Zahl der diagnostizierten DCIS Fälle deutlich angestiegen ist (Kuerer et al. 2009; Sakorafas et al. 2008), bleiben noch immer viele DCIS unentdeckt. So werden in der Mammographie bis zu 44 % der DCIS-Läsionen nicht detektiert (Kuhl et al. 2007). Da sich ohne Behandlung bis zu 50 % aller DCIS-Läsionen zu invasivem Brustkrebs entwickeln (Erbas et al. 2006; Wiechmann and Kuerer 2008), besteht ein besonderes Interesse an der sensitiven Erfassung des DCIS vor dem Übergang in ein invasives Stadium. Außerdem ist ein früher Nachweis des DCIS von außerordentlicher Wichtigkeit, da das krankheitsfreie Überleben von Patientinnen mit DCIS über 97 % beträgt (Sakorafas et al. 2008). Eine frühe Entdeckung und somit eine frühe Behandlung des DCIS ist der beste Weg, um die Mortalität von Brustkrebs zu reduzieren (Suzuki et al. 2006).

Um die Entstehung des DCIS besser zu verstehen und um Marker zu identifizieren, welche eine bessere Detektion ermöglichen, wurden in dieser Untersuchung nach Genen gesucht, welche im DCIS eine stark erhöhte Expression im Vergleich zum gesunden Gewebe zeigen. Allgemein wird die Suche nach DCIS-Markern vor allem durch die wenigen zur Verfügung stehenden Gewebeproben erschwert (Wiechmann and Kuerer 2008). Ferner wurde bisher vornehmlich nach Markern gesucht, welche das Lokalrezidivrisiko oder die Progression von DCIS in invasiven Brustkrebs vorhersagen. Da auch für die vorliegende Untersuchung nur eine limitierte Menge an humanem DCIS Gewebe vorlag, wurde zur ersten Identifizierung der DCIS-Marker ein Mausmodell verwendet. Zusätzlich bot das Tiermodell die Möglichkeit, sehr frühe Stadien in der Entstehung des DCIS zu analysieren.

In den letzten Jahren wurden bereits mehrere transgene Mausmodelle entwickelt, welche als Modell für die Entstehung von humanem DCIS dienen sollten. So existieren DCIS-Mausmodelle, welche auf Xenograft-Modellen (Miller et al. 2000) oder speziellen Gewebetransplantationstechniken (Maglione et al. 2004) basieren. Das für diese Studie verwendete transgene Modell trägt das SV40 T-Antigen unter der Kontrolle eines WAP-Promoters. Die von Schulze-Garg et al. (Schulze-Garg et al. 2000) etablierten WAP-T und WAP-TNP Linien zeigen anhaltende, veränderliche präinvasive Läsionen, welche eine lange Latenzphase haben. Dies ist von Vorteil, da somit auch die DCIS Entstehung eingehend untersucht werden kann. Zusätzlich zeigen die verwendeten Mäuse histologisch große Ähnlichkeit mit dem humanen DCIS. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des T-Antigen in WAP-SV40 T-Antigen transgenen Mäusen durch hormonelle Anregung stimuliert werden kann, was zu

einer früheren Tumorentstehung führt (Li et al. 2000). Dies war für die durchgeführte Analyse jedoch nicht von Interesse, da gerade die relativ lange Latenzzeit eine eingehende Analyse der DCIS Entstehung ermöglichte. Ein ähnliches Mausmodell, welches einen C3 Promoter in Kombination mit dem SV40 T-Antigen verwendet (C3/SV40-Tag), zeigt eine deutlich schnellere DCIS- und Tumorentstehung und wäre somit für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen ungeeignet gewesen (Green et al. 2000; Shibata et al. 1998). Das für diese Arbeit verwendete WAP-TNP8 Mausmodell zeigte, entsprechend der Literaturangaben, eine Latenzzeit für die Entstehung invasiver Tumore von etwas fünf Monaten. Indes konnten bereits zwei Monate nach Aktivierung des Onkogens die ersten DCIS Läsionen in den Mäusen nachgewiesen werden. Vier Monate nach Aktivierung des Onkogens zeigten etwa 50 % der Mäuse DCIS-Läsionen. Dabei ist anzunehmen, dass zu diesem Zeitpunkt bereits alle Mäuse DCIS aufwiesen, diese aber mit der gewählten histologischen Untersuchung nicht detektiert werden konnten. So wurden, von jedem zu untersuchenden Gewebestück, zwei bis vier HE-Schnitten angefertigt und begutachtet. Parallel durchgeführte Serienschritte von jeweils einer Maus pro Gruppe zeigten, dass die DCIS-Läsionen meist sehr klein waren und somit teilweise nach ein bis zwei Schnittebenen nicht mehr nachzuweisen waren. Für die weiteren Analysen wurde bevorzugt Gewebe von Mäusen verwendet, bei denen histologisch DCIS nachgewiesen werden konnte. Es war festzustellen, dass fünf Monate nach der Aktivierung des Onkogens, die Anzahl der DCIS abnahm. Dieses ist der Tatsache geschuldet, dass viele Tiere bereits frühzeitig euthanasiert werden mussten, da sie bereits invasive Tumore aufwiesen. Somit war die Gruppengröße zu diesem Zeitpunkt deutlich geringer, als zu den vorherigen Zeitpunkten. Fünf Monate nach der Aktivierung des Onkogens besaßen über 70 % der Mäuse invasive Tumore.

Insgesamt wurden 35 murine Gewebeproben mittels Affymetrix GeneChip® Analyse untersucht. Eine Mikroarraystudie muriner DCIS Gewebe diesen Umfangs wurde bisher nicht durchgeführt. Auch mit humanem DCIS Gewebe wurden bisher nur wenige Mikroarray-Studien publiziert. Ferner haben die veröffentlichten Studien zum DCIS meist den Focus auf Gene gelegt, welche die Progression von DCIS in IDC charakterisieren (Balleine et al. 2008; Castro et al. 2008; Ma et al. 2003; Nishidate et al. 2004; Schuetz et al. 2006). Die identifizierten Genlisten waren in der Regel recht umfangreich und enthielten häufig zwischen 50 und 500 Genen. Einige Studien beschäftigten sich darüber hinaus mit der Unterscheidung verschiedener DCIS Typen. So konnte gezeigt werden, dass zwischen low-grade und high-grade DCIS Unterschiede in der Genexpression bestehen (Seth et al. 2003). Auch Hannemann et al. (Hannemann et al. 2006) untersuchten gut und schlecht differenzierte DCIS

sowie IDCs. Sie konnten zwei Genlisten beschreiben, von denen die eine zwischen den verschiedenen DCIS Differenzierungsgraden unterschied, die andere zwischen DCIS und IDC. Porter et al. (Porter et al. 2003) identifizierten 26 Gene, welche sich zwischen intermediate- und high-grade DCIS, bzw. zwischen normalem Gewebe und DCIS unterschieden. Auch wurde der Unterschied von DCIS mit bzw. ohne Nekrose untersucht (Adeyinka et al. 2002). Weiterhin zeigten die durchgeführten DCIS Mikroarray-Untersuchungen, dass die *In-situ*-Läsionen vorwiegend mit invasiven Läsionen des gleichen Grades zusammen clustern, diesen also stark gleichen. Dies legt die Vermutung nahe, dass DCIS die Vorläufer ihrer gleichgradigen invasiven Gegenstücke sind (Ma et al. 2003). Auch anhand von genetischen Veränderungen konnte diese Beobachtung bestätigt werden (O'Connell et al. 1994). Eine Untersuchung, welche phänotypische, genomische und transkriptionale Analysen zur Untersuchung einer Serie von DCIS Proben kombinierte, zeigte ebenfalls eine hohe Homologie zwischen DCIS- und IDC Proben. Folglich repräsentierten die untersuchten DCIS Proben bereits die im invasiven Mammakarzinom zu findende molekulare Vielfalt (Vincent-Salomon et al. 2008). Die zuletzt veröffentlichte DCIS Mikroarray-Studie stammt von Balleine et al. (Balleine et al. 2008). Das Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, eine klinisch anwendbare Klassifizierung für das DCIS zu entwickeln. Dafür suchten sie nach einem Expressionsprofil, welches das maligne Potential der DCIS Läsionen unterscheiden kann. Zusätzlich zur Analyse der Expressionsprofils wurden die Proben mittels CGH (comparative genomic hybridization) auf genetische Veränderungen untersucht. Mit Hilfe einer Genliste, welche 100 Gene enthielt, die mit einem hohen Tumorgrad assoziiert waren, war es möglich, zwischen DCIS mit unterschiedlichem malignem Potential zu unterscheiden. Auch wenn bisher noch kein Gen identifiziert wurde, welches allein zwischen den verschiedenen DCIS Typen unterscheiden kann bzw. den Übergang vom DCIS zum IDC markiert, so werden weitere Studien Anhaltspunkte und Signaturen liefern, welche zukünftig hoffentlich eine bessere Diagnose, Prognosevorhersage und Behandlung des DCIS ermöglichen (Wiechmann and Kuerer 2008).

Die vorliegende Arbeit zur Identifizierung von DCIS-Markern setzte den Fokus auf die möglichst frühe Detektion des DCIS. Bevor jedoch mit der eigentlichen Analyse begonnen werden konnte, wurde die Qualität der Mikroarrays auf vielfältige Weise überprüft. Dies war bedeutend, da Mikroarrays schlechter Qualität, die Ergebnisse verfälschen können. Zuerst wurden die Affymetrix Qualitäts-Kontrollmaße der Mouse Genome 430 2.0 GeneChips® überprüft, dabei wurde dem Background, RawQ, dem Scaling Factor sowie dem 3'- zu 5'-

Verhältnis von *Actb* und *Gapdh* besondere Beachtung geschenkt. Die Kontrollmaße lagen überwiegend in dem von Affymetrix empfohlenem Rahmen. Die weitere Qualitätskontrolle erfolgte mit Hilfe des Programms GeneSpring GX 10.0 der Firma Agilent. Zunächst wurde eine Normalisierung der Daten durchgeführt. Die Darstellung der Expressionswerte nach der Normalisierung zeigte ein sehr einheitliches Bild, so dass die Mikroarrays gut miteinander vergleichbar waren.

Der Korrelations-Plot, welcher die Korrelationskoeffizienten für jedes GeneChip®-Paar als Heatmap darstellt, zeigte, dass die invasiv duktales Karzinome (IDC) nur in eingeschränktem Umfang mit den übrigen Proben korrelierten. Dies wurde durch das Unsupervised Hierarchical Clustering bestätigt, in welchem die IDCs einen eigenen Arm im Dendrogramm bildeten. Untereinander ähnelten sich die IDCs jedoch sehr stark, dies war sowohl im Korrelations-Plot, im PCA-Plot, als auch im Unsupervised Hierarchical Clustering zu erkennen. So war im Korrelations-Plot der Korrelationskoeffizient der IDCs untereinander sehr gering. Im PCA-Plot bildeten die IDC eine deutlich separat liegende Gruppe und im Unsupervised Hierarchical Clustering bildeten sie, wie bereits erwähnt, einen eigenen Arm im Dendrogramm. Eine Erklärung für diese starke Separierung der IDC könnte die abweichende Gewebezusammensetzung der invasiven Mammakarzinome sein. So bestanden die gesunden Kontrollen sowie die Proben der verschiedenen Monate überwiegend aus Fett- und Bindegewebe, in welchem sich einige Milchgänge und Milchdrüsen (Epithelgewebe) befanden. Die IDCs hingegen bestanden zum Großteil aus Epithelgewebe. Eine Veranschaulichung dieser Tatsache bietet Abbildung 10 im Ergebnisteil.

Die Grafiken der Qualitätskontrolle zeigten außerdem, dass die Negativkontrollen untereinander ein sehr einheitliches Bild präsentierten, welches sich wiederum deutlich von dem der Proben der verschiedenen Monate unterscheidet. Zusammenfassend war festzustellen, dass die einzelnen Gruppen untereinander die größte Ähnlichkeit zeigten. Es war jedoch möglich, die Proben der verschiedenen Monate deutlich von den Negativkontrollen zu unterscheiden. Dies zeigt, dass auf molekularer Ebene bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt eine Veränderung im Expressionsprofil der DCIS-Mäuse eintrat. Dies ist von Bedeutung, da histologisch keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Monaten 1-2 festzustellen waren.

Um tumorassoziierte DCIS-Marker zu identifizieren, wurden Proben von Mäusen kurz nach der Aktivierung des Onkogens (Monat 2-3) sowie invasive Tumore, mit den Negativkontrollen verglichen. Für die durchgeführte Analyse wurden strenge Selektionskriterien herangezogen. Demgemäß wurde ein hoch signifikanter p-Wert festgelegt. Dies war nötig, um

die Anzahl der potentiellen DCIS-Marker zu reduzieren. Außerdem wurden durch den hohen festgelegten Fold Change ausschließlich Gene identifiziert, welche eine starke Veränderung zeigten.

Bei den durchgeführten Volcano-Plot Analysen war zu beobachten, dass in den Proben der Monate 2 und 3 noch deutlich weniger Gene eine signifikante Veränderung zeigten, als in den IDCs. Dies ist wiederum zum einen mit der Gewebezusammensetzung zu erklären, da die Proben der Monate zwei und drei den Negativkontrollen darin stark ähneln. Zum anderen wurden zu diesem relativ frühen Zeitpunkt erst bei etwa 25 % der WAP-TNP8 Mäuse DCIS diagnostiziert, die restlichen 75 % der WAP-TNP8 Mäuse waren histologisch nicht von den Negativkontrollen zu unterscheiden. Gene, welche bereits zu einem derlei frühen Zeitpunkt spezifisch auf die Entstehung von DCIS und IDC hinweisen, sind von immensem Interesse. Sie könnten einen Ansatzpunkt für eine frühere und zuverlässigere Detektion von DCIS und IDC darstellen.

Aus der durchgeführten Analyse resultierte eine Liste von 140 potentiellen DCIS-Markern. Unter Verwendung anderer Selektionkriterien (p-Wert, FC) wäre es möglich gewesen, eine größere bzw. kleinere Menge an potentiellen Kandidatengenen zu ermitteln. Allerdings wäre bei einer größeren Kandidatengenliste die anschließende Selektion weitaus umfangreicher und somit aufwendiger gewesen. Außerdem wären für den Erhalt einer umfangreicheren Genliste, weniger stringente Analysekriterien nötig gewesen, was wiederum die Signifikanz der identifizierten Gene gesenkt hätte. Bei einer kleineren Kandidatengenmenge dagegen wäre die Gefahr einer Überanpassung (Overfitting) drastisch gestiegen. Unter Überanpassung versteht man eine zu starke Anpassung an den vorgegebenen Datensatz, welche somit die Ergebnisse verfälscht. Daher wurden die genannten Kriterien gewählt und die 140 Gene anschließend einer manuellen Selektion unterzogen.

Mit Hilfe der 140 identifizierten potentiellen DCIS-Marker wurde ein Supervised Hierarchical Clustering durchgeführt. Dieses zeigt deutlich, dass die Mehrheit der 140 identifizierten Gene eine erhöhte Expression aufweisen. Weiterhin war zu beobachten, dass die Negativkontrollen separiert clusterten und sich in ihrer Expression stark von den anderen Proben unterschieden. Somit besaßen die prämaligen Gewebe bereits eine deutlich veränderte Expression und ähnelten, bezogen auf die 140 Kandidatengene, eher den invasiven Mammakarzinomen. Dieses Resultat zeigt, dass die ausgewählten Kandidatengene effektiv die Abgrenzung der prämaligen Gewebe von den Negativkontrollen unterstützen.

Die Feststellung, dass sich die Genexpression schon zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der DCIS-Entstehung stark ändert, wird durch mehrere Untersuchungen gestützt. So zeigt eine

von Namba et al. (Namba et al. 2006; Namba et al. 2004) durchgeführte Studie an einem anderen DCIS-Mausmodell, dass die molekularen Veränderungen in der Krebsentstehung bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt auftreten und demzufolge der Übergang von der Vorstufe zum invasiven Brustkrebs eher mit geringen Änderungen in der Genexpression verbunden ist. Auch in humanen Proben konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass der Übergang vom DCIS zum IDC, bezogen auf die Genexpression, eher ein quantitativer, als ein qualitativer Schritt ist (Ma et al. 2003; Porter et al. 2003). Ebenso zeigten Allinen et al. (Allinen et al. 2004), mittels Genexpressionsanalysen von normalem Brustgewebe, DCIS und invasiven Brustkrebs, dass die Veränderungen in der Genexpression, welche im invasiven Tumor zu finden waren, auch schon in den DCIS Proben gefunden werden konnten.

Um einen Überblick über die Funktion und die zelluläre Lage der 140 identifizierten Kandidatengene zu erhalten, wurde eine GO-Analyse durchgeführt. Es zeigte sich, dass innerhalb der signifikanten GO-Kategorien eine Vielzahl der GO-Kategorien mit dem Zellzyklus bzw. der Zellteilung in Verbindung standen. Ebenfalls war die Lage der Genprodukte in der Zelle häufig mit den Zellteilungskompartimenten assoziiert. Somit zeigt sich bereits im DCIS Stadium eine deutlich erhöhte Zellteilungsrate. Diese korreliert mit der Kenntnis einer generell erhöhten Zellteilungsrate in invasiven Karzinomen.

Aus den 140 Kandidatengenen wurden selektiv einzelne potentielle DCIS-Marker herausgesucht. Final wurden sieben DCIS-Marker identifiziert. Die Selektion wurde anhand der Expression der Gene in den einzelnen Gruppen (gesunde Kontrollen, Monatsgruppen, IDCs) durchgeführt. Es wurden ausschließlich Gene ausgewählt, welche in den Kontrollgruppen eine deutlich geringere Expression zeigten, als in den anderen Gruppen. Bei den identifizierten Genen handelte es sich um: *Muc1*, *Spp1*, *Exo1*, *Foxm1*, *Rrm2*, *Depdc1* und *Nusap1*.

Mit Hilfe der sieben identifizierten potentiellen DCIS-Marker wurde ein Supervised Hierarchical Clustering durchgeführt und die Ergebnisse in einem Dendrogramm dargestellt. Dieses zeigte die Negativkontrollen deutlich separiert von den Proben der verschiedenen Monate sowie von den invasiven Mammakarzinomen. Folglich ist es möglich, mit Hilfe der sieben Kandidatengene maligne von gesunden Geweben zu unterscheiden. Weiterhin war festzustellen, dass die sieben Kandidatengene im Clustering ein äquivalentes Resultat lieferten wie die Liste der 140 Kandidatengene.



Die in der Mikroarray-Analyse identifizierte Expression der sieben Kandidatengene, wurde mittels quantitativer RT-PCR validiert. Die Gene zeigten in den prämaligen und malignen Gruppen eine deutlich höhere Expression. Zusammenfassend kann man sagen, dass die durch die quantitative RT-PCR ermittelten Expressionswerte, die mittels GeneChip®-Analyse gefundenen Ergebnisse widerspiegeln.

Die identifizierten DCIS-Marker weisen einen unterschiedlichen Bekanntheitsstatus in Bezug auf Brustkrebs bzw. DCIS auf. So sind die Gene *Muc1* und *Spp1* sowohl im Zusammenhang mit Brustkrebs, als auch im Zusammenhang mit DCIS bereits mehrfach untersucht worden. Auch *Rrm2* und *Foxm1* wurden schon in diesem Zusammenhang diskutiert. Hingegen ist für die Gene *Exo1*, *Depdc1* und *Nusap1* keine Assoziation zu Brustkrebs bekannt. Im Folgenden wird näher auf die Eigenschaften sowie die Verbindung der identifizierten DCIS-Marker zum Brustkrebs bzw. DCIS eingegangen.

MUC1 zeigt in Tumoren allgemein eine deutlich erhöhte Expression. Außerdem ist die Glykosylierung sowie die Lokalisierung von MUC1 in Tumoren verändert (Singh and Bandyopadhyay 2007). Eine Überexpression von MUC1 in verschiedenen Krebsarten, aber besonders in Brustkrebs, korreliert mit einer höheren Metastasierungswahrscheinlichkeit sowie einer verkürzten Überlebensrate (Gendler 2001; Hatrup and Gendler 2006). Es ist ebenfalls bekannt, dass MUC1 häufig in DCIS überexprimiert ist (Nishidate et al. 2004).

Osteopontin (*SPP1*) ist ein phosphoryliertes Glykoprotein, welches von verschiedenen Zelltypen sekretiert wird (Rodrigues et al. 2007; Tuck and Chambers 2001). *SPP1* ist in einer Vielzahl von physiologischen Zellfunktionen involviert, wie der Inflammation, der Mineralisierung und der Blutgefäßbildung (Coppola et al. 2004; El-Tanani et al. 2006; Rodrigues et al. 2007; Tuck and Chambers 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass *SPP1* in Entwicklungsprozessen, wie der Gewebedifferenzierung und der Wundheilung eine Rolle spielt (Tuck et al. 2007). Eine *SPP1* Überexpression wurde in einer Vielzahl von Krebsarten festgestellt, z.B. im Brustkrebs, Lungenkrebs, Darmkrebs, Magenkrebs, Eierstockkrebs und Hautkrebs (Patani et al. 2008; Rodrigues et al. 2007). Das Expressionslevel von *SPP1* im Mammakarzinom korreliert mit dem Stadium der Erkrankung (Rodrigues et al. 2007). Eine hohe *SPP1* Expression im Primärtumor des Mammakarzinoms wird mit einer hohen Metastasierungswahrscheinlichkeit und einer schlechten Prognose assoziiert (El-Tanani et al. 2006). Generell wird *SPP1* in Brustkrebs mit der Progression, der Invasion sowie der Metastasierung in Zusammenhang gebracht (Coppola et al. 2004; Furger et al. 2001; Tuck and Chambers 2001; Wai and Kuo 2008). Untersuchungen zur prognostischen Relevanz von *SPP1* bei Brustkrebspatientinnen mit Stage I und II Tumoren zeigten, dass die Überlebensrate der *SPP1*

negativen Patientinnen, mehr als dreifach so hoch war, wie das der Patientinnen, in denen SPP1 nachgewiesen werden konnte (Rudland et al. 2002). Reinholz et al. (Reinholz et al. 2002) untersuchten die Expression von SPP1 in gesundem Gewebe, DCIS, invasivem und metastasiertem Brustkrebs. Sie konnten nachweisen, dass das mRNA Level von SPP1 bereits in den DCIS Geweben, verglichen mit den gesunden Geweben, deutlich erhöht war.

RRM2 ist eine Ribonukleotidreduktase (RR). Ribonukleotidreduktasen sind in der DNA-Synthese von entscheidender Bedeutung (Cory and Sato 1983), da sie für die Umwandlung von Ribonukleotid-Diphosphaten in Desoxyribonukleotid-Diphosphate zuständig sind (Cory and Sato 1983; Thelander and Berg 1986). Ribonukleotidreduktasen bestehen aus zwei Untereinheiten: der M1 und der M2 Untereinheit (RRM1 + RRM2). Das Level von RRM1 ist im Verlauf des Zellzyklusses verhältnismäßig konstant, wohingegen RRM2 nur in der späten G1 Phase bzw. der frühen S Phase exprimiert wird (Engstrom et al. 1985). Veränderungen im Ribonukleotidreduktase Level können signifikanten Einfluss auf die Tumorentstehung sowie die Tumorprogression haben. So zeigt RRM2 sowohl im Tumorzelllinie, als auch in Tumoren eine erhöhte Expression (Jensen et al. 1994). RRM2 spielt eine entscheidende Rolle in der Bestimmung der Tumormalignität. Eine Überexpression von RRM2 erhöht das Potential eines Tumors invasiv oder metastatisch zu werden, signifikant (Zhang et al. 2009). Die Inhibition der RRM2 Expression durch siRNA führte *in vitro* zu einer Hemmung des Zellwachstums, *in vivo* zu einer Hemmung des Tumorwachstums (Heidel et al. 2007). Daher gibt es bereits erste Ansätze, bei denen ein Knockdown von RRM2 als Therapie bei fortgeschrittenen soliden Tumoren ausgetestet wird (Desai et al. 2005).

Der Transkriptionsfaktor FOXM1 (forkhead box M1) stimuliert die Proliferation und das Voranschreiten des Zellzyklus durch Förderung des Eintritts der S-Phase sowie der Mitose. Dementsprechend reguliert FOXM1 die Expression von Genen, welche den G1/S-Übergang, den S-Phasen Verlauf, den G2/M-Übergang oder den M-Phasen Verlauf kontrollieren. FOXM1 ist in die Tumorentwicklung verwickelt und bewirkt, sowohl die Entstehung von Tumoren, als auch das Wachstum von Tumoren (Wierstra and Alves 2007). In einer großen Genexpressionsanalyse konnte festgestellt werden, dass FOXM1 in den meisten soliden Tumoren eine erhöhte Expression zeigte (Pilarsky et al. 2004). Insgesamt konnte eine Überexpression von FOXM1 in über 20 verschiedenen humanen Tumoren nachgewiesen werden (Wierstra and Alves 2007). Somit ist FOXM1 eines der am häufigsten überexprimierten Gene in humanen Tumoren (Bhat et al. 2009). Auch im Brustkrebs ist FOXM1 signifikant überexprimiert (Wonsey and Follettie 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass das Level der FOXM1 Expression mit dem Tumorgrad ansteigt (Kalin et al. 2006; Wonsey and

Follettie 2005) sowie, dass die Expression von FOXM1 mit einer schlechten Prognose und somit einer kürzeren Überlebenszeit korreliert (Bektas et al. 2008). Es konnte auch gezeigt werden, dass FOXM1 bereits beim Übergang von DCIS zu invasivem Brustkrebs eine erhöhte Expression zeigt (Nishidate et al. 2004). In einem transgenen Mausmodell wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte FOXM1 Expression zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen führt (Wang et al. 2008). Ein Verlust der FOXM1 Expression durch siRNA hingegen, resultiert im Zelltod durch Defekte des mitotischen Spindelapparates. Daher stellt die Inhibierung von FOXM1 eine mögliche therapeutische Strategie zur Behandlung von Brustkrebs dar (Wonsey and Follettie 2005). Deshalb wird bereits an der Entwicklung eines Medikamentes zur Inhibierung von FOXM1 gearbeitet (Bhat et al. 2008; Gartel 2008; Kwok et al. 2008). Auch wird FOXM1 als mögliches Target für eine Immuntherapie gegen Krebs diskutiert (Yokomine et al. 2009).

Bis heute ist die Exonuklease 1 (EXO1) die einzige, im Menschen identifizierte Exonuklease (Liberti and Rasmussen 2004). EXO1 ist in die DNA-Mismatch Reparatur eingebunden. Genauer wird EXO1 in den humanen Zellen für die Beseitigung von Einzelnukleotid-Mismatches benötigt (Wei et al. 2003). Bezüglich einer tumorassoziierten Überexpression von EXO1 ist bisher sehr wenig bekannt. Es wurde aber bereits ein erhöhtes Expressionslevel von EXO1 in Leberkarzinom Zelllinien sowie in Kolonkarzinom und Pankreaskarzinomen Geweben nachgewiesen (Rasmussen et al. 2000).

DEPDC1 (DEP domain containing 1) wurde im Jahr 2007 als ein neues Gen identifiziert, welches in Blasenkrebszellen eine starke erhöhte Expression aufweist (Kanehira et al. 2007). Dies gelang durch Verwendung von cDNA Mikroarrays, mit deren Hilfe signifikant veränderte Gene in Blasenkrebs identifiziert wurden. Die erhöhte Expression von DEPDC1, wurde mittels Northern-Blot bestätigt. Obwohl DEPDC1 eine hoch konservierte DEP Domäne (Ponting and Bork 1996) enthält, ist seine pathophysiologische Rolle, in Bezug auf das Krebswachstum, bisher unerforscht. Die DEP Domäne ist Bestandteil vieler Signaling Moleküle. Außerdem ist die DEP Domäne an der Membran Bindung beteiligt (Chen and Hamm 2006).

Das Nucleolar spindle-associated protein (NUSAP1) wurde 2003 als ein 55 Kilodalton großes Protein identifiziert, welches speziell in proliferierenden Zellen exprimiert wird (Raemaekers et al. 2003). Die höchste NUSAP1 Expression (sowohl auf mRNA als auch auf Protein Level) wurde beim Übergang von der G2 Phase zur Mitose festgestellt. Nach der Zellteilung sinkt die NUSAP1 Expression schlagartig ab. NUSAP1 wird hauptsächlich im Kern exprimiert und befindet sich während der Mitose überwiegend an den Mikrotubuli des Spindelapparates.

*In-vitro*-Experimente haben gezeigt, dass NUSAP1 einen direkten Effekt auf die Mikrotubuli hat. Zum einen stabilisiert NUSAP1 die Mikrotubuli gegen Depolimerisierung, zum anderen vernetzt es große Mikrotubulimengen untereinander (Ribbeck et al. 2006). Mit Hilfe einer Expressionsanalyse mehrerer Melanom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass NUSAP1 in Melanomzellen überexprimiert ist (Ryu et al. 2007). Ein Knockdown von NUSAP1 in *Xenopus* Oozyten führte zu abweichenden Spindelformationen, einer fehlerhaften Teilung der Chromosomen und letztendlich zu einer blockierten Zellproliferation (Ribbeck et al. 2006).

Die Tatsache, dass einige der identifizierten DCIS-Marker schon im Zusammenhang mit Brustkrebs beschrieben wurden, dient als Bestätigung des verwendeten WAP-TNP8 DCIS-Mausmodells. Somit wird deutlich, dass die im Mausmodell identifizierten Marker auch im humanen Brustkrebs von Bedeutung sind. Das Verhältnis von bekannten und eher unbekanntem Genen innerhalb der sieben identifizierten DCIS-Marker ist sehr ausgewogen. Den im Zusammenhang mit DCIS ermittelten unbekanntem Genen wird hier ein hoher Stellenwert beigemessen, da ihre Funktionen im Zusammenhang mit Brustkrebs bzw. Krebs allgemein bisher noch nicht erforscht wurden. Sie stellen besonders vielversprechende DCIS-Marker dar.

Um die im Mausmodell identifizierten DCIS-Marker auf ihre Expression im humanen Gewebe zu untersuchen, wurde als zweiter Teil des Projektes eine Mikroarray Analyse humaner Gewebe durchgeführt. Hierbei wurden neun DCIS, fünf invasiv duktales Tumore und fünf Proben gesundes Brustgewebe untersucht.

Die Qualitätskontrollen wurden analog zu der Qualitätskontrolle der murinen GeneChips® durchgeführt. Zuerst wurden die Affymetrix Qualitäts-Kontrollmaße überprüft. Der Background, RawQ und der Scaling Factor lagen alle im vorgegebenen Bereich. Das 3'- zu 5'-Verhältnisse der internen Kontrollen *ACTB* und *GAPDH* lagen überwiegend unter drei, nur bei wenigen Mikroarrays war der Wert für *ACTB* geringgradig erhöht. Nach erfolgreicher Normalisierung wurde jeweils ein Korrelations-Plot, eine PCA-Plot sowie ein Unsupervised Hierarchical Clustering der humanen Proben dargestellt. Im Korrelationsplot zeigte sich, dass die gesunden Proben nicht mit den DCIS und den invasiven Tumoren korrelieren. Dafür korrelierten die gesunden Proben untereinander sehr gut. Somit ließ sich feststellen, dass die gesunden Proben sich in ihrer Expression stark ähneln. Die Korrelation der gesunden Proben mit den DCIS Proben war dagegen vergleichsweise schwach. Daraus ließ sich schließen, dass die DCIS in ihrer Expression eher den IDC ähneln, als den gesunden Geweben. Dies wurde durch die vergleichsweise hohen Korrelationskoeffizienten zwischen den DCIS und den IDC

bestärkt. Im PCA-Plot lagen die einzelnen Gruppen deutlich voneinander separiert. Das Unsupervised Hierarchical Clustering der humanen GeneChips® zeigte, dass die gesunden Proben mit Ausnahme einer Probe separiert von den anderen Proben clustern. Dies zeigt wiederum, dass die gesunden Proben sich deutlich von den DCIS Proben unterscheiden, welche aufgrund ihrer Expression zusammen mit den IDCs clusterten. Die DCIS Proben trennten sich innerhalb des malignen Armes in zwei Gruppen auf. So waren vier DCIS Proben zusammen in einer Gruppe mit den invasiven Karzinomen zu finden, wohingegen die anderen fünf DCIS Proben zusammen mit einer gesunden Kontrolle clusterten. Aus dieser Gruppierung könnte man auf einen unterschiedlichen Malignitätsgrad der beiden Gruppen schließen, was jedoch anhand der histologischen Daten nicht bestätigt werden konnte. Auch war histologisch kein Hinweis zu finden, weshalb eine der gesunden Proben im Arm der DCIS clusterte.

Nach dieser eingehenden Qualitätskontrolle wurden schließlich die, im WAP-TNP8 Mausmodell identifizierten potentiellen DCIS-Marker, näher betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die identifizierten DCIS-Marker auch in den humanen DCIS und IDC Proben eine deutlich erhöhte Expression aufwiesen. Zusätzlich wurden die sieben DCIS-Marker für ein Supervised Hierarchical Clustering der humanen Proben verwendet. Hierbei war zu erkennen, dass mittels der identifizierten DCIS-Marker deutlich zwischen gesundem Gewebe und malignem Gewebe unterschieden werden konnte. Die gesunden Kontrollgewebe bildeten eine abgetrennte Gruppe im Clustering. Auch anhand der Darstellung der Expression der DCIS-Marker in den drei Gruppen (gesund, DCIS, IDC) konnte gezeigt werden, dass die Expression der sieben identifizierten Marker in allen DCIS Proben sowie in allen invasiven Karzinomen signifikant erhöht war.

Zur Validierung der Mikroarray-Ergebnisse wurde bei den humanen Proben ebenfalls eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Hierbei entsprach die Expression der sieben DCIS-Marker in der qRT-PCR, den Expressionsdaten der Mikroarrays. Somit wurde gezeigt, dass das verwendete Mausmodell die humanen Veränderungen während der DCIS Entstehung sehr gut repräsentiert.

Um Gemeinsamkeiten zwischen humanem und murinem Brustkrebs zu zeigen, verglichen Klein et al. (Klein et al. 2007) die Expression von 24 humanen Tumoren mit sechs Tumoren aus WAP-SV40T/t Mäusen. Dieser Expressionsvergleich veranschaulichte, dass 63 Gene in beiden Geweben verändert waren. Unter diesen 63 Genen war auch das Gen *RRM2*. Weiterhin wurde im Anhang der Publikation von Klein et al. eine Genliste für den Vergleich normaler

Brustdrüsen gegen Brusttumoren gezeigt. Diese Genliste umfasste 597 überexprimierte Gene und enthielt unter anderem die Gene *DEPDC1*, *NUSAP1*, *MUC1*, *EXO1* und *RRM2*. WAP-SV40-Mausmodelle sind somit ein geeignetes Modell, um die molekularen Eigenschaften von DCIS-Läsionen zu analysieren. Sie weisen sowohl auf histologischer, als auch auf molekularer Ebene, große Übereinstimmungen mit humanen Tumoren auf.

Die in dieser Studie identifizierten DCIS-Marker, wurden teilweise bereits in anderen Genexpressionsanalysen detektiert. Meist waren sie jedoch Bestandteil einer umfangreichen Genliste und wurden nicht detailliert analysiert. So waren die Gene *MUC1* und *FOXMI* in der von Nishidate et al. (Nishidate et al. 2004) durchgeführten Analyse, von invasiven Mammakarzinomen und DCIS Proben signifikant mit der Progression und Metastasierung assoziiert. Innerhalb der von Martin et al. (Martin et al. 2008) entwickelten 22 Gensignatur, welche zur Vorhersage des Verlaufes von Brustkrebs entwickelt wurde, waren die Gene *RRM2* und *FOXMI* enthalten. Außerdem war *RRM2* bereits in dem von Ma et al. (Ma et al. 2003) entwickelten Gene Expression Index enthalten. Die im Anhang befindlichen Genlisten überexprimierter Gene von Vincent-Salomon et al. auf (Vincent-Salomon et al. 2008) weisen die beiden Gene *RRM2* und *NUSAP1*. Zuletzt wurden in der DCIS-Analyse von Balleine et al. (Balleine et al. 2008), welche eine molekulare Unterscheidung der DCIS-Läsionen untereinander anstrebte, die Gene *EXO1*, *RRM2*, *NUSAP1* und *FOXMI* identifiziert. Dies bestätigt, dass die in dieser Arbeit identifizierten DCIS-Marker in mehreren Datensätzen verschiedener humaner Gewebeproben, ebenfalls eine erhöhte Expression zeigten.

Eine weitere Validierung der identifizierten DCIS-Marker war mit Hilfe der ONCOMINE-Datenbank möglich. So wurden bei dem Vergleich gesunder Brustgewebe, gegen invasiven Brustkrebs, mittels ONCOMINE sechs der sieben DCIS-Marker in dem Datensatz von Richardson et al. (Richardson et al. 2006) als signifikant hochreguliert identifiziert. *MUC1* war in dieser Analyse nicht signifikant hochreguliert, zeigte aber in den vorangegangenen Untersuchungen, ebenfalls eine geringere Expression in den IDC, als in den DCIS Proben. Insgesamt bestätigte die Analyse mittels ONCOMINE, dass die identifizierten DCIS-Marker auch in anderen Datensätzen eine signifikant erhöhte Expression zeigen. Weiterhin konnte mit Hilfe von ONCOMINE dokumentiert werden, dass bezüglich des Tumorgrades mit Ausnahme von *MUC1* und *SPPI*, alle Gene mit einem hohen Tumorgrad assoziiert waren. Eine mögliche Erklärung für die Assoziation der identifizierten DCIS-Marker mit einem hohen Tumorgrad, könnte der hohe Anteil der high-grade DCIS sein, welche für die Analyse

verwendet wurden. Weiterhin waren mit Ausnahme von MUC1, alle identifizierten Gene mit einer schlechten Prognose assoziiert. Daher ist davon auszugehen, dass die identifizierten DCIS-Marker nicht nur der Detektion von DCIS dienlich sind, sondern auch prognostische Relevanz besitzen. DCIS, welche die identifizierten DCIS-Marker stark exprimierten, können mit höherer Wahrscheinlichkeit invasiv werden. Dies legen auch einige der bereits erwähnten DCIS-Mikroarray-Studien nahe (Balleine et al. 2008; Ma et al. 2003; Nishidate et al. 2004).

Um die Expression, der in dieser Studie identifizierten DCIS-Marker auch auf Proteinniveau zu bestätigen, wurden immunhistochemische Färbungen humaner Gewebe mit Hilfe spezifischer Antikörper durchgeführt (Abb. 21). Für die sechs dargestellten DCIS-Marker (MUC1, SPP1, RRM2, FOXM1, DEPDC1, NUSAP1) war zu erkennen, dass die Expression des jeweiligen Proteins in den DCIS-Geweben (low-grade DCIS, high-grade DCIS) deutlich anstieg. Die gesunden Kontrollen der Proteine MUC1, RRM2 sowie NUSAP1, zeigten keine Färbung, wohingegen sich bei den Proteinen SPP1, FOXM1 und DEPDC1 eine geringgradige Färbung zeigte. Diese geringgradige Färbung ist ein Zeichen dafür, dass die Proteine auch im gesunden Zustand in der Zelle exprimiert werden.

Für das Protein SPP1 wurde bereits durch immunhistochemische Färbungen nachgewiesen, dass schon low-grade DCIS eine deutlich erhöhte Expression von SPP1 zeigen (Oyama et al. 2002). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Für das Protein RRM2 wurde nachgewiesen, dass es in Krebszelllinien eine erhöhte Expression zeigte (Lee et al. 2006). Nun konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass RRM2 *in vivo* in DCIS und IDC eine deutlich erhöhte Expression aufweist. Für MUC1 wurde bereits in einer großen immunhistochemischen Studie gezeigt, dass MUC1 in allen untersuchten DCIS Fällen exprimiert wurde (de Roos et al. 2007). Außerdem wurde für MUC1 in immunhistochemischen Färbungen humaner DCIS, eine luminale sowie eine zytoplasmatische Färbung beobachtet (Diaz et al. 2001). Dies stimmt mit den vorliegenden Ergebnissen überein, da in den DCIS Proben eine Färbung der Lumen der Milchgänge festzustellen war. Dabei bestand die Mehrheit der gefärbten Zellen aus Epithelzellen. Bei den Proteinen FOXM1, DEPDC1 und NUSAP1 waren ebenfalls die epithelialen Bestandteile gefärbt. Zusätzlich waren auch im Stroma einzelne gefärbte Zellen zu erkennen. Hierbei handelt es sich um Immunzellen. Für FOXM1 zeigten Bektas et al. (Bektas et al. 2008) bereits, dass das Protein in Brustkrebsgewebe überexprimiert ist. DEPDC1 wurde bisher nur im Blasenkrebs immunhistologisch untersucht (Kanehira et al. 2007). Dabei wurde unter anderem eine starke endogene Expression von DEPDC1 im Zellkern gezeigt. Diese war aufgrund der HE-Gegenfärbung in der vorliegenden

Untersuchung nicht zu erkennen. Hingegen konnte eine zytoplasmatische Färbung von DEPDC1 beobachtet werden. Auch NUSAP1 ist nukleär lokalisiert. Durch Überexpression von NUSAP1 konnte gezeigt werden, dass es im Zellkern zu einer Sättigung der NUSAP1 Expression kommt und NUSAP1 daraufhin auch zytoplasmatisch nachgewiesen werden kann (Raemaekers et al. 2003). NUSAP1 war in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich zytoplasmatisch nachweisbar, da eine eventuelle Kernfärbung aufgrund der HE-Gegenfärbung nicht dargestellt werden konnte.

Über das Gen *DEPDC1* sowie über die Funktion der darin enthaltenen DEP-Domäne (Disheveled, EGL-10, Pleckstrin-Domäne), ist bisher wenig bekannt. Viele an Signaltransduktionsprozessen beteiligte Proteine enthalten jedoch diese Proteininteraktionsdomäne (Martemyanov et al. 2003). Um die Funktion von *DEPDC1* besser zu charakterisieren, wurden RNA-Interferenz Untersuchungen durchgeführt. In den verwendeten MDA-MB 231 Zellen konnte durch spezifischer siRNA gegen *DEPDC1* ein Knockdown-Effekt von etwas 80 % erreicht werden. Die sich anschließenden funktionellen Analysen zeigten, dass einerseits das Wachstum der *DEPDC1* siRNA behandelten Zellen minimiert war, zum anderen, sowohl bei der Migrationsfähigkeit, als auch bei der Invasionsfähigkeit, deutliche Einschränkungen bestanden. Somit lässt sich schlussfolgern, dass das Gen *DEPDC1* für die Invasion der Tumorzellen von entscheidender Bedeutung ist. Außerdem würde die Inhibition der *DEPDC1* Expression eine mögliche Therapie für DCIS- und Brustkrebspatientinnen darstellen. Bereits bei dem von Kanehira et al. (Kanehira et al. 2007) durchgeführten *DEPDC1* Knockdown in Blasenkrebszellen wurde gezeigt, dass die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien sowie die Viabilität der Zellen, mit verminderter *DEPDC1* Expression signifikant eingeschränkt waren. Ferner zeigten Kanehira et al., dass die Apoptoserate in den *DEPDC1* siRNA behandelten Zellen leicht erhöht war. Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung zur Apoptosehäufigkeit von MDA-MB 231 Zellen mit verringerter *DEPDC1* Expression nicht bestätigt werden. Dies bedeutet, dass die Expression von *DEPDC1* keinen Einfluss auf das apoptotische Verhalten der MDA-MB 231 Zellen hat. Die abweichenden Ergebnisse im Bezug auf die Apoptose sind möglicherweise den unterschiedlichen verwendeten Zelllinien zuzuschreiben. Außerdem war bei den von Kanehira et al. durchgeführten Apoptoseversuchen allgemein eine recht hohe Apoptoserate zu verzeichnen. Dies weist darauf hin, dass einige der Zellen durch die Transfektion in die Apoptose übergegangen sind.



Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sieben DCIS-Marker identifiziert werden konnten, welche sowohl für die Detektion, als auch für die Prognose von DCIS von Bedeutung sind. Die Beobachtung, dass die Genexpression der DCIS-Läsionen der Genexpression der invasiven Mammakarzinomen sehr stark ähnelt, zeigt von welcher Relevanz eine frühe Erfassung und Behandlung des DCIS ist. Die Expression der identifizierten DCIS-Marker ist bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der DCIS-Entstehung signifikant verstärkt, was für die Verwendung als Detektionsmarker von entscheidender Bedeutung ist. Die identifizierten DCIS-Marker können als Ansatzpunkt für verschiedene Detektionsmöglichkeiten herangezogen werden. So könnten fluoreszenz- bzw. radionuklidmarkierte Antikörper oder fluoreszenz- bzw. radionuklidmarkierte niedermolekulare synthetische Moleküle (Small Molecules), welche an die identifizierten DCIS-Marker binden, synthetisiert werden. Kombiniert mit der Technik der Mammographie, könnte ein solcher Ansatz die Detektion von DCIS-Läsionen entscheidend verbessern. Durch eine Verbesserung der DCIS-Detektion wird es aufgrund der guten Behandlungsmöglichkeiten des DCIS langfristig zu einer deutlichen Senkung der Brustkrebsmortalität kommen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer molekularer Marker für das duktales *In-situ*-Karzinom (DCIS) der Mamma. Das DCIS ist ein gut zu therapierender Vorläufer des invasiven Mammakarzinoms. Da die Detektion des DCIS zum gegenwärtigen Zeitpunkt unzureichend ist, wurde mit Hilfe der Mikroarray-Technologie nach molekularen Markern gesucht, welche in Zukunft eine frühere und präzisere Detektion des DCIS erlauben sollen.

Unter Verwendung eines Mausmodells für das duktales *In-situ*-Karzinom war es möglich, sieben DCIS-Marker zu identifizieren, welche eine signifikant erhöhte Expression in den DCIS und den invasiven Tumorgeweben zeigten. Die im Mausmodell identifizierten DCIS-Marker sind: *Muc1*, *Spp1*, *Rrm2*, *Foxm1*, *Exo1*, *Depdc1* und *Nusap1*. Es ist hervorzuheben, dass die Expression der identifizierten DCIS-Marker bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt in der DCIS-Entstehung signifikant verstärkt war. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR konnte die Expression der identifizierten DCIS-Marker validiert werden. Zusätzlich wurde die Expression der DCIS-Marker in einer Gruppe humaner Gewebe analysiert. Hierbei konnte bestätigt werden, dass die identifizierten DCIS-Marker auch in den humanen Karzinomgeweben eine signifikant erhöhte Expression zeigten. Außerdem war zu beobachten, dass das Expressionsprofil der DCIS-Läsionen weitgehend mit dem invasiver Mammakarzinome übereinstimmt. Die differentielle Expression der identifizierten DCIS-Marker in den humanen Karzinomgeweben wurde *in vivo* mittels Immunhistochemie auch auf Proteinniveau bestätigt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Mehrzahl der identifizierten DCIS-Marker ebenso in anderen Patientenkohorten prognostische Relevanz besitzen. Die Übereinstimmung der Genexpression der DCIS-Läsionen mit der Expression der invasiven Karzinome verdeutlicht die Relevanz einer frühen Erfassung und Behandlung des DCIS.

Bei den identifizierten DCIS-Markern *EXO1*, *DEPDC1* und *NUSAPI* handelt es sich um Gene, welche im Kontext des Mammakarzinoms bisher nicht in Erscheinung getreten sind. Da über die Funktion des Gens *DEPDC1* zum gegenwärtigen Zeitpunkt wenig bekannt ist, wurden durch RNA-Interferenz und anschließende funktionelle Analysen das Gen *DEPDC1* näher charakterisiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *DEPDC1* für das Wachstum, die Migration sowie die Invasion von humanen Brustkrebszellen von Relevanz ist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit den durchgeführten Analysen sieben DCIS-Marker identifiziert werden konnten, welche sowohl für die frühe Detektion, als auch für die Prognose von DCIS von Bedeutung sind. Durch eine Verbesserung der DCIS-Detektion wird es langfristig zu einer deutlichen Senkung der Brustkrebsmortalität kommen.

## 6. Summary

The ductal carcinoma *in situ* (DCIS) of the mammary gland represents an early, pre-invasive stage in the development of invasive breast carcinoma. At this point in time detection of DCIS is suboptimal, up to 45 % of DCIS are not identified by mammography. Since DCIS is a highly curable disease, identification of molecular markers that allow a better detection of DCIS is highly desirable.

Mice, which are transgenic for the WAP-SV40 early genome region, served as a model for the development of DCIS in this study. In order to identify specific DCIS markers, Affymetrix GeneChip® analysis was performed. By comparing healthy controls with premalignant and malignant lesions seven significantly upregulated genes were identified. The identified DCIS markers are: *Muc1*, *Spp1*, *Rrm2*, *Foxm1*, *Exo1*, *Depdc1* and *Nusap1*. All DCIS markers were validated by quantitative RT-PCR. Furthermore, the analysis revealed huge similarities in the expression profile of DCIS and invasive breast carcinomas. This accounts for the fact, that early treatment of DCIS is of great importance. As a next step, these markers were investigated in human tissue samples by microarray analysis. Besides, expression of the identified DCIS markers was validated by quantitative RT-PCR and immunohistochemistry. This investigation revealed a strong upregulation of the candidate genes in human DCIS leading to the conclusion that they work as early detection markers in human DCIS. Furthermore, it could be shown, that the identified DCIS markers are associated with a poor prognosis.

Some of the identified markers are already known to be related to DCIS, others are unknown in the context of DCIS or breast cancer. The unknown and therefore particularly interesting genes are *EXO1*, *DEPDC1* and *NUSAPI*. Since the molecular functions of *DEPDC1* are unknown, RNA interference experiments of *DEPDC1* were performed. Functional analysis showed that *DEPDC1* seems to be an important gene for proliferation as well as for migration and invasion. Hence, *DEPDC1* seems to be a very powerful tumor marker and might be suitable as a therapeutic target.

The identified DCIS markers have the power to serve as a further step in improving prognosis and therapy of DCIS, because they are useful for early detection of DCIS as well as for prognosis. An earlier detection of DCIS will benefit patient survival and treatment options.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Adeyinka A, Emberley E, Niu Y, Snell L, Murphy LC, Sowter H, Wykoff CC, Harris AL, Watson PH. 2002. Analysis of gene expression in ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 8:3788-3795.
2. Affymetrix. GeneChip® Human Genome U133 Arrays, Data Sheet. 2003.
3. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K. 2004. Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell* 6:17-32.
4. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25-29.
5. Balleine RL, Webster LR, Davis S, Salisbury EL, Palazzo JP, Schwartz GF, Cornfield DB, Walker RL, Byth K, Clarke CL, Meltzer PS. 2008. Molecular grading of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 14:8244-8252.
6. Barnes R, Masood S. 1990. Potential value of hormone receptor assay in carcinoma in situ of breast. *Am J Clin Pathol* 94:533-537.
7. Bektas N, Haaf A, Veeck J, Wild PJ, Luscher-Firzlaff J, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E. 2008. Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer. *BMC Cancer* 8:42.
8. Benson JR, Jatoi I, Keisch M, Esteva FJ, Makris A, Jordan VC. 2009. Early breast cancer. *Lancet* 373:1463-1479.
9. Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, Carter WB, Bhargavan M, Lewis RS, Ioffe OB. 2004. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology* 233:830-849.
10. Berman CG. 2007. Recent advances in breast-specific imaging. *Cancer Control* 14:338-349.
11. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. 2009. FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors. *PLoS One* 4:e6593.
12. Bhat UG, Zipfel PA, Tyler DS, Gartel AL. 2008. Novel anticancer compounds induce apoptosis in melanoma cells. *Cell Cycle* 7:1851-1855.
13. Bijker N, Meijnen P, Peterse JL, Bogaerts J, Van H, I, Julien JP, Gennaro M, Rouanet P, Avril A, Fentiman IS, Bartelink H, Rutgers EJ. 2006. Breast-conserving treatment with or without radiotherapy in ductal carcinoma-in-situ: ten-year results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer randomized phase III trial 10853--a study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. *J Clin Oncol* 24:3381-3387.

14. Bloom HJ, Richardson WW. 1957. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11:359-377.
15. Bocker W, Hungermann D, Weigel S, Roterberg K, Decker T. 2009. [Atypical ductal hyperplasia and atypical epithelial proliferation of ductal type]. *Pathologe* 30:42-48.
16. Buerger H, Mommers EC, Littmann R, Diallo R, Brinkschmidt C, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, van Diest PJ, Bocker W. 2000. Correlation of morphologic and cytogenetic parameters of genetic instability with chromosomal alterations in in situ carcinomas of the breast. *Am J Clin Pathol* 114:854-859.
17. Buerger H, Mommers EC, Littmann R, Simon R, Diallo R, Poremba C, Dockhorn-Dworniczak B, van Diest PJ, Boecker W. 2001. Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol* 194:165-170.
18. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Poremba C, Diallo R, Decker T, Riethdorf L, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. 1999a. Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of the breast-evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol* 187:396-402.
19. Buerger H, Otterbach F, Simon R, Schafer KL, Poremba C, Diallo R, Brinkschmidt C, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. 1999b. Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol* 189:521-526.
20. Castro NP, Osorio CA, Torres C, Bastos EP, Mourao-Neto M, Soares FA, Brentani HP, Carraro DM. 2008. Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* 10:R87.
21. Chaudhuri B, Crist KA, Mucci S, Malafa M, Chaudhuri PK. 1993. Distribution of estrogen receptor in ductal carcinoma in situ of the breast. *Surgery* 113:134-137.
22. Chen S, Hamm HE. 2006. DEP domains: More than just membrane anchors. *Dev Cell* 11:436-438.
23. Coppola D, Szabo M, Boulware D, Muraca P, Alsarraj M, Chambers AF, Yeatman TJ. 2004. Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res* 10:184-190.
24. Cory JG, Sato A. 1983. Regulation of ribonucleotide reductase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 53-54:257-266.
25. Cutuli B, Le-Nir CC, Serin D, Kirova Y, Gaci Z, Lemanski C, De Lafontan B, Zoubir M, Maingon P, Mignotte H, Lara CT, Edeline J, Penault-Llorca F, Romestaing P, Delva C, Comet B, Belkacemi Y. 2009. Male breast cancer. Evolution of treatment and prognostic factors. Analysis of 489 cases. *Crit Rev Oncol Hematol*.
26. de Roos MA, van d, V, Peterse JL, Patriarca C, de VJ, de Bock GH, Wesseling J. 2007. The expression pattern of MUC1 (EMA) is related to tumour characteristics and

- clinical outcome in 'pure' ductal carcinoma in situ of the breast. *Histopathology* 51:227-238.
27. Decker T, Hungermann D, Bocker W. 2009. [Prognostic and predictive factors of invasive breast cancer: update 2009]. *Pathologie* 30:49-55.
  28. Desai AA, Schilsky RL, Young A, Janisch L, Stadler WM, Vogelzang NJ, Cadden S, Wright JA, Ratain MJ. 2005. A phase I study of antisense oligonucleotide GTI-2040 given by continuous intravenous infusion in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol* 16:958-965.
  29. Deutsche Krebsgesellschaft. S-3 Leitlinien für das Mammakarzinom. 2008.
  30. Diaz LK, Wiley EL, Morrow M. 2001. Expression of epithelial mucins Muc1, Muc2, and Muc3 in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast J* 7:40-45.
  31. El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. 2006. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:463-474.
  32. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498.
  33. Ellsworth RE, Ellsworth DL, Deyarmin B, Hoffman LR, Love B, Hooke JA, Shriver CD. 2005. Timing of critical genetic changes in human breast disease. *Ann Surg Oncol* 12:1054-1060.
  34. Engstrom Y, Eriksson S, Jildevik I, Skog S, Thelander L, Tribukait B. 1985. Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem* 260:9114-9116.
  35. Erbas B, Provenzano E, Armes J, Gertig D. 2006. The natural history of ductal carcinoma in situ of the breast: a review. *Breast Cancer Res Treat* 97:135-144.
  36. Ernster VL, Barclay J, Kerlikowske K, Grady D, Henderson C. 1996. Incidence of and treatment for ductal carcinoma in situ of the breast. *JAMA* 275:913-918.
  37. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18:581-592.
  38. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
  39. Fodor SP, Rava RP, Huang XC, Pease AC, Holmes CP, Adams CL. 1993. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature* 364:555-556.
  40. Funke M, Villena C. 2008. [Breast cancer imaging]. *Radiologie* 48:601-613.
  41. Furger KA, Menon RK, Tuck AB, Bramwell VH, Chambers AF. 2001. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* 1:621-632.

42. Gartel AL. 2008. FoxM1 inhibitors as potential anticancer drugs. *Expert Opin Ther Targets* 12:663-665.
43. Gendler SJ. 2001. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:339-353.
44. Geyer FC, Decker T, Reis-Filho JS. 2009. [Genome-wide expression profiling as a clinical tool: are we there yet?]. *Pathologie* 30:141-146.
45. Green JE, Shibata MA, Yoshidome K, Liu ML, Jorcyk C, Anver MR, Wigginton J, Wiltrout R, Shibata E, Kaczmarczyk S, Wang W, Liu ZY, Calvo A, Couldrey C. 2000. The C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mouse model of mammary cancer: ductal epithelial cell targeting with multistage progression to carcinoma. *Oncogene* 19:1020-1027.
46. Grimm MO, Hartmann FH, Schulz WA. 2004. [Microarrays]. *Urologe A* 43:653-658.
47. Hannemann J, Velds A, Halfwerk JB, Kreike B, Peterse JL, van de V. 2006. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Res* 8:R61.
48. Hardiman G. 2004. Microarray platforms--comparisons and contrasts. *Pharmacogenomics* 5:487-502.
49. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, Richter J, Rubin GM, Blake JA, Bult C, Dolan M, Drabkin H, Eppig JT, Hill DP, Ni L, Ringwald M, Balakrishnan R, Cherry JM, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel S, Fisk DG, Hirschman JE, Hong EL, Nash RS, Sethuraman A, Theesfeld CL, Botstein D, Dolinski K, Feierbach B, Berardini T, Mundodi S, Rhee SY, Apweiler R, Barrell D, Camon E, Dimmer E, Lee V, Chisholm R, Gaudet P, Kibbe W, Kishore R, Schwarz EM, Sternberg P, Gwinn M, Hannick L, Wortman J, Berriman M, Wood V, de la CN, Tonellato P, Jaiswal P, Seigfried T, White R. 2004. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res* 32:D258-D261.
50. Hattrup CL, Gendler SJ. 2006. MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 8:R37.
51. Heber S, Sick B. 2006. Quality assessment of Affymetrix GeneChip data. *OMICS* 10:358-368.
52. Heidel JD, Liu JY, Yen Y, Zhou B, Heale BS, Rossi JJ, Bartlett DW, Davis ME. 2007. Potent siRNA inhibitors of ribonucleotide reductase subunit RRM2 reduce cell proliferation in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 13:2207-2215.
53. Holland R, Peterse JL, Millis RR, Eusebi V, Faverly D, van de V, Zafrani B. 1994. Ductal carcinoma in situ: a proposal for a new classification. *Semin Diagn Pathol* 11:167-180.
54. Jensen RA, Page DL, Holt JT. 1994. Identification of genes expressed in premalignant breast disease by microscopy-directed cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9257-9261.

55. Kalin TV, Wang IC, Ackerson TJ, Major ML, Detrisac CJ, Kalinichenko VV, Lyubimov A, Costa RH. 2006. Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. *Cancer Res* 66:1712-1720.
56. Kanehira M, Harada Y, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y, Katagiri T. 2007. Involvement of upregulation of DEPDC1 (DEP domain containing 1) in bladder carcinogenesis. *Oncogene* 26:6448-6455.
57. Klein A, Wessel R, Graessmann M, Jurgens M, Petersen I, Schmutzler R, Niederacher D, Arnold N, Meindl A, Scherneck S, Seitz S, Graessmann A. 2007. Comparison of gene expression data from human and mouse breast cancers: identification of a conserved breast tumor gene set. *Int J Cancer* 121:683-688.
58. Kuerer HM, Albarracin CT, Yang WT, Cardiff RD, Brewster AM, Symmans WF, Hylton NM, Middleton LP, Krishnamurthy S, Perkins GH, Babiera G, Edgerton ME, Czerniecki BJ, Arun BK, Hortobagyi GN. 2009. Ductal carcinoma in situ: state of the science and roadmap to advance the field. *J Clin Oncol* 27:279-288.
59. Kuhl CK, Schrading S, Bieling HB, Wardelmann E, Leutner CC, Koenig R, Kuhn W, Schild HH. 2007. MRI for diagnosis of pure ductal carcinoma in situ: a prospective observational study. *Lancet* 370:485-492.
60. Kurreck J. 2009. RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:1378-1398.
61. Kwok JM, Myatt SS, Marson CM, Coombes RC, Constantinidou D, Lam EW. 2008. Thiostrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression. *Mol Cancer Ther* 7:2022-2032.
62. Lakhani SR. 1999. The transition from hyperplasia to invasive carcinoma of the breast. *J Pathol* 187:272-278.
63. Leal CB, Schmitt FC, Bento MJ, Maia NC, Lopes CS. 1995. Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 75:2123-2131.
64. Lebeau A. 2006. [Prognostic factors in ductal carcinoma in situ]. *Pathologe* 27:326-336.
65. Lee Y, Vassilakos A, Feng N, Jin H, Wang M, Xiong K, Wright J, Young A. 2006. GTI-2501, an antisense agent targeting R1, the large subunit of human ribonucleotide reductase, shows potent anti-tumor activity against a variety of tumors. *Int J Oncol* 28:469-478.
66. Li M, Lewis B, Capuco AV, Laucirica R, Furth PA. 2000. WAP-TAg transgenic mice and the study of dysregulated cell survival, proliferation, and mutation during breast carcinogenesis. *Oncogene* 19:1010-1019.
67. Liberti SE, Rasmussen LJ. 2004. Is hEXO1 a cancer predisposing gene? *Mol Cancer Res* 2:427-432.



68. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* 21:20-24.
69. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL. 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14:1675-1680.
70. Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, Payette T, Pistone M, Stecker K, Zhang BM, Zhou YX, Varnholt H, Smith B, Gadd M, Chatfield E, Kessler J, Baer TM, Erlander MG, Sgroi DC. 2003. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5974-5979.
71. Ma-Weiszhausz DD, Warrington J, Tanimoto EY, Miyada CG. 2006. The affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol* 410:3-28.
72. Maglione JE, McGoldrick ET, Young LJ, Namba R, Gregg JP, Liu L, Moghanaki D, Ellies LG, Borowsky AD, Cardiff RD, MacLeod CL. 2004. Polyomavirus middle T-induced mammary intraepithelial neoplasia outgrowths: single origin, divergent evolution, and multiple outcomes. *Mol Cancer Ther* 3:941-953.
73. Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. 2000. The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5:139-163.
74. Martemyanov KA, Lishko PV, Calero N, Keresztes G, Sokolov M, Strissel KJ, Leskov IB, Hopp JA, Kolesnikov AV, Chen CK, Lem J, Heller S, Burns ME, Arshavsky VY. 2003. The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo. *J Neurosci* 23:10175-10181.
75. Martin KJ, Patrick DR, Bissell MJ, Fournier MV. 2008. Prognostic breast cancer signature identified from 3D culture model accurately predicts clinical outcome across independent datasets. *PLoS ONE* 3:e2994.
76. McGall G, Labadie J, Brock P, Wallraff G, Nguyen T, Hinsberg W. 1996. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13555-13560.
77. Miller FR, Santner SJ, Tait L, Dawson PJ. 2000. MCF10DCIS.com xenograft model of human comedo ductal carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst* 92:1185-1186.
78. Moulis S, Sgroi DC. 2008. Re-evaluating early breast neoplasia. *Breast Cancer Res* 10:302.
79. Namba R, Maglione JE, Davis RR, Baron CA, Liu S, Carmack CE, Young LJ, Borowsky AD, Cardiff RD, Gregg JP. 2006. Heterogeneity of mammary lesions represent molecular differences. *BMC Cancer* 6:275.
80. Namba R, Maglione JE, Young LJ, Borowsky AD, Cardiff RD, MacLeod CL, Gregg JP. 2004. Molecular characterization of the transition to malignancy in a genetically engineered mouse-based model of ductal carcinoma in situ. *Mol Cancer Res* 2:453-463.
81. Nishidate T, Katagiri T, Lin ML, Mano Y, Miki Y, Kasumi F, Yoshimoto M, Tsunoda T, Hirata K, Nakamura Y. 2004. 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* 25:797-819.
82. Nofech-Mozes S, Spayne J, Rakovitch E, Hanna W. 2005. Prognostic and predictive molecular markers in DCIS: a review. *Adv Anat Pathol* 12:256-264.
  83. O'Connell P, Pekkel V, Fuqua S, Osborne CK, Allred DC. 1994. Molecular genetic studies of early breast cancer evolution. *Breast Cancer Res Treat* 32:5-12.
  84. Oyama T, Sano T, Hikino T, Xue Q, Iijima K, Nakajima T, Koerner F. 2002. Microcalcifications of breast cancer and atypical cystic lobules associated with infiltration of foam cells expressing osteopontin. *Virchows Arch* 440:267-273.
  85. Padmore RF, Fowble B, Hoffman J, Rosser C, Hanlon A, Patchefsky AS. 2000. Microinvasive breast carcinoma: clinicopathologic analysis of a single institution experience. *Cancer* 88:1403-1409.
  86. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55:74-108.
  87. Patani N, Jouhra F, Jiang W, Mokbel K. 2008. Osteopontin expression profiles predict pathological and clinical outcome in breast cancer. *Anticancer Res* 28:4105-4110.
  88. Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grutzmann R. 2004. Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia* 6:744-750.
  89. Ponting CP, Bork P. 1996. Pleckstrin's repeat performance: a novel domain in G-protein signaling? *Trends Biochem Sci* 21:245-246.
  90. Porter D, Lahti-Domenici J, Keshaviah A, Bae YK, Argani P, Marks J, Richardson A, Cooper A, Strausberg R, Riggins GJ, Schnitt S, Gabrielson E, Gelman R, Polyak K. 2003. Molecular markers in ductal carcinoma in situ of the breast. *Mol Cancer Res* 1:362-375.
  91. Raemaekers T, Ribbeck K, Beaudouin J, Annaert W, Van CM, Stockmans I, Smets N, Bouillon R, Ellenberg J, Carmeliet G. 2003. NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J Cell Biol* 162:1017-1029.
  92. Rasmussen LJ, Rasmussen M, Lee B, Rasmussen AK, Wilson DM, III, Nielsen FC, Bisgaard HC. 2000. Identification of factors interacting with hMSH2 in the fetal liver utilizing the yeast two-hybrid system. In vivo interaction through the C-terminal domains of hEXO1 and hMSH2 and comparative expression analysis. *Mutat Res* 460:41-52.
  93. Reiner A. 2000. [Breast cancer from the viewpoint of the pathologist]. *Wien Med Wochenschr* 150:58-62.
  94. Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. 2002. Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat* 74:255-269.

95. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, Barrette T, Pandey A, Chinnaiyan AM. 2004. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6:1-6.
96. Ribbeck K, Groen AC, Santarella R, Bohnsack MT, Raemaekers T, Kocher T, Gentzel M, Gorlich D, Wilm M, Carmeliet G, Mitchison TJ, Ellenberg J, Hoenger A, Mattaj IW. 2006. NuSAP, a mitotic RanGTP target that stabilizes and cross-links microtubules. *Mol Biol Cell* 17:2646-2660.
97. Richardson AL, Wang ZC, De NA, Lu X, Brown M, Miron A, Liao X, Iglehart JD, Livingston DM, Ganesan S. 2006. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 9:121-132.
98. Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Mansson H. 2007. The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16:1087-1097.
99. Rudas M, Neumayer R, Gnant MF, Mittelbock M, Jakesz R, Reiner A. 1997. p53 protein expression, cell proliferation and steroid hormone receptors in ductal and lobular in situ carcinomas of the breast. *Eur J Cancer* 33:39-44.
100. Rudland PS, Platt-Higgins A, El-Tanani M, de Silva RS, Barraclough R, Winstanley JH, Howitt R, West CR. 2002. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res* 62:3417-3427.
101. Ryu B, Kim DS, Deluca AM, Alani RM. 2007. Comprehensive expression profiling of tumor cell lines identifies molecular signatures of melanoma progression. *PLoS ONE* 2:e594.
102. Sakorafas GH, Farley DR, Peros G. 2008. Recent advances and current controversies in the management of DCIS of the breast. *Cancer Treat Rev* 34:483-497.
103. Schadt EE, Li C, Su C, Wong WH. 2000. Analyzing high-density oligonucleotide gene expression array data. *J Cell Biochem* 80:192-202.
104. Schuetz CS, Bonin M, Clare SE, Nieselt K, Sotlar K, Walter M, Fehm T, Solomayer E, Riess O, Wallwiener D, Kurek R, Neubauer HJ. 2006. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 66:5278-5286.
105. Schulze-Garg C, Lohler J, Gocht A, Deppert W. 2000. A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene* 19:1028-1037.
106. Seth A, Kitching R, Landberg G, Xu J, Zubovits J, Burger AM. 2003. Gene expression profiling of ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors. *Anticancer Res* 23:2043-2051.
107. Shibata MA, Jorcyk CL, Liu ML, Yoshidome K, Gold LG, Green JE. 1998. The C3(1)/SV40 T antigen transgenic mouse model of prostate and mammary cancer. *Toxicol Pathol* 26:177-182.

108. Silverstein MJ, Barth A, Poller DN, Gierson ED, Colburn WJ, Waisman JR, Gamagami P. 1995a. Ten-year results comparing mastectomy to excision and radiation therapy for ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J Cancer* 31A:1425-1427.
109. Silverstein MJ, Lagios MD, Craig PH, Waisman JR, Lewinsky BS, Colburn WJ, Poller DN. 1996. A prognostic index for ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 77:2267-2274.
110. Silverstein MJ, Poller DN, Waisman JR, Colburn WJ, Barth A, Gierson ED, Lewinsky B, Gamagami P, Slamon DJ. 1995b. Prognostic classification of breast ductal carcinoma-in-situ. *Lancet* 345:1154-1157.
111. Silverstein MJ, Waisman JR, Gamagami P, Gierson ED, Colburn WJ, Rosser RJ, Gordon PS, Lewinsky BS, Fingerhut A. 1990. Intraductal carcinoma of the breast (208 cases). Clinical factors influencing treatment choice. *Cancer* 66:102-108.
112. Simpson PT, Reis-Filho JS, Gale T, Lakhani SR. 2005. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205:248-254.
113. Singh R, Bandyopadhyay D. 2007. MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6:481-486.
114. Smith RA, Saslow D, Sawyer KA, Burke W, Costanza ME, Evans WP, III, Foster RS, Jr., Hendrick E, Eyre HJ, Sener S. 2003. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA Cancer J Clin* 53:141-169.
115. Sobin LH. 2001. TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors. *Cancer* 91:1589-1592.
116. Sobin LH, Fleming ID. 1997. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 80:1803-1804.
117. Stratton MR, Collins N, Lakhani SR, Sloane JP. 1995. Loss of heterozygosity in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 175:195-201.
118. Suzuki T, Toi M, Saji S, Horiguchi K, Aruga T, Suzuki E, Horiguchi S, Funata N, Karasawa K, Kamata N. 2006. Early breast cancer. *Int J Clin Oncol* 11:108-119.
119. Thelander L, Berg P. 1986. Isolation and characterization of expressible cDNA clones encoding the M1 and M2 subunits of mouse ribonucleotide reductase. *Mol Cell Biol* 6:3433-3442.
120. Tsikitis VL, Chung MA. 2006. Biology of ductal carcinoma in situ classification based on biologic potential. *Am J Clin Oncol* 29:305-310.
121. Tuck AB, Chambers AF. 2001. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:419-429.
122. Tuck AB, Chambers AF, Allan AL. 2007. Osteopontin overexpression in breast cancer: knowledge gained and possible implications for clinical management. *J Cell Biochem* 102:859-868.

123. Tzeng YJ, Guhl E, Graessmann M, Graessmann A. 1993. Breast cancer formation in transgenic animals induced by the whey acidic protein SV40 T antigen (WAP-SV-T) hybrid gene. *Oncogene* 8:1965-1971.
124. Valenzuela M, Julian TB. 2007. Ductal carcinoma in situ: biology, diagnosis, and new therapies. *Clin Breast Cancer* 7:676-681.
125. Vincent-Salomon A, Lucchesi C, Gruel N, Raynal V, Pierron G, Goudefroye R, Reyal F, Radvanyi F, Salmon R, Thiery JP, Sastre-Garau X, Sigal-Zafrani B, Fourquet A, Delattre O. 2008. Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 14:1956-1965.
126. Wai PY, Kuo PC. 2008. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 27:103-118.
127. Wang IC, Meliton L, Tretiakova M, Costa RH, Kalinichenko VV, Kalin TV. 2008. Transgenic expression of the forkhead box M1 transcription factor induces formation of lung tumors. *Oncogene* 27:4137-4149.
128. Wei K, Clark AB, Wong E, Kane MF, Mazur DJ, Parris T, Kolas NK, Russell R, Hou H, Jr., Kneitz B, Yang G, Kunkel TA, Kolodner RD, Cohen PE, Edelman W. 2003. Inactivation of Exonuclease 1 in mice results in DNA mismatch repair defects, increased cancer susceptibility, and male and female sterility. *Genes Dev* 17:603-614.
129. Wiechmann L, Kuerer HM. 2008. The molecular journey from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer. *Cancer* 112:2130-2142.
130. Wierstra I, Alves J. 2007. FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor. *Biol Chem* 388:1257-1274.
131. Winzer KJ. 2005. [Diagnosis and treatment of breast cancer]. *Chirurg* 76:803-816.
132. Wonsey DR, Follettie MT. 2005. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. *Cancer Res* 65:5181-5189.
133. Wruk D. 2008. [Imaging of breast tissues changes--early detection, screening and problem solving]. *Ther Umsch* 65:187-192.
134. Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. 2004. A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *Journal of the American Statistical Association* 99:909-917.
135. Yokomine K, Senju S, Nakatsura T, Irie A, Hayashida Y, Ikuta Y, Harao M, Imai K, Baba H, Iwase H, Nomori H, Takahashi K, Daigo Y, Tsunoda T, Nakamura Y, Sasaki Y, Nishimura Y. 2009. The forkhead box M1 transcription factor as a candidate of target for anti-cancer immunotherapy. *Int J Cancer*.
136. Zhang K, Hu S, Wu J, Chen L, Lu J, Wang X, Liu X, Zhou B, Yen Y. 2009. Overexpression of RRM2 decreases thrombospondin-1 and increases VEGF production in human cancer cells in vitro and in vivo: implication of RRM2 in angiogenesis. *Mol Cancer* 8:11.

## 8. Anhang

Tab. 14: Qualitäts-Kontrollmaße der Mouse Genome 430 2.0 GeneChips®

	Signatur	RawQ	Scale F.	Backgr.	Präsent	(3'/5') β-Act	(3'/5') GAPDH
Balb/C	WKE-CS1_126HR3	3.02	0.673	86.32	52.3	3.05	3.24
	WKE-CS2_127HR3	3.36	0.482	98.59	54.5	2.06	3.47
	WKE-CS3_0808_128HR1	4.33	0.424	145.15	50.6	2.56	2.59
	WKE_CS45_221_HR1	2.64	0.68	77.07	53.1	3.32	4.06
	WKE_CS46_220_HR1	2.72	0.616	82.15	53.9	2.96	3.73
Ohne Wurf	WKE_CS5_157_HL1	3.7	0.4	114.16	56.9	2.04	4.62
	WKE_CS6_166HL3	4.18	0.339	127.83	58.6	1.53	3.33
	WKE_CS7_167HR1	3.22	0.465	98.55	54.4	2.28	3.16
	WKE_CS8_169VR	3.38	0.422	201.19	54.3	2.33	2.88
	WKE_CS10_156HL3	3.73	0.44	113.66	55.6	1.67	2.61
1M	WKE_CS11_132HR3	2.74	0.527	76.24	55.9	2.81	5.14
	WKE_CS12_140HR1	2.91	0.5	81.41	54.3	2.76	3.49
	WKE_CS13_144HR1	2.51	0.623	74.68	53.1	3.12	4.13
	WKE_CS14_149HL1	2.88	0.567	85.12	54.3	2.69	5.5
	WKE_CS17_181HR1	2.22	0.6	68.43	54.3	2.94	6.68
2M	WKE_CS18_137HL3	2.25	0.724	69.08	54.7	3.95	5.95
	WKE_CS19_145_HR3	2.54	0.642	80.63	54.4	2.74	6.87
	WKE_CS20_154HR3	2.51	0.645	79.35	53.7	2.91	7.96
	WKE_CS36_197_HR1	2.55	0.696	107.95	54.7	2.35	4.53
	WKE_CS37_198_HR1	2.53	0.685	107.43	56	2.33	3.82
3M	WKE_CS22_204HR1	2.48	0.668	70.29	56	3.17	4.53
	WKE_CS24_214HR3	2.33	0.702	69.02	55.3	2.37	5.08
	WKE_CS25_159HR3	2.12	0.835	66.49	53.4	4.08	5.48
	WKE_CS26_161HL1	2.39	0.67	76.91	53.8	2.92	4.93
	WKE_CS28_212_HR1	3.21	0.631	95.63	53.3	2.18	6.11
4M	WKE_CS29_164_HL3	3.03	0.626	90.33	54.8	3.7	7.34
	WKE_CS30_174_HR3	2.59	0.887	80.21	54	7.42	7.7
	WKE_CS38_186_HR1	2.83	0.554	116.82	55.8	2.64	3.32
	WKE_CS40_210_VR	2.87	0.589	119.95	53.8	3.55	3.44
	WKE_CS42_216_VR	2.67	0.529	112.15	56.4	2.14	2.6
5M	WKE_CS32_204_HL1	3.02	0.487	95.32	56.7	2.06	6.28
	WKE_CS43_168_VL	1.94	0.62	52.38	57.7	2.23	3.66
	WKE_CS44_205_HR1	2.36	0.486	64.09	57.3	2.31	3.11
	WKE_CS49_175_VL	3.12	0.519	87.73	55.3	2.5	1.96
	WKE_CS50_189_HR3	3.95	0.58	125.8	50.5	2.69	3.33
Tumor	WKE_CS21_204T1	2.45	0.597	68.03	55.5	2.45	5.95
	WKE_CS27_212_T1	2.72	0.566	79.06	55.6	3.22	7.07
	WKE_CS31_199T2	2.76	0.575	85.3	55.3	2.32	4.81
	WKE_CS39_186_T1	2.68	0.505	111.93	56.1	2.08	3.8
	WKE_CS41_185_T2	2.69	0.486	113.61	56.1	1.91	2.57

Tab. 15: Durch Analyse der Mouse Genome 430 2.0 GeneChips® identifizierte 173 Probe Set Liste

Probe Set ID	Gene Symbol	Gene Title
1415810_at	Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
1415811_at	Uhrf1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1
1415849_s_at	Stmn1	stathmin 1
1415945_at	Mcm5	minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae)
1416076_at	Ccnb1 /// Ccnb1-rs1 /// EG434175 /// LOC667005	cyclin B1, related sequence 1 /// cyclin B1 /// predicted gene, EG434175 /// similar to cyclin B1
1416120_at	Rrm2	ribonucleotide reductase M2
1416251_at	Mcm6	minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)
1416299_at	Shcbp1	Shc SH2-domain binding protein 1
1416309_at	Nusap1	nucleolar and spindle associated protein 1
1416558_at	Melk	maternal embryonic leucine zipper kinase
1416664_at	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
1416802_a_at	Cdca5	cell division cycle associated 5
1416961_at	Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S. cerevisiae)
1417019_a_at	Cdc6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
1417323_at	Psrc1	proline/serine-rich coiled-coil 1
1417450_a_at	Tacc3	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
1417457_at	Cks2 /// LOC100039474 /// LOC100044764	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 /// similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2)
1417458_s_at	Cks2 /// LOC100039474 /// LOC100044764	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2 /// similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2)
1417541_at	Hells	helicase, lymphoid specific
1417587_at	Timeless	timeless homolog (Drosophila)
1417618_at	Itih2	inter-alpha trypsin inhibitor, heavy chain 2
1417910_at	Ccna2	cyclin A2
1417911_at	Ccna2	cyclin A2
1418026_at	Exo1	exonuclease 1
1418175_at	Vdr	vitamin D receptor
1418264_at	Cenpk	centromere protein K
1418281_at	Rad51	RAD51 homolog (S. cerevisiae)
1418856_a_at	Fanca	Fanconi anemia, complementation group A
1418919_at	Sgol1	shugoshin-like 1 (S. pombe)
1419153_at	2810417H13Rik	RIKEN cDNA 2810417H13 gene
1419513_a_at	Ect2	ect2 oncogene
1419735_at	Csn3	casein kappa
1419943_s_at	Ccnb1	cyclin B1
1420369_a_at	Csn2	casein beta
1420627_a_at	Csn1s1	casein alpha s1
1420683_at	Bnip1	BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein like
1421001_a_at	Car6	carbonic anhydrase 6
1421546_a_at	Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1
1422430_at	Fignl1	fidgetin-like 1
1422462_at	Ube2t	ubiquitin-conjugating enzyme E2T (putative)
1422513_at	Ccnf	cyclin F
1422814_at	Aspm	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)
1423123_at	Rad54l	RAD54 like (S. cerevisiae)
1423124_x_at	Rad54l	RAD54 like (S. cerevisiae)
1423174_a_at	Pard6b	par-6 (partitioning defective 6) homolog beta (C. elegans)

1423463_a_at	D2Ertd750e	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
1423774_a_at	Prc1	protein regulator of cytokinesis 1
1423775_s_at	Prc1	protein regulator of cytokinesis 1
1423847_at	Ncapd2	non-SMC condensin I complex, subunit D2
1423877_at	Chaf1b	chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)
1423920_at	Ncaph	non-SMC condensin I complex, subunit H
1424046_at	Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (S. cerevisiae)
1424105_a_at	Pttg1	pituitary tumor-transforming 1
1424118_a_at	Spc25	SPC25, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
1424128_x_at	Aurkb	aurora kinase B
1424143_a_at	Cdt1	chromatin licensing and DNA replication factor 1
1424278_a_at	Birc5	baculoviral IAP repeat-containing 5
1424292_at	Depdc1a	DEP domain containing 1a
1424511_at	Aurka	aurora kinase A
1424629_at	Brca1	breast cancer 1
1424766_at	Ercc6l	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency complementation group 6 - like
1424971_at	Ccdc99	coiled-coil domain containing 99
1425121_a_at	BC006965	cDNA sequence BC006965
1425815_a_at	Hmmr	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)
1426817_at	Mki67	antigen identified by monoclonal antibody Ki 67
1427161_at	Cenpf	centromere protein F
1427275_at	Smc4	structural maintenance of chromosomes 4
1427707_a_at	Stil	Scl/Tal1 interrupting locus
1428104_at	Tpx2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)
1428485_at	Car12	carbonic anhydrase 12
1429171_a_at	Ncapg	on-SMC condensin I complex, subunit G
1429172_a_at	Ncapg	on-SMC condensin I complex, subunit G
1430811_a_at	Nuf2	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
1433408_a_at	Mcm10	minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae)
1433543_at	Anln	anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)
1433893_s_at	Spag5	sperm associated antigen 5
1434280_at		
1434437_x_at	Rrm2	ribonucleotide reductase M2
1434695_at	Dtl	denticleless homolog (Drosophila)
1434748_at	Ckap2	cytoskeleton associated protein 2
1434767_at	C79407	expressed sequence C79407
1434850_at	Iqgap3	IQ motif containing GTPase activating protein 3
1435306_a_at	Kif11	kinesin family member 11
1435945_a_at	Kcnn4	potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 4
1436170_a_at	Csn1s2a	casein alpha s2-like A
1436186_at	E2f8	E2F transcription factor 8
1436707_x_at	Ncaph	non-SMC condensin I complex, subunit H
1437313_x_at	Hmgb2	high mobility group box 2
1437611_x_at	Kif2c	kinesin family member 2C
1437716_x_at	Kif22	kinesin family member 22
1438852_x_at	Mcm6	minichromosome maintenance deficient 6 (MIS5 homolog, S. pombe) (S. cerevisiae)
1439040_at	Cenpe	centromere protein E
1439377_x_at	Cdc20	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
1448191_at	Plk1	polo-like kinase 1 (Drosophila)
1448205_at	Ccnb1 /// Ccnb1-rs1	cyclin B1, related sequence 1 /// cyclin B1



1448226_at	Rrm2	ribonucleotide reductase M2
1448314_at	Cdc2a	cell division cycle 2 homolog A (S. pombe)
1448466_at	Cdca5	cell division cycle associated 5
1448627_s_at	Pbk	PDZ binding kinase
1448752_at	Car2	carbonic anhydrase 2
1449104_at	Upk3a	uroplakin 3A
1449171_at	Ttk	Ttk protein kinase
1449199_at	Muc1	mucin 1, transmembrane
1449207_a_at	Kif20a	kinesin family member 20A
1449254_at	Spp1	secreted phosphoprotein 1
1449431_at	Trpc6	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
1449699_s_at	C330027C09Rik	RIKEN cDNA C330027C09 gene
1449708_s_at	Chek1	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)
1449877_s_at	Kifc1 /// LOC100044746	kinesin family member C1 /// similar to Kifc1 protein
1450196_s_at	Gys1	glycogen synthase 1, muscle
1450496_a_at	2810433K01Rik	RIKEN cDNA 2810433K01 gene
1450677_at	Chek1	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)
1450692_at	Kif4	kinesin family member 4
1450862_at	Rad54l	RAD54 like (S. cerevisiae)
1450886_at	Gsg2	germ cell-specific gene 2
1450920_at	Ccnb2	cyclin B2
1451128_s_at	Kif22	kinesin family member 22
1451246_s_at	Aurkb	aurora kinase B
1451358_a_at	Racgap1	Rac GTPase-activating protein 1
1451407_at	Igsf5 /// Pcp4	Purkinje cell protein 4 /// immunoglobulin superfamily, member 5
1451424_at	Gabrp	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, pi
1451483_s_at	1700054N08Rik	RIKEN cDNA 1700054N08 gene
1451851_a_at	Csn3	casein kappa
1452040_a_at	Cdca3	cell division cycle associated 3
1452242_at	Cep55	centrosomal protein 55
1452305_s_at	Cenpn	centromere protein N
1452314_at	Kif11	kinesin family member 11
1452458_s_at	Ppil5	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin) like 5
1452459_at	Aspm	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)
1452534_a_at	Hmgb2	high mobility group box 2
1452954_at	Ube2c	ubiquitin-conjugating enzyme E2C
1453107_s_at	4933413G19Rik /// Foxm1 /// Pebp1	forkhead box M1 /// phosphatidylethanolamine binding protein 1 /// RIKEN cDNA 4933413G19 gene
1454694_a_at	Top2a	topoisomerase (DNA) II alpha
1455990_at	Kif23	kinesin family member 23
1420081_s_at	D2Erttd750e	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed
1428304_at	Esco2	establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae)
1428480_at	Cdca8	cell division cycle associated 8
1428481_s_at	Cdca8	cell division cycle associated 8
1428827_at	Whsc1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (human)
1429095_at	Cenpp	centromere protein P
1429658_a_at	Smc2	structural maintenance of chromosomes 2
1429660_s_at	Smc2	structural maintenance of chromosomes 2
1431087_at	Spc24	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
1434734_at	E130016E03Rik	RIKEN cDNA E130016E03 gene
1434789_at	Depdc1b	DEP domain containing 1B
1435005_at	Cenpe	centromere protein E
1435575_at	Kntc1	kinetochore associated 1

1435938_at	Ckap21	cytoskeleton associated protein 2-like
1436239_at	Sle5a5	solute carrier family 5 (sodium iodide symporter), member 5
1436723_at	Cenpi	centromere protein I
1436808_x_at	Mcm5	minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 ( <i>S. cerevisiae</i> )
1436847_s_at	Cdca8	cell division cycle associated 8
1437019_at	2200001I15Rik	RIKEN cDNA 2200001I15 gene
1437370_at	Sgol2	shugoshin-like 2 ( <i>S. pombe</i> )
1437580_s_at	Nek2	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2
1438434_at	Arhgap11a	Rho GTPase activating protein 11A
1439520_at	Dtl	denticleless homolog ( <i>Drosophila</i> )
1439695_a_at	Kif20b	kinesin family member 20B
1441757_at	1190002F15Rik	RIKEN cDNA 1190002F15 gene
1443694_at	Rgs20	regulator of G-protein signaling 20
1443933_at	Tc2n	tandem C2 domains, nuclear
1447363_s_at	Bub1b	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta ( <i>S. cerevisiae</i> )
1452806_at	1500016O10Rik	RIKEN cDNA 1500016O10 gene
1452912_at	Dscc1	defective in sister chromatid cohesion 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
1453067_at	Apitd1	apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1
1453226_at	3000004C01Rik	RIKEN cDNA 3000004C01 gene
1454744_at	F630043A04Rik	RIKEN cDNA F630043A04 gene
1455818_at	4930427A07Rik	RIKEN cDNA 4930427A07 gene
1455983_at	Cdca2	cell division cycle associated 2
1456077_x_at	Cdc25c	cell division cycle 25 homolog C ( <i>S. pombe</i> )
1456280_at	Clspn	claspin homolog ( <i>Xenopus laevis</i> )
1457026_at	Liph	lipase, member H
1458374_at	C79407	expressed sequence C79407

**Tab. 16: Signifikante GO-Kategorien für die murine 173 Probe Set Liste. Die GO-Kategorien sind entsprechend ihrer korrigierten p-Werte sortiert.**

<b>GO - Term / GO - Kategorie</b>	<b>korrigierter p - Wert</b>	<b>Prozentualer Anteil</b>
cell cycle	0.0E+00	3.8
cell cycle process	0.0E+00	2.4
cell cycle phase	0.0E+00	2.0
M phase	0.0E+00	1.7
cell division	0.0E+00	1.5
mitotic cell cycle	0.0E+00	1.5
M phase of mitotic cell cycle	0.0E+00	1.1
mitosis	0.0E+00	1.1
chromosome, centromeric region	1.2E-24	0.5
condensed chromosome	3.3E-20	0.6
chromosome	4.1E-20	2.5
microtubule cytoskeleton	2.7E-19	2.6
spindle	8.1E-17	0.6
chromosomal part	3.8E-16	2.0
non-membrane-bounded organelle	2.8E-15	12.4
intracellular non-membrane-bounded organelle	2.8E-15	12.4
chromosome segregation	2.5E-14	0.4
condensed chromosome, centromeric region	4.5E-13	0.3
cytoskeletal part	1.3E-12	4.3
nucleus	4.4E-11	26.4
kinetochore	5.8E-11	0.3
condensed chromosome kinetochore	8.6E-11	0.2
microtubule-based process	1.7E-10	1.3
DNA metabolic process	2.7E-10	2.1
cytoskeleton	1.7E-09	6.3
microtubule	8.6E-08	1.4
microtubule motor activity	1.9E-07	0.4
ATP binding	2.5E-07	7.8
adenyl ribonucleotide binding	3.5E-07	7.9
meiosis	7.4E-07	0.5
M phase of meiotic cell cycle	7.4E-07	0.5
meiotic cell cycle	8.2E-07	0.5
adenyl nucleotide binding	1.3E-06	8.4
mitotic sister chromatid segregation	2.9E-06	0.1
sister chromatid segregation	3.8E-06	0.1
chromosome condensation	3.8E-06	0.1
organelle organization and biogenesis	5.9E-06	7.2
cytoskeleton organization and biogenesis	7.0E-06	2.7
response to DNA damage stimulus	7.4E-06	1.6
ribonucleotide binding	1.0E-05	10.0
purine ribonucleotide binding	1.0E-05	10.0
microtubule-based movement	1.0E-05	0.6
spindle microtubule	1.0E-05	0.1
microtubule associated complex	1.2E-05	0.7
DNA replication	1.4E-05	0.8
mitotic chromosome condensation	1.5E-05	0.1
microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	2.0E-05	0.5
purine nucleotide binding	3.0E-05	10.4
cytoskeleton-dependent intracellular transport	5.4E-05	0.8

DNA repair	7.0E-05	1.2
spindle pole	1.4E-04	0.1
motor activity	1.8E-04	0.9
cytokinesis	2.8E-04	0.2
cellular process	1.4E-03	62.5
intracellular organelle part	1.7E-03	21.9
nucleotide binding	1.8E-03	12.2
organelle part	1.9E-03	22.0
meiosis I	1.9E-03	0.2
cellular component organization and biogenesis	3.5E-03	11.0
intracellular organelle	4.6E-03	49.2
organelle	4.8E-03	49.2
midbody	5.0E-03	0.1
intracellular	6.8E-03	60.6
double-strand break repair via homologous recombination	1.0E-02	0.1
recombinational repair	1.0E-02	0.1
intracellular part	1.0E-02	57.7
organelle localization	1.0E-02	0.3
centrosome	1.6E-02	0.9
intracellular membrane-bounded organelle	2.9E-02	42.3
membrane-bounded organelle	3.1E-02	42.3
chromosome organization and biogenesis	3.4E-02	2.5
chromosome localization	3.4E-02	0.0
establishment of chromosome localization	3.4E-02	0.0
microtubule organizing center	3.5E-02	1.0
condensed nuclear chromosome, centromeric region	5.7E-02	0.0
condensed nuclear chromosome	8.3E-02	0.2

Tab. 17: Qualitäts-Kontrollmaße der humanen GeneChips®

	Signatur	RawQ	Scale F.	Backgr.	Present	(3'/5')	(3'/5')
						β-Act	GAPDH
Gesund	wke-cs-h15-ges301006	1.71	2.08	50.2	45.90%	10.18	5.3
	wke-cs-h14-ges171006	1.87	1.93	55.84	45.80%	5.43	3.1
	wke-cs-h13-ges19906	1.85	1.84	54.89	50.70%	3.62	1.9
	wke-cs-h12-ges22806li	1.78	1.76	50.35	49.70%	3.02	2.5
	wke-cs-h11-ges22906re	1.93	1.54	54.28	49.00%	3.04	2.0
DCIS	wke-cs-h01-25707dcis	1.78	1.74	45.28	49.60%	5.82	2.7
	wke-cs-h04-1838dcis	2.15	1.88	59.88	47.40%	5.31	2.9
	wke-cs-h10-23408dcis	1.77	1.69	49.5	49.80%	4.43	3.2
	wke-cs-h09-30107dcis	1.8	1.61	51.74	50.10%	6.45	4.0
	wke-cs-h08-121206dcis	1.81	1.79	51.05	50.10%	5.26	2.6
	wke-cs-h07-281106dcis	1.8	1.68	47.71	48.90%	6.07	2.9
	wke-cs-h06-171106dcis	1.77	1.61	47.98	50.90%	4.79	2.5
	wke-cs-h05-251006dcis	1.76	1.51	47.23	52.00%	4.47	3.1
wke-cs-h02-21007dcis	2.07	1.74	53.29	49.50%	5.45	3.5	
IDC	wke-cs-h20-tm1906	1.88	1.86	56.97	48.30%	3.15	2.0
	wke-cs-h19-tm3447	1.7	1.75	52.64	50.00%	2.79	1.9
	wke-cs-h18-tm3016	1.67	2.26	49.28	46.00%	3.08	1.8
	wke-cs-h17-tm2920	1.86	1.74	53.28	48.90%	2.45	1.9
	wke-cs-h16-tm6207	1.94	1.84	56.82	46.40%	2.87	1.9

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und dass ich mich keiner fremden Hilfe bedient habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß veröffentlichtem oder unveröffentlichtem Schrifttum entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

Ort/Datum

---

Unterschrift