

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Auswahl und Bestätigung der differentiellen Expression der Kandidatengene auf RNA-Ebene

Die *in silico* Expressionsanalyse in Normalgeweben und korrespondierenden Tumorgeweben bildete die Grundlage für die Auswahl der Kandidatengene, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Da Defekte in der zellulären Signaltransduktion die Krebsentstehung fördern können, sind deregulierte Komponenten von Signaltransduktionskaskaden als Kandidatengene besonders interessant. Deshalb wurden von den differentiell exprimierten Genen zwei membranassoziierte Faktoren, ein sezernierter (*SFRP1*) und ein intrazellulärer Faktor (*Tensin*), aus bekannten Signaltransduktionswegen ausgewählt. Im Wnt-Signalweg und der Signaltransduktion über fokale Kontakte (Integrine) sind bereits tumorrelevante Gene bekannt (z.B.  $\beta$ -Catenin und APC [Lustig und Behrens, 2003] bzw. Integrine [Jin und Varner, 2004]). Außerdem wurde bei der Kandidatengen-Auswahl die chromosomale Lokalisation der Gene berücksichtigt. Für Chromosom 8p ist beispielsweise eine Assoziation mit der Entstehung von Mammakarzinomen beschrieben worden [Yaremko *et al.*, 1996; Sigbjornsdottir, 2000]. Für die Kandidatengene, *Tensin* und *SFRP1*, wurde im elektronischen Northern eine signifikante Expressionsreduktion in Mammakarzinomen beobachtet ( $p = 6,11E^{-6}$  bzw.  $p = 8,74E^{-11}$ ). Die differentielle Expression ergibt sich hierbei aus dem Quotienten N/T der relativen Häufigkeiten aus den beiden EST-Gesamtzahlen (Normal und Tumor). Ein Quotient  $N/T > 2$  deutet auf eine Expressionsreduktion des Kandidatengens im Tumor hin. Die Signifikanz der Werte wurde mit dem Fisher-Test geprüft und p-Werte  $< 0,05$  bzw. eine Signifikanz (SIG)  $> 95$  wurden als statistisch signifikant gewertet.

Neben der Expressionsreduktion von *Tensin* in Mammakarzinomen ( $N/T = 6,58$ ) zeigte das Ergebnis des elektronischen Northern (Tabelle 9) eine hoch signifikante Reduktion der *Tensin*-Expression in weiteren drei Tumorentitäten: Blasenkarzinomen ( $N/T = 3,6$ ;  $p = 0,008$ ), Kolonkarzinomen ( $N/T = 9,42$ ;  $p = 0,007$ ) und Ovarialkarzinomen ( $N/T = 9,91$ ;  $p = 0,01$ ). Für *SFRP1* wurde außer in Mammakarzinomen eine hoch signifikante Expressionsreduktion ( $N/T = 13,44$ ;  $p = 0,0002$ ) in Blasenkarzinomen und in zwei weiteren Geweben (Uterus und Niere) eine schwach signifikante Expressionsreduktion in Tumoren gezeigt ( $p = 0,02$  bzw.  $p = 0,05$ ). Die Gesamtdaten des elektronischen Northern von *SFRP1* sind in Tabelle 10 dargestellt. Für beide Kandidatengene wurde zur Validierung dieser *in silico* Daten die RNA-Expression in Tumorgeweben mit Hilfe von Northern Hybridisierungen und quantitativer PCR untersucht.

Tabelle 9: Elektronischer Northern für *Tensin* in 21 humanen Geweben. N = Normalgewebe, T = Tumorgewebe, N/T = Quotient der relativen Häufigkeiten, p-Wert = Ergebnis des Fisher-Tests, SIG = Signifikanz

	NORMAL		TUMOR		Wert		
	Treffer	Gesamtzahl ESTs	Treffer	Gesamtzahl ESTs	N/T	p-Wert	SIG
B-Lymphom	12	108541	0	7357	-	1	0
Blase	13	25643	6	42553	3,6	0,008	99,2
Gehirn	14	184386	5	100222	1,52	0,48	51,9
Brust	47	120725	4	67582	6,58	6,11E <sup>-6</sup>	100
Kolon	14	52193	1	35112	9,42	0,007	99,3
Endokrines Gewebe	6	62283	4	61769	1,49	0,75	24,6
Herz	24	98508	0	7275	-	0,41	59,3
Niere	6	50214	1	20741	2,48	0,68	31,9
Leber	1	21510	1	15763	0,73	1	0
Lunge	15	102742	6	54085	1,32	0,65	34,8
Skelettmuskel	9	58318	3	27070	1,39	0,76	23,7
Ovar	8	33687	1	41736	9,91	0,01	98,7
Periph. Blut-Leukozyten	0	127720	0	941	-	-	-
Pankreas	1	60513	0	21810	-	1	0
Prostata	25	106099	20	76769	0,9	0,76	23,6
Haut	5	27206	0	1180	-	1	0
Dünndarm	10	36435	1	9383	2,58	0,71	29,3
Magen/Speiseröhre	2	13800	1	12120	1,76	1	0
T-Lymphom	1	60721	0	17316	-	1	0
Hoden	4	24903	0	16899	-	0,15	84,7
Uterus	28	73176	4	21735	2,08	0,21	79,3

Tabelle 10: Elektronischer Northern von *SFRP1* in 21 humanen Geweben. N = Normalgewebe, T = Tumorgewebe, N/T = Quotient der relativen Häufigkeiten, p-Wert = Ergebnis des Fisher-Tests, SIG = Signifikanz.

	NORMAL		TUMOR		Wert		
	Treffer	Gesamtzahl ESTs	Treffer	Gesamtzahl ESTs	N/T	p-Wert	SIG
B-Lymphom	1	108541	1	7357	0,07	0,12	87,7
Blase	11	25643	1	42553	18,25	0,0002	100
Gehirn	7	184386	9	100222	0,42	0,11	88,7
Brust	72	120725	3	67582	13,44	8,74E <sup>-11</sup>	100
Kolon	2	52193	0	35112	-	0,52	48,1
Endokrines Gewebe	6	62283	2	61769	2,98	0,39	71,1
Herz	4	98508	0	7275	-	1	0
Niere	24	50214	3	20741	3,3	0,05	94,6
Leber	3	21510	1	15763	2,2	0,64	35,7
Lunge	2	102742	1	54085	1,05	1	0
Skelettmuskel	5	58318	3	27070	0,77	0,71	28,6
Ovar	0	33687	2	41736	-	0,51	49,4
Periph. Blut-Leukozyten	0	127720	0	941	-	-	-
Pankreas	0	60513	0	21810	-	-	-
Prostata	4	106099	3	76769	0,96	1	0
Haut	8	27206	0	1180	-	1	0
Dünndarm	5	36435	1	9383	1,29	1	0
Magen/Speiseröhre	0	13800	0	12120	-	-	-
T-Lymphom	0	60721	0	17316	-	-	-
Hoden	5	24903	1	16899	3,39	0,41	58,8
Uterus	17	73176	0	21735	-	0,02	98,1

#### 4.1.1. Reduzierte Tensin-Expression in Brusttumoren

Um die Ergebnisse des elektronischen Northernblots zu bestätigen wurde ein Cancer Profiling Array (CPA) der Firma Clontech mit einer *Tensin*-spezifischen cDNA Sonde hybridisiert (s. Abb. 14). Die Sonde war zunächst mit Hilfe des „Multiple Tissue Northernblots“ auf Spezifität getestet worden (vgl. Abb. 18, Kapitel 4.1.2.). Da bei der MTN-Hybridisierung eine spezifische Bande in der erwarteten Höhe detektiert wurde, konnte die Sonde für weitere Experimente wie CPA-Hybridisierung und RNA *in situ* Hybridisierung verwendet werden. Auf einem CPA ist jeweils Normal- und Tumorgewebe eines Patienten aufgebracht. Eine differentielle Expression kann durch den direkten Vergleich der Hybridisierungssignale nachgewiesen werden.

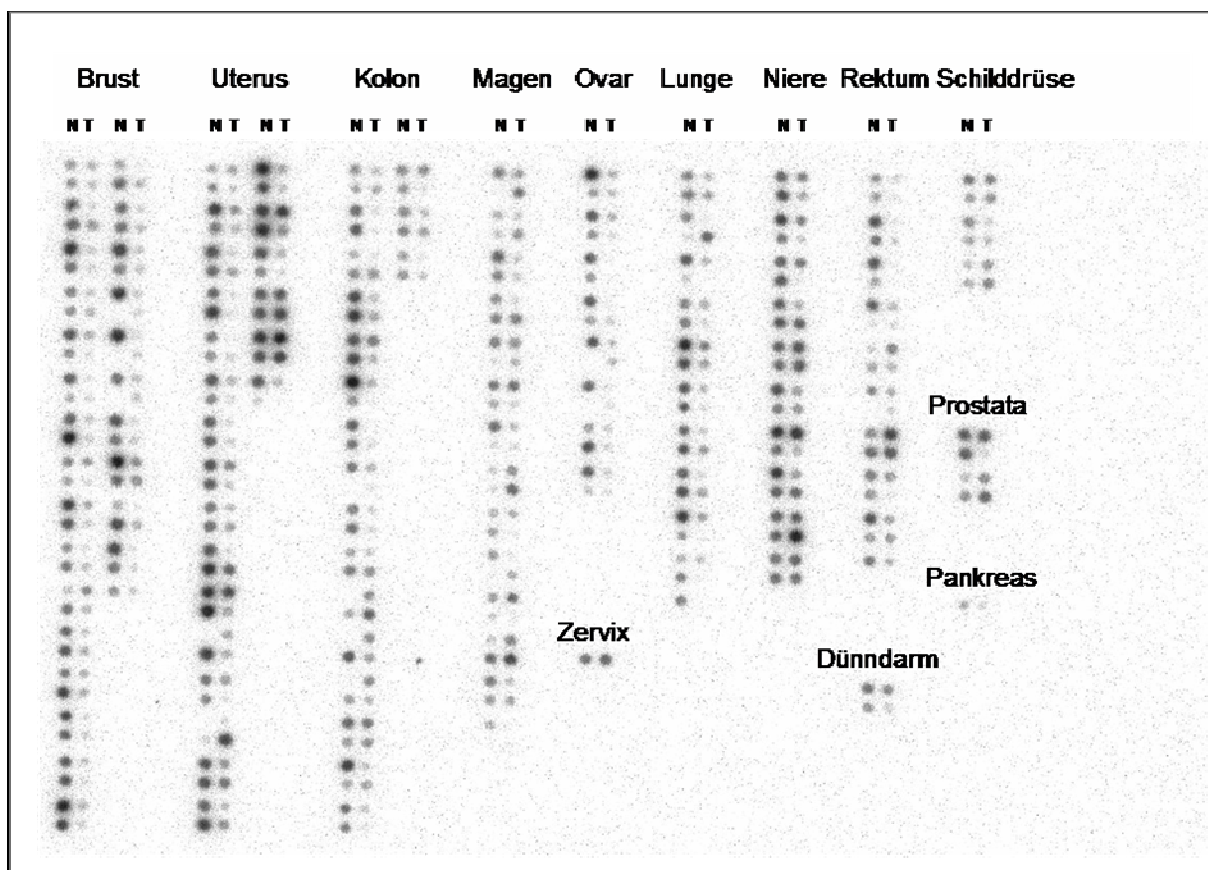


Abb. 14: Northern Hybridisierung von *Tensin* auf einem CPA (Clontech). Normalgewebe (N) und Tumorgewebe (T) jeweils eines Patienten waren nebeneinander aufgetragen. Eine differentielle Expression war vor allem in gynäkologischen Tumoren (Brust, Uterus und Ovar) und Lungenkarzinomen zu beobachten.

Der CPA bestätigte die im eNorthern gezeigte differentielle Expression von *Tensin* in Mamma-, Ovarial- und Kolontumoren. Außerdem zeigte sich eine reduzierte Expression von *Tensin* in Endometrium-Tumoren, sowie in Lungen- und Rektalkarzinomen. In

Tumorzelllinien wie HeLa- oder Melanom-Zellen wurde keine *Tensin*-Expression detektiert. Bei den gynäkologischen Tumoren war eine Reduktion um mehr als das Zweifache im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe in der Mehrheit der Fälle zu beobachten, d.h. in Endometrium-Karzinomen in 73% (32/44), in Brust-Karzinomen in 94% (47/50) und in Ovarial-Karzinomen 94% (15/16) der Patienten. Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit konzentrierten sich auf die Expression von *Tensin* in gynäkologischen Tumoren und dort vor allem in Brustkarzinomen.

Bei der Analyse der *Tensin*-Expression in Mammatumoren durch quantitative PCR war eine erniedrigte Expression in 6 von 13 Tumor-/Normalgewebepaaren nachweisbar (s. Abb. 15). Normiert wurden die Expressionswerte mit dem „house-keeping gene“ GAPDH. Die Expression von *Tensin* in der Kontrollprobe (Brust-Normalgewebe cDNA, Clontech) wurde gleich 1 gesetzt und diente als relativer Bezugspunkt für die Expressionswerte der verschiedenen Patientenproben (blauer Balken in Abb. 15). In Abb. 15 sind die resultierenden relativen Expressionslevel dargestellt. Die *Tensin*-Expressionswerte zeigten eine sehr hohe Variabilität zwischen verschiedenen Patienten.

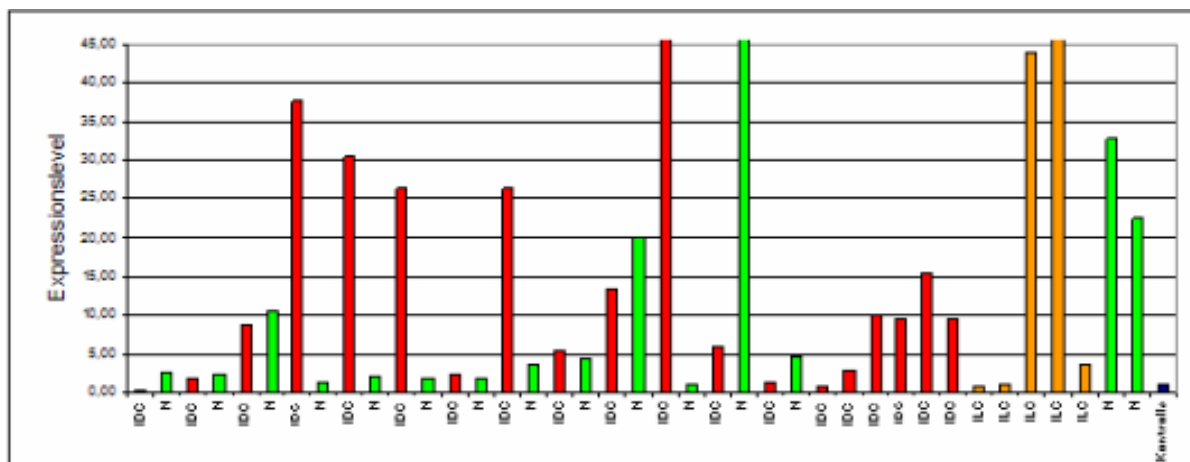


Abb. 15: *Tensin*-Expression in Brust-Normal- und Tumorgeweben analysiert mit quantitativer PCR. Es wurden insgesamt 26 Patienten untersucht. Von 13 Patienten waren Normal- und Tumorgewebeprouben vorhanden (links in der Graphik). Normalgewebe-Proben sind als grüne Balken dargestellt, invasiv-duktales (IDC) und invasiv-lobuläres (ILC) Karzinome als rote bzw. orangefarbene Balken.

#### 4.1.1.1. Lokalisation von *Tensin* in Epithel- und Endothelzellen des Brustgewebes

Nach Bestätigung der reduzierten Expression von *Tensin* in Brustkarzinomen durch die CPA-Hybridisierung und die quantitative PCR sollte die RNA *in situ* Hybridisierung über die Lokalisation des *Tensin*-Transkripts im Brustgewebe Aufschluss geben. Eine *Tensin*-spezifische Sonde (R18014) wurde auf Mamma-Gewebe-Arrays (hergestellt im Institut für Pathologie, Universität Regensburg) hybridisiert, die sowohl Mamma-Normal- als auch Mamma-Tumor-Gewebe enthielten. In Abb. 16 ist die *Tensin*-Expression eines Lobulus aus Normal-Mammagewebe gezeigt. Das *Tensin*-Transkript war stark in Epithelzellen und Endothelzellen der Brust exprimiert. Die umgebenden Bindegewebszellen zeigten hingegen keine Expression. Gewebeprobe mit starker Hintergrundfärbung in der Negativ-Kontrolle (sense-Probe) wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

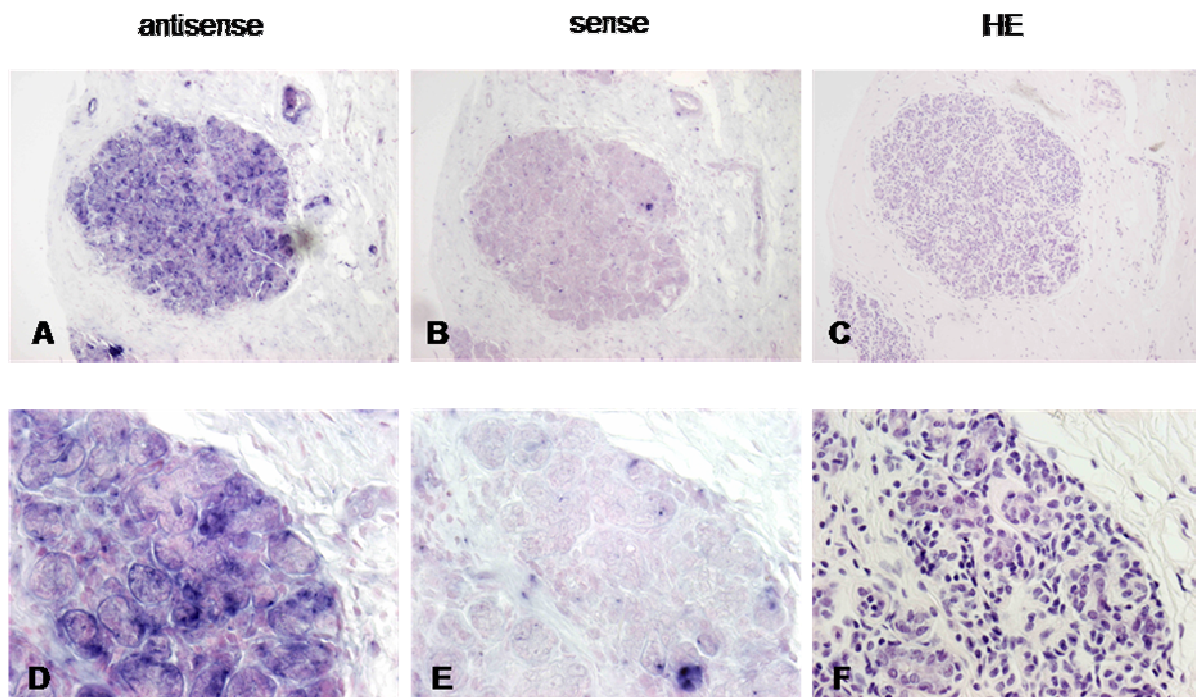


Abb. 16: Expressionsmuster von *Tensin* in Brustnormalgewebe. Epithelzellen der normalen Mamma zeigten starke *Tensin*-Expression während die Stromazellen negativ waren (A, D). Die Sense-Färbung war negativ bis auf wenige Präzipitate (B, E). Zum Vergleich der Struktur sind die HE-Färbungen der Schnitte gezeigt (C, F). Vergrößerung: A-C 100x, D-F 400x.

Der Vergleich der *Tensin*-Expression in Normal- und Tumorgewebe der gleichen Patientinnen ergab eine reduzierte Expression im Tumorgewebe in über 50% der Patientinnen. Abb. 17 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die RNA *in situ* Hybridisierung von *Tensin* in Brusttumor- und Normalgewebe. Alle Epithelzellen des Normalgewebes sind intensiv gefärbt.

Das Tumorgewebe der gleichen Patientin zeigte nur in einzelnen Tumorzellen eine schwache Färbung.

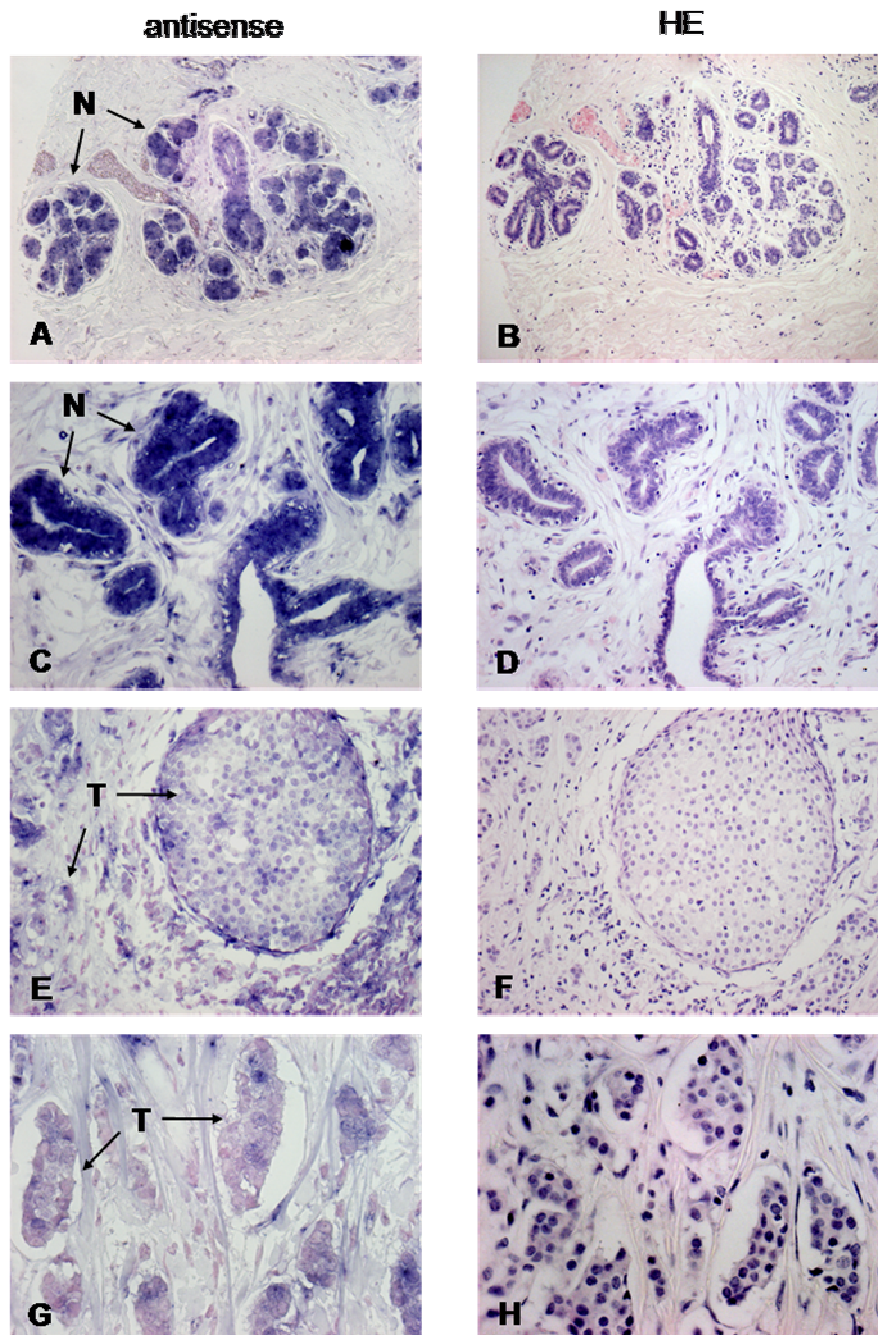


Abb. 17: Reduzierte Expression von *Tensin* in Brusttumorgewebe. Normale Milchgänge (N) und Lobuli exprimierten *Tensin* besonders stark (A, C). Die Tumorzellen (T) der gleichen Patientin exprimierten *Tensin* nur schwach (E, G). Die Endothelzellen auf dem gleichen Schnitt waren stark gefärbt und dienten als interne Kontrolle. B, D, F, H: HE-Färbung. Vergrößerung: 100x (A, B), 200x (C, D, E, F) bzw. 400x (G, H)

In Tabelle 11 sind die Daten der auswertbaren Gewebeproben zusammengefasst. Bei der Bewertung der Färbungen wurden die Intensität der Färbung und der Prozentanteil der gefärbten Zellen zu einem Wert („immunoreactivity score“ IRS 0-12) zusammengefasst. Der „immunoreactivity score“ (IRS) wird ursprünglich für die Beurteilung des Hormonrezeptor-Status in Brusttumoren eingesetzt [Remmele und Stegner, 1987]. Der resultierende Wert berücksichtigt die Intensität des Signals und den Anteil der gefärbten Zellen. Ein IRS von 0-1 bedeutet beispielsweise keine Färbereaktion oder eine schwache Färbereaktion in weniger als 10% der Epithel- bzw. Tumorzellen. Gewebe mit einer starken Expression in mehr als 80% der Epithelzellen erhalten einen IRS von 12.

Für die Auswertung wurden nur Patienten einbezogen von denen sowohl die Normalgewebeprobe als auch die Tumorprobe auswertbar waren. Die Daten zeigen eindeutig, dass in einigen invasiven Tumoren die *Tensin*-Expression komplett verloren wurde ( $IRS < 2$ ). Bei noch vorhandener *Tensin*-Expression ( $IRS \geq 2$ ) wurde die Expression im Tumor verglichen mit der Expression in der Normalgewebeprobe der gleichen Patientin. In 14/28 Patientinnen (44%) mit invasiven Karzinomen (IDC und ILC) war die *Tensin*-Expression in den Tumorzellen mehr als zweifach geringer als im Normal-Epithel. Die starke Expressionsreduktion war sowohl in invasiv duktalem (IDC, 9/20 Fällen), als auch in invasiv lobulärem (ILC, 5/8 Fällen) Karzinomen zu beobachten.

Tabelle 11: Auswertung der RNA *in situ* Färbungen von *Tensin*.

Histologie	Tumor		Normal	
	IRS < 2	IRS $\geq$ 2	IRS < 2	IRS $\geq$ 2
IDC (n = 20)	6	14	2	18
ILC (n = 8)	5	3	1	7
Tubulär (n = 2)	2	0	2	0
DCIS (n = 1)	0	1	0	1

#### 4.1.2. *Tensin*-Expression in Normalgeweben

Um das Expressionsmuster von *Tensin* in humanen Geweben zu untersuchen, wurde ein „Multiple Tissue Northern“ (MTN) der Firma Clontech mit einer *Tensin*-spezifischen Sonde hybridisiert. Dieses Experiment diente außerdem dazu die Spezifität der Sonde nachzuweisen. Es wurde eine Bande bei ~10kb detektiert (s. Abb. 18). Die beobachtete Transkript-Größe entspricht der Erwartung aus bekannten cDNA-Daten (NP\_072174, kurrierter Eintrag NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Februar 2001). Das mit Hilfe von AUTEX für den elektronischen Northern generierte längste zusammenhängende cDNA-Fragment (Konsensus-



Sequenz) hat eine Länge von ca. 10,2kb. Als Startpunkt für die iterative Datenbankabfrage diente die cDNA-Sequenz NM\_022648. Eine besonders starke Expression war in Skelettmuskel, Niere, Lunge und Dünndarm zu beobachten. Wenn man die Expression von  $\beta$ -Aktin in den Normalgeweben als Normierung für die Expressionsstärke verwendet, ist die *Tensin*-Expression in Skelettmuskel und Dünndarm geringer einzuschätzen als die Expression in Niere. Im Gehirn, Thymus und in peripheren Blut-Leukozyten wurde keine Bande detektiert. Im Skelettmuskel war ein alternatives, kleineres Transkript zu beobachten.

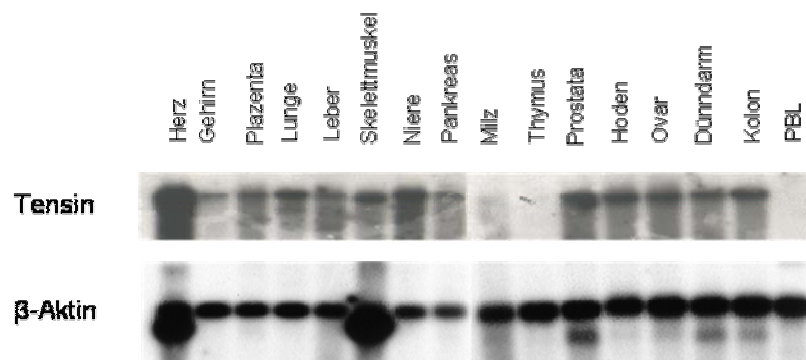


Abb. 18: Normalgewebe-Expression von *Tensin*. Hybridisierung der MTN-Blots I und II (Clontech, Heidelberg) mit einer *Tensin*-spezifischen Sonde (Acc. No.: R18014) und einer  $\beta$ -Aktin Sonde.

Die Normalgewebe-Expression von *Tensin* wurde an einem weiteren cDNA-Set aus verschiedenen humanen Geweben der Firma Clontech mit quantitativer PCR untersucht. Die stärkste Expression wurde in Milz, Lymphknoten und Niere beobachtet (s. Abb. 19). Diese Ergebnisse stimmten nur für die Nieren-Expression mit den Daten der MTN-Hybridisierung überein. Im gleichen Experiment wurden Brust-Zelllinien auf *Tensin*-Expression getestet. Fünf von sieben Zelllinien zeigten nur eine sehr schwache *Tensin*-Expression, hierzu zählte neben den Tumorzelllinien auch die benigne Zelllinie MCF-10A (Abb. 19). Zwei Zelllinien (T47D, MDA-MB-231) zeigten stärkere *Tensin*-Expression, die mit der Expression in normalem Brustgewebe (cDNA, Clontech) vergleichbar war, aber um das 13fache niedriger als die Expression von *Tensin* in der Milz.

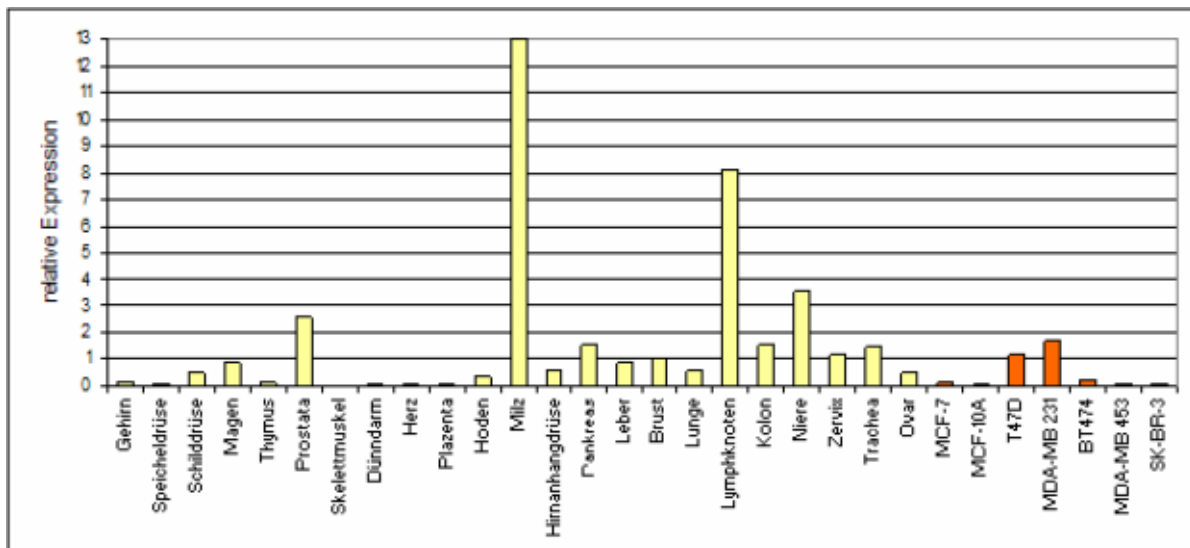


Abb. 19: Expression von *Tensin* in Normalgeweben und Zelllinien analysiert mit quantitativer PCR. Normiert wurden die Expressionswerte mit dem „house-keeping gene“ GAPDH. Normalgewebe (gelb), Zelllinien (orange). Die Expression von *Tensin* in Brust-Normalgewebe cDNA wurde gleich 1 gesetzt und diente als relativer Bezugspunkt für die Expressionswerte der übrigen Proben. In der Grafik sind die resultierenden relativen Expressionshöhen dargestellt.

#### 4.1.3. Mutationsanalyse von Tensin in Mammakarzinomen

Um mögliche Mutationen in der kodierenden Sequenz von Tensin zu finden, die für eine vorzeitige Termination der Translation oder für eine Sequenzveränderung im translatierten Protein verantwortlich sein könnten, wurden Mutationsanalysen mit Hilfe von SSCP („single strand conformation polymorphism“) durchgeführt. Das Tensin-Gen besteht aus 33 Exons. Der kodierende Bereich beginnt im Exon 6 und endet im Exon 33. Für die 28 kodierenden Exons des Tensin-Gens wurden flankierende Primer ausgewählt, um die genomische DNA aus Tumor- und Normalgewebe für die SSCP-Analyse zu amplifizieren. Die Sequenzen der ausgewählten Primerpaare sind im Anhang aufgelistet (Kapitel 13.3.2, Tabelle 17). Die Primer sind in intronischen Bereichen der Gensequenz lokalisiert, so dass auch eventuelle Veränderungen an den Splice-Stellen detektiert werden können. Für die Analyse standen 50 Brusttumorproben aus den Kooperationen innerhalb des BMBF-Projektes mit der Frauenklinik der Universität Düsseldorf und der Universität München zur Verfügung, die vorher nicht auf LoH im Bereich des Chromosoms 2q35 untersucht worden sind. In keiner der Tumorproben konnte mit der SSCP-Methode eine Mutation in der kodierenden Sequenz oder an den Splice-Stellen beobachtet werden.

#### 4.1.4. Verlust der *SFRP1* Expression in soliden Karzinomen

Das Ergebnis der Hybridisierung einer *SFRP1*-spezifischen Sonde auf einem CPA (Clontech) ist in Abb. 20 gezeigt und bestätigte die differentielle Expression in Brustgewebe, wie sie im elektronischen Northern zu erkennen war. Es wurde eine reduzierte Expression in 90% (45/50) der Mammakarzinome beobachtet. Die Expression von *SFRP1* war ebenfalls in anderen Tumoren wie Uteruskarzinomen (52% = 23/44), Kolonkarzinomen (79,5% = 31/39), Ovarialtumoren (75% = 12/16) und Nierenkarzinomen (100% = 20/20) gegenüber den korrespondierenden Normalgeweben mehr als zweifach reduziert (vgl. Abb. 20). Diese Beobachtungen stimmten, außer für Mammakarzinome, nur für Uterus- und Nierenkarzinome mit der Vorhersage aus dem eNorthern überein. In keiner der analysierten Tumorzelllinien war eine *SFRP1*-Expression nachweisbar.

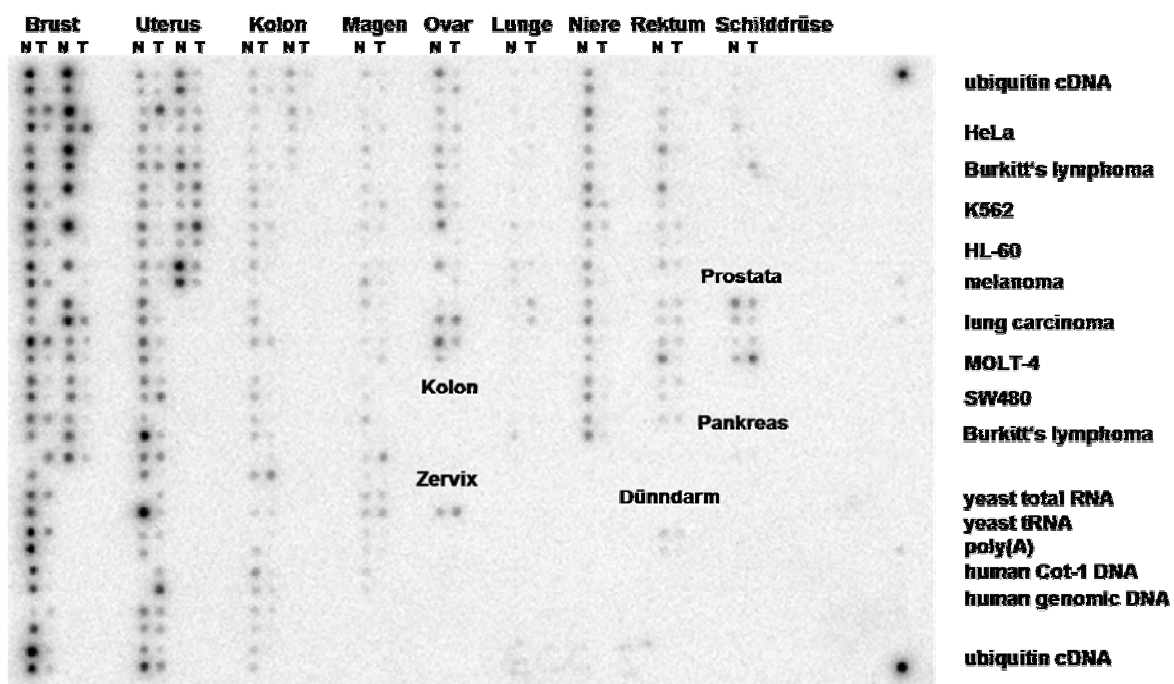


Abb. 20: Northern Hybridisierung des *SFRP1* Gens auf einem Cancer Profiling Array der Firma Clontech (Palo Alto, USA). In Spalten sind jeweils die Normalgewebeprobe (N) und die korrespondierende Tumorprobe (T) eines Patienten aufgetragen.

Die differentielle Expression in Brusttumoren wurde außerdem durch quantitative PCR bestätigt. Die *SFRP1* Expression war in neun von elf getesteten Tumor/Normal-Paaren in den Tumoren reduziert bzw. nicht mehr nachweisbar (s. Abb. 21). In den Normalproben (grüne Balken) wiesen die Expressionswerte teilweise starke Schwankungen zwischen den verschiedenen Patienten auf. Zwischen IDC und ILC waren keine Unterschiede in der Expression von *SFRP1* zu beobachten. Auch unterschiedlicher Lymphknotenstatus (N0 vs. N1) zeigte in diesem Experiment mit einem kleinen Tumorkollektiv keinen Einfluss auf die *SFRP1*-Expression. In Brusttumoren ohne entsprechendes Normalgewebe wurde nur eine geringe *SFRP1* Expression detektiert mit Ausnahme des atypischen medullären Karzinoms, das eine Expression in Höhe der Normalgewebe zeigte (atyp. med. Ca in Abb. 21).

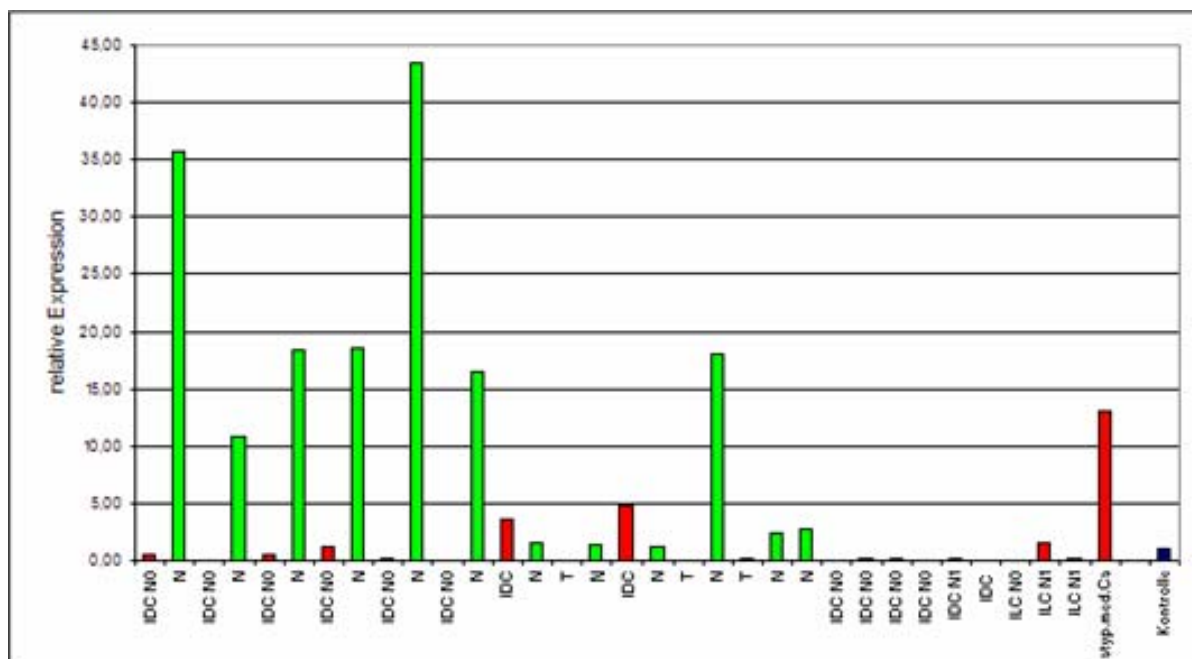


Abb. 21: *SFRP1* Expression in Brust-Normal- und Tumorgewebe analysiert mit quantitativer PCR. Normiert wurden die Expressionswerte mit dem „house-keeping gene“ GAPDH. Die Expression von *SFRP1* in der Kontrollprobe (blauer Balken = Brust-Normalgewebe cDNA, Clontech) wurde gleich 1 gesetzt. In der Grafik sind die resultierenden relativen Expressionslevel der Patientenproben dargestellt (N, grüne Balken = Normalgewebe; rote Balken = Tumorgewebe).

## 4.2. Prognostische Relevanz von SFRP1

### 4.2.1. Charakterisierung eines SFRP1-spezifischen Antikörpers

Die zuvor beschriebenen Experimente gaben Aufschluss über die Expression von *SFRP1* auf RNA-Ebene und zeigten eine differentielle Expression von *SFRP1* in Brusttumoren. Um die SFRP1-Expression auf Proteinebene zu analysieren wurden polyklonale Antikörper gegen spezifische Peptide, abgeleitet aus der humanen SFRP1-Aminosäuresequenz, von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt (vgl. Kapitel 3.13.4, Abb. 9). Die Seren aus Kaninchen wurden affinitätsgereinigt und anschließend charakterisiert sowie auf Spezifität getestet. Die Antikörper erkannten bakteriell exprimiertes humanes SFRP1 Protein (*E. coli*, Abb. 22) und detektierten im Western Blot eine spezifische Bande in Proteinlysaten von SFRP1-transfizierten humanen Zell-Linien (s. Abb. 22, 3+6). Als Kontrolle für die Proteingröße von SFRP1 diente ein *in vitro* Translationsansatz mit kodierender Sequenz von *SFRP1* kloniert in den pcDNA3.1-V5/His-Vektor (IVT, Abb. 22). Für weitere Experimente wurde der SFRP1-Antikörper B (AkB) verwendet, da dieser die höchste Sensitivität in der Charakterisierung zeigte.

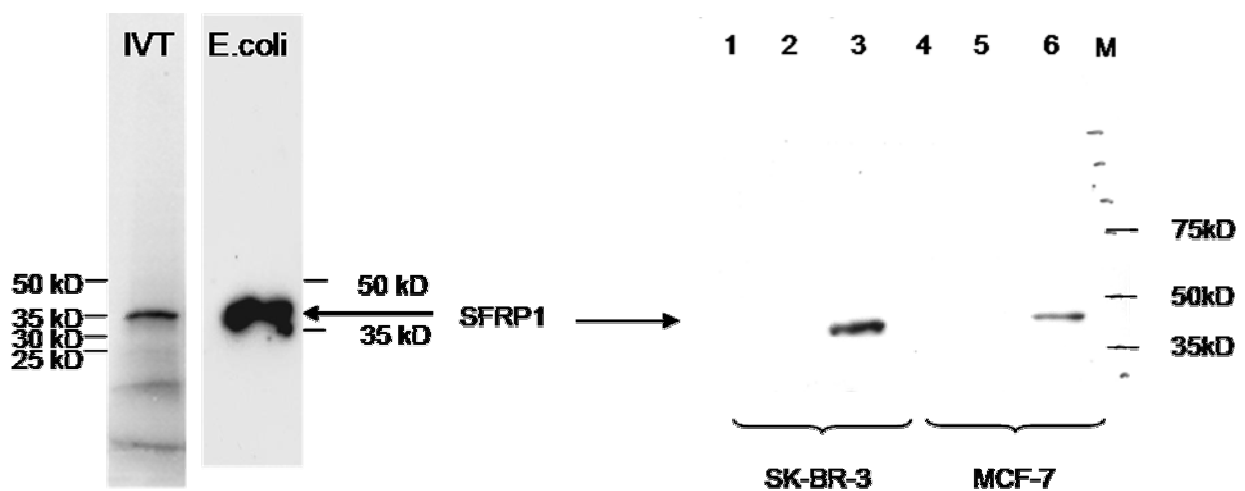


Abb. 22: Charakterisierung des anti-SFRP1 Antikörpers. *In vitro* Translation von SFRP1 (IVT) und Antikörpertest an humanem SFRP1 exprimiert in *E. coli* (*E. coli*). Proteinlysate (~20µg) von Wildtyp-Zellen (1+4), Leervektor-Kontrollen (2+5) und mit SFRP1 transfizierten Zellen (3+6) wurden auf einer 4-15%igen SDS-PAGE getrennt und mit anti-SFRP1 Antikörper (AkB) inkubiert. M = Größenstandard (Rainbow Marker)

Die Lokalisation von SFRP1 in Brustgewebe wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen untersucht. In Abb. 23 ist eine typische SFRP1-Färbung von Brustnormalgewebe in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt. Das normale Epithel und besonders die

Myoepithelschicht des großen Milchgangs sind stark gefärbt (Abb. 23B). Das Expressionsmuster ist zytoplasmatisch. Die Blutgefäße (Endothel) im Bindegewebe und weitere Bindegewebszellen zeigen ebenfalls eine deutliche Färbung.

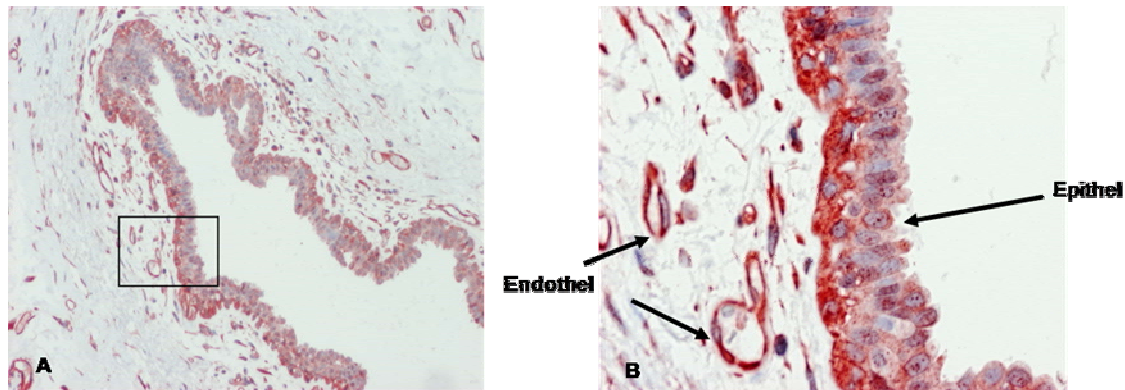


Abb. 23: Lokalisation von SFRP1 im Brustnormalgewebe. Immunhistochemische Färbung mit SFRP1 AkB. A: Normaler Duktus mit umgebendem Bindegewebe und einzelnen Blutgefäßen, Vergrößerung 100x. B: Ausschnitt aus A, doppelschichtiges Epithel und Blutgefäße im angrenzenden Bindegewebe, Vergrößerung 400x.

Die Art der Bindegewebszellen konnte anhand der immunhistochemischen Färbung nicht genau bestimmt werden. Die Charakterisierung der SFRP1-exprimierenden Bindegewebszellen wurde deshalb mit Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Immunfluoreszenzfärbungen erlauben eine Aussage über die Kolo-kalisation von zwei Proteinen durch die gleichzeitige Färbung mit zwei unterschiedlichen Primär-Antikörpern, deren Nachweis mit verschiedenen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern und die anschließende Überlagerung der beiden Fluoreszenzsignale. Die Ergebnisse für SFRP1 und verschiedene Marker sind in Abb. 24 und Abb. 25 dargestellt. Als epithelspezifischer Marker wurde E-Cadherin gewählt, dieses Protein ist in normalen Epithelien der Mamma an der Zellmembran lokalisiert (Abb. 24B). Die E-Cadherin-Färbung (grün) ermöglicht eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Milchgänge (Dukti) voneinander. SFRP1 zeigt ähnlich wie in der immunhistochemischen Färbung neben einer punktförmigen zytoplasmatischen Expression in Epithelzellen eine starke Expression in Bindegewebszellen des Stroma, die zwischen den Milchgängen lokalisiert sind. Die Bindegewebszellen sind von den Epithelzellen gut zu unterscheiden, da sie keine E-Cadherin-Färbung aufweisen.

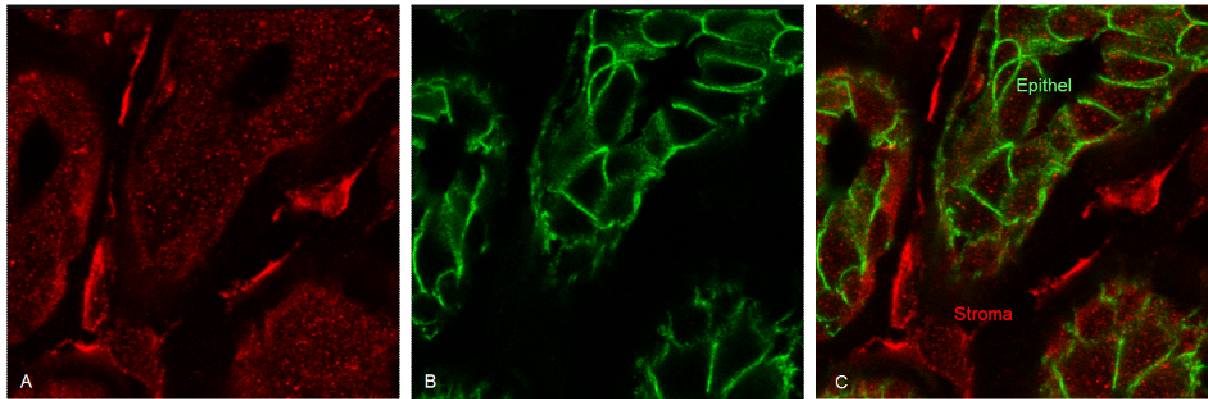


Abb. 24: Kofärbung von SFRP1 und E-Cadherin. A: Immunfluoreszenzfärbung mit SFRP1 AkB. B: Immunfluoreszenzfärbung mit E-Cadherin-Antikörper. C: Überlagerung der Färbungen (rot = SFRP1, grün = E-Cadherin).

Zur Charakterisierung der Bindegewebszellen wurden die Marker Vimentin und CD68 verwendet. Der Marker Vimentin färbt vor allem Fibroblastenzellen (Abb. 25). Die Überlagerung mit der SFRP1-Färbung (Abb. 25c) zeigt deutlich, dass SFRP1 und Vimentin kolokalisiert sind, d.h. SFRP1 wird von Fibroblasten exprimiert. Die Abbildung 25d zeigt eine starke SFRP1-Färbung in Brustepithelzellen. Die Färbung mit dem Marker CD68, der zum Nachweis von Makrophagen benutzt wird, lässt mehrere Makrophagen zwischen diesen Epithelzellen erkennen (Abb. 25e). Die schwache Färbung in den Epithelzellen ist eine unspezifische Hintergrundfärbung des CD68-Antikörpers. Die zwei Makrophagen in der Bildmitte zeigen, wie in der Überlagerung der Bilder deutlich zu erkennen, keine spezifische SFRP1-Färbung, sondern nur eine starke CD68-Färbung (grün, Abb. 25f).

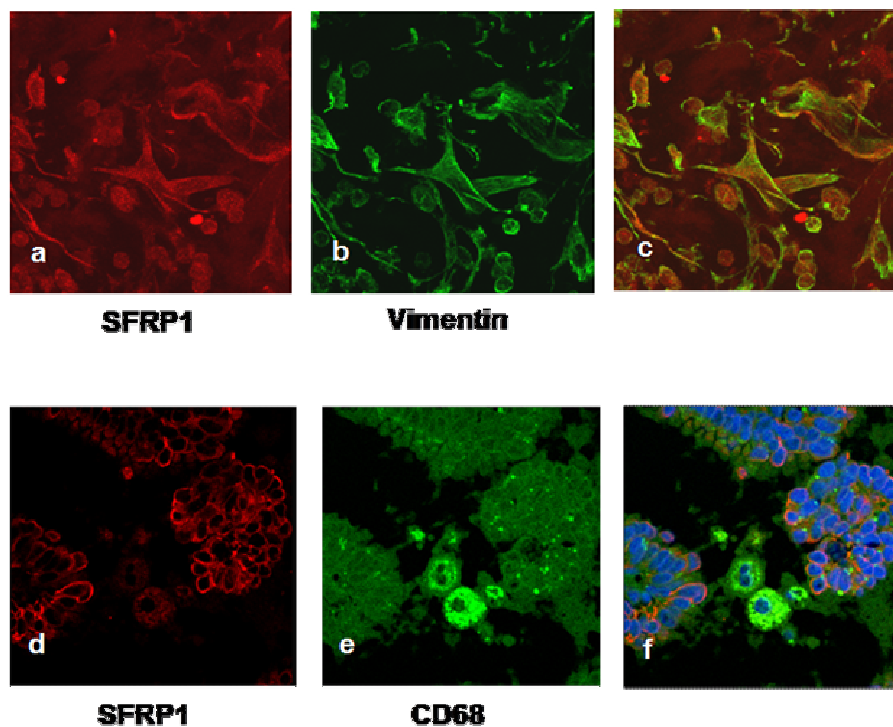


Abb. 25 Kolokalisation von SFRP1 und zelltypspezifischen Markern. a, d: SFRP1 Färbung (rot); b: Vimentin Färbung (grün); e: CD68 Färbung (grün); c, f: Überlagerung der beiden Färbungen (rot = SFRP1, grün = Vimentin bzw. CD68, gelb = Kolokalisation). Die blaue DAPI-Färbung markiert die Zellkerne und dient zur besseren Erkennung der Zellen.

SFRP1 ist im normalen Brustgewebe folglich nicht ausschließlich in Epithelzellen, sondern auch in Endothelzellen und Fibroblasten exprimiert. Das Expressionsmuster ist in allen Zelltypen vor allem zytoplasmatisch. Um das Expressionsmuster von SFRP1 in transient transfizierten Zellen (MCF-7, SK-BR-3) zu analysieren, wurden diese zusätzlich zu den Western-Blot-Experimenten (vgl. Abb. 22) in Immunfluoreszenzfärbungen mit SFRP1-Antikörper untersucht. Es zeigte sich eine überwiegend zytoplasmatische, perinukleäre Expression von SFRP1 und in SK-BR-3 Zellen war zusätzlich eine starke Färbung an der Zellmembran zu beobachten (s. Abb. 26). Die Färbung im Zytoplasma hatte in beiden Zelllinien ein punktförmiges Muster, während die Färbung an der Zellmembran gleichförmig war. Das Muster stimmt mit dem überein, das in den Immunfluoreszenzfärbungen von Brustnormalgewebe beobachtet wurde (vgl. Abb. 24A). Die Leervektor-Kontrollen (MOCK Kontrolle) zeigten in beiden Zell-Linien keine Färbung. Da sich die Expression von SFRP1 in den transfizierten Mammatumor-Zelllinien im Western Blot und in der Immunfluoreszenz nachweisen ließ, konnten transient transfizierte Zellen verwendet werden, um die Tumorrelevanz von SFRP1 in funktionellen Analysen zu untersuchen (siehe Kapitel 4.3.).



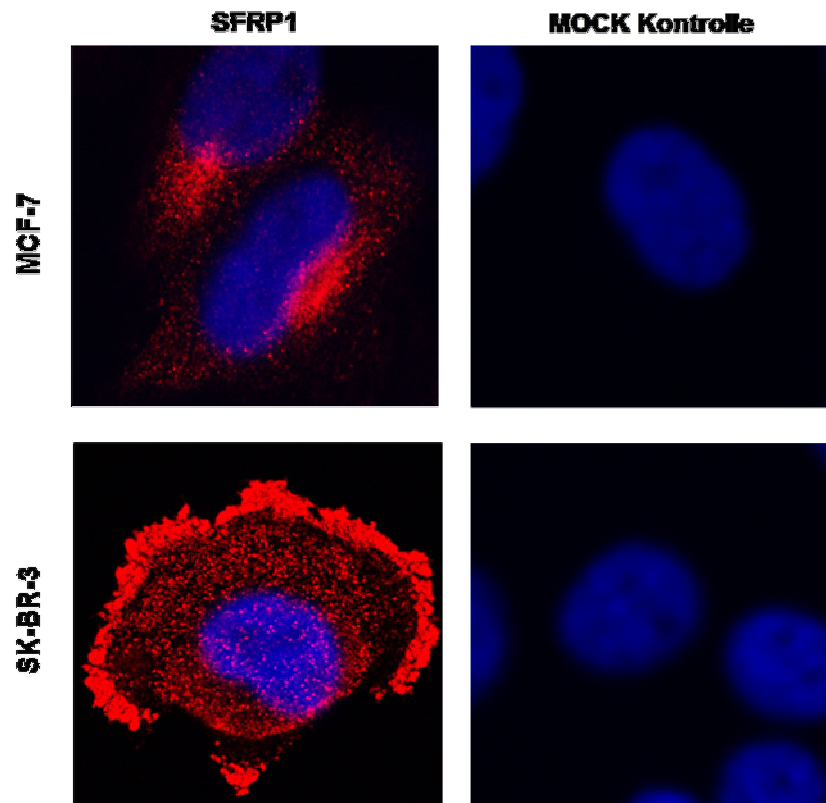


Abb. 26: Immunfluoreszenz-Färbung von transient transfizierten MCF-7 und SK-BR-3 Zellen. Gezeigt sind jeweils die Transfektion mit SFRP1 und die Negativ-Kontrolle (MOCK Kontrolle). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt.

#### 4.2.2. Korrelation von SFRP1-Expression und klinischen Parametern

Mit Hilfe des SFRP1-Antikörpers wurde zunächst die Expression von SFRP1 in Mammakarzinomen an einer Serie mit 71 Mammatumoren untersucht (Paraffinmaterial zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie, Charité Campus Mitte, Universitätsmedizin Berlin). SFRP1 war besonders stark in Epithelzellen sowie Endothel- und Fibroblastenzellen des normalen Brustgewebes exprimiert (s. Abb. 27A). Die Färbung war zytoplasmatisch und in einigen Fällen war eine Konzentration im apikalen Bereich der Epithelzellen erkennbar. In 64 von 71 Fällen waren Normal- und Tumorgewebe eines Patienten vorhanden. Diese Fälle wurden zur Beurteilung der differentiellen Expression verwendet. Ein Verlust bzw. eine reduzierte Expression von SFRP1 wurde in 72% (46/64) der Mammatumore im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe beobachtet (vgl. Tabelle 12). Die Tumorzellen zeigten eine schwache oder auch gar keine Färbung während die Stromazellen auf dem gleichen Schnitt stark gefärbt waren (s. Pfeile in Abb. 27B).

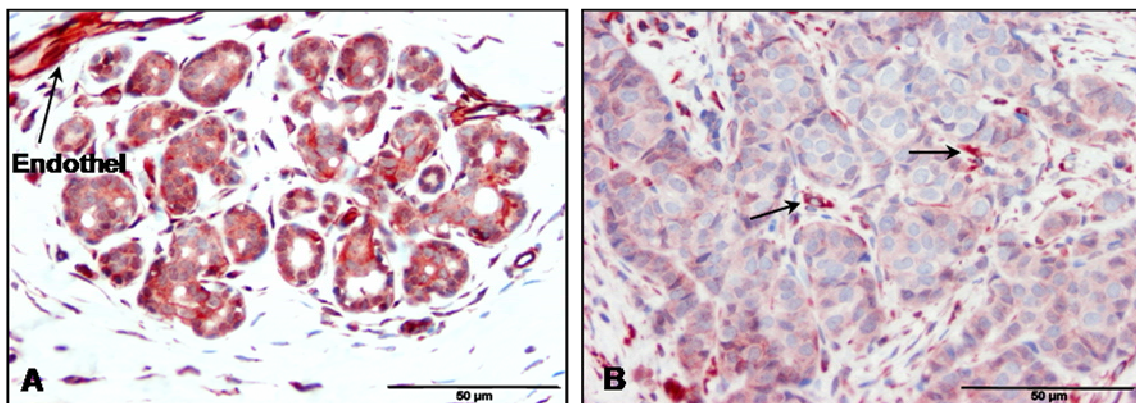


Abb. 27: IHC-Färbungsmuster von SFRP1 in normalem und malignem Brustgewebe. A: In normalem Mamma-Epithel (hier Lobuli) war eine starke SFRP1-Expression im Zytoplasma der Epithelzellen zu beobachten. Endothelzellen und Stromazellen färbten ebenfalls positiv für SFRP1. B: Tumorzellen eines invasiv duktales Karzinoms zeigten schwache oder keine SFRP1-Expression während die umgebenden Stromazellen eine starke zytoplasmatische SFRP1-Expression aufwiesen (Pfeile). Messbalken: 50µm

Tabelle 12: SFRP1 Expression im Tumorgewebe versus Normalgewebe mit Bezug auf klinische Parameter (Brusttumorkollektiv, Institut für Pathologie, Charité).

Histopathologische Parameter	SFRP1 Expression (Tumor versus Normal)		
	% (Anzahl der Fälle/Gesamtanzahl)		
	weniger	gleich	stärker
Histologischer Tumortyp			
Lobulär	<b>87,5%</b> (7/8)	<b>12,5%</b> (1/8)	<b>0%</b> (0/8)
Duktal	<b>72%</b> (35/49)	<b>24%</b> (12/49)	<b>4%</b> (2/49)
Tumorgröße (pT)			
pT1a/b	<b>75%</b> (9/12)	<b>17%</b> (2/12)	<b>8%</b> (1/12)
pT1c	<b>73%</b> (37/51)	<b>25%</b> (13/51)	<b>2%</b> (1/51)
pT2-4	<b>50%</b> (1/2)	<b>50%</b> (1/2)	<b>0%</b> (0/2)
Tumorgrad (BRE)			
1	<b>67%</b> (16/24)	<b>33%</b> (8/24)	<b>0%</b> (0/24)
2	<b>63%</b> (17/27)	<b>33%</b> (9/27)	<b>4%</b> (1/27)
3	<b>88%</b> (14/16)	<b>6%</b> (1/16)	<b>6%</b> (1/16)
Lymphknotenstatus			
N0	<b>73%</b> (43/59)	<b>24%</b> (14/59)	<b>3%</b> (2/59)
N+	<b>50%</b> (4/8)	<b>50%</b> (4/8)	<b>0%</b> (0/8)
Östrogenrezeptor			
+	<b>69%</b> (35/51)	<b>29%</b> (15/51)	<b>2%</b> (1/51)
-	<b>80%</b> (8/10)	<b>10%</b> (1/10)	<b>10%</b> (1/10)
Progesteronrezeptor			
+	<b>69%</b> (34/49)	<b>29%</b> (14/49)	<b>2%</b> (1/49)
-	<b>75%</b> (9/12)	<b>17%</b> (2/12)	<b>8%</b> (1/12)

Die statistische Analyse der Ergebnisse dieses Tumorkollektivs deutete auf einen möglichen Zusammenhang zwischen SFRP1 Verlust und Tumorgrad hin ( $p = 0,046$ ). Um die Signifikanz von SFRP1 als prognostischer Marker in Brustkarzinomen in einem größerem Tumorkollektiv zu untersuchen, wurde die SFRP1 Expression auf einem prognostischen „tissue microarray“ (TMA) analysiert. Der Array bestand aus 2221 gut charakterisierten Brusttumor-Proben [Torhorst *et al.*, 2001]. Für die Analyse des Verlust-Zeitpunktes von SFRP1 wurde zusätzlich ein Progressions-TMA verwendet, der Brustnormalgewebe, benigne proliferative Veränderungen und *in situ* Karzinome beinhaltete. Die Färbung wurde nach dem „immunoreactivity score“ (IRS) beurteilt, der auch für die Beurteilung des Hormonrezeptor-Status in Brusttumoren eingesetzt wird [Remmele und Stegner, 1987]. Der resultierende Wert berücksichtigt die Intensität der Färbung und den Anteil der gefärbten Zellen und kann zwischen 0 und 12 Punkten betragen. Für die Analysen in dieser Arbeit wurden folgende Gruppen definiert und verglichen, SFRP1-negative Tumore (IRS 0-1) und SFRP1-positive Tumoren (schwache Expression IRS 2-4, moderate/starke Expression IRS 6-12). Ein IRS von 0-1 bedeutet keine Färbereaktion oder eine schwache Färbereaktion in weniger als 10% der Zellen, wobei nur die Färbung in Epithel- bzw. Tumorzellen und nicht die Expression in Stromazellen berücksichtigt wurde.

Bei der Auswertung des prognostischen TMAs wurde für 27% der invasiven Brustkarzinome eine moderate bis starke SFRP1 Expression detektiert (IRS 6-12), in 73% der Tumore wurde hingegen eine schwache Expression (27%, IRS 2-4) oder ein Verlust (46%, IRS 0-1) der SFRP1 Expression beobachtet. Dieses Verhältnis von SFRP1-positiven Tumoren zu Tumoren mit reduzierter SFRP1 Expression war in allen Tumorsubtypen zu beobachten, mit Ausnahme der muzinösen Karzinome, die nur in 55% der Fälle eine Reduktion der SFRP1-Expression zeigten ( $p = 0,003$ ).

Mit Hilfe der univariaten Analyse wurde die Beziehung zwischen SFRP1-Expression und klinischen Parametern wie Tumorgröße (pT), Tumorgrad (BRE) und Lymphknotenstatus (pN) untersucht. Die SFRP1-Expression war invers mit der Tumorgröße korreliert ( $p < 0,001$ ), d.h. je größer der Tumor desto geringer die SFRP1 Expression. Zwischen den übrigen Parametern wie Tumorgrad, Tumortyp, Lymphknoten-Status oder hormoneller Therapie und der SFRP1-Expression bestand keine statistisch signifikante Korrelation. Die Ergebnisse aus der TMA-Färbung sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: Beziehung zwischen SFRP1 Expression und verschiedenen klinischen Parametern in Patienten mit invasivem Brustkarzinom.

Parameter	auswertbare Fälle	SFRP1-negativ (IRS < 2)	SFRP1-positiv (IRS ≥ 2)	Signifikanz
Alle Tumore	1967	912 (46%)	1055 (54%)	
Tumorgrad (BRE)				0,138 <sup>++</sup>
1	475	247 (52%)	228 (48%)	
2	739	334 (45%)	405 (55%)	
3	608	286 (47%)	322 (53%)	
Histologischer Tumortyp				0,069 <sup>+</sup>
Duktal	1414	637 (45%)	777 (55%)	
Lobulär	244	107 (44%)	137 (56%)	
Andere	309	168 (54%)	141 (46%)	
TumorgroÙe (pT)				<0,001 <sup>++</sup>
pT1	700	298 (43%)	402 (57%)	
pT2	926	427 (46%)	499 (54%)	
pT3	109	52 (48%)	57 (52%)	
pT4	222	128 (58%)	94 (42%)	
Lymphknotenstatus (pN)				0,844 <sup>+</sup>
pN0	822	385 (47%)	437 (53%)	
pN+	824	390 (47%)	434 (53%)	
Hormonelle Therapie				0,878 <sup>+</sup>
Ja	416	176 (42%)	240 (58%)	
Nein	300	125 (42%)	175 (58%)	

\* Fisher's Exakt-Test, + Chi-Quadrat-Test, ++ Chi-Quadrat-Test für Trends

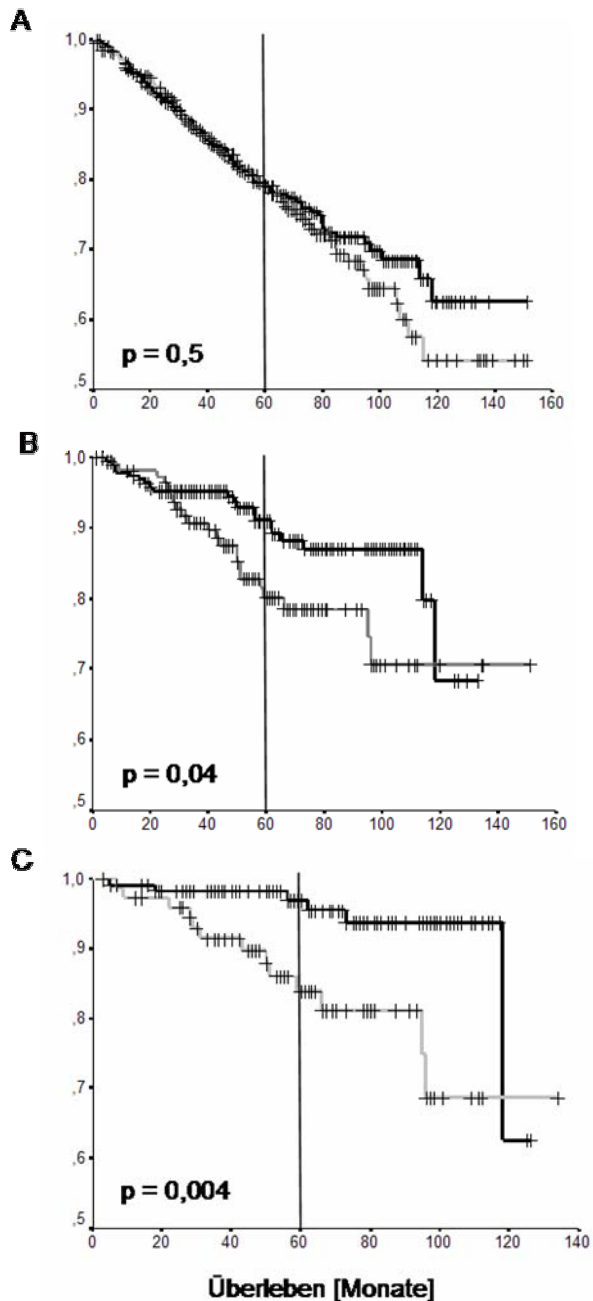
Die Untersuchung der SFRP1-Expression in Brust-Normalgeweben, benignen Veränderungen und *in situ* Karzinomen mit Hilfe des Progressions-TMAs zeigte einen progressiven Verlust von SFRP1 mit zunehmender Malignität. Der SFRP1-Verlust geschieht folglich nicht zufällig, sondern ist mit dem Stadium der Malignität assoziiert. Eine fehlende SFRP1-Expression war in einem geringen Anteil von Normalgeweben und benignen Veränderungen zu beobachten (13% bzw. 15%). Die *in situ* Karzinome wiesen bereits einen Verlust in 43% der Tumore auf. Die Ergebnisse für den Progressions-TMA sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: SFRP1-Expression in verschiedenen Progressionsstadien vom Mamma-Normalgewebe über benigne Veränderungen bis zum *in situ* Karzinom (DCIS/LCIS).

Histologie	Auswertbare Fälle	SFRP1-negativ (IRS < 2)	SFRP1-positiv (IRS ≥ 2)
Normalgewebe	38	4 (11%)	34 (89%)
Apokrine Metaplasie	10	1 (10%)	9 (90%)
Mastopathie	20	1 (5%)	19 (95%)
Intraduktale Hyperplasie	22	3 (14%)	19 (86%)
Sklerosierte Adenose	11	1 (9%)	10 (91%)
Papillom	28	7 (25%)	21 (75%)
Atypische duktale Hyperplasie (ADH)	3	0 (0%)	3 (100%)
LCIS	8	2 (25%)	6 (75%)
DCIS	48	22 (46%)	26 (54%)

Da neben den klinischen Parametern außerdem tumorspezifische Überlebensdaten zu 843 TMA-Proben des Prognostik-TMAs zur Verfügung standen, wurden Überlebensanalysen mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode und des log-rank Tests durchgeführt. Für die Überlebensanalyse wurde das tumorspezifische Überleben von 843 Patientinnen zur SFRP1-Expression der entsprechenden Tumore in Beziehung gesetzt. Wurde die Gesamtheit der Patientinnen betrachtet, ergab sich keine Assoziation zwischen SFRP1-Expression und dem tumor-spezifischen Überleben ( $p = 0,5$ ; s. Abb. 28A). Multivariate Analysen gaben einen Hinweis auf eine mögliche Bedeutung der Interaktion von Tumorgröße und SFRP1-Expression für die Überlebensprognose ( $p = 0,06$ ). Deshalb wurde eine Analyse mit ausschließlich kleinen Tumoren (pT1) durchgeführt, und hier zeigte sich, dass der Verlust der SFRP1-Expression in pT1 Tumoren mit einer schlechteren Prognose korreliert. Die 5-Jahres-Überlebensrate (60 Monate) von Patientinnen mit SFRP1-negativen Tumoren betrug  $80,2 \pm$

4,1%, im Gegensatz zu  $91,2 \pm 2,3\%$  bei Patientinnen mit SFRP1-positiven Tumoren ( $p = 0,04$ , s. Abb. 28B).



Die Prognose-Relevanz von SFRP1 wurde noch eindeutiger, wenn nur kleine Tumore mit niedrigem Tumorgrad (BRE 1-2) analysiert wurden. Die 5-Jahres-Überlebensrate (60 Monate) lag für Patienten mit SFRP1-negativen Tumoren um 15% niedriger als bei SFRP1-positiven Tumoren ( $p = 0.004$ , s. Abb. 28C). Dass SFRP1 ein unabhängiger prognostischer Faktor für tumor-spezifisches Überleben in frühen Tumoren ist, zeigten Berechnungen mit dem Cox-Regressions-Model ( $p = 0,01$ ). Das relative Risiko betrug 3,9, das bedeutet Patientinnen mit SFRP1-negativen Tumoren haben ein vierfach erhöhtes Risiko an ihrer Tumorerkrankung zu versterben als Patientinnen mit SFRP1-positiven Tumoren.

Abb. 28: Korrelation von SFRP1-Expression und tumorspezifischem Überleben (Kaplan-Meier-Kurven). SFRP1-positive Tumore sind durch schwarze Kurven dargestellt, die hellgrauen Kurven repräsentieren SFRP1-negative Tumore. Die senkrechte Linie markiert die 5-Jahres-Überlebensrate. A: alle Tumore ( $n = 843$ ,  $p = 0,5$ ), B: pT1-Tumore ( $n = 310$ ,  $p = 0,04$ ), C: pT1, BRE 1-2 Tumore ( $n = 152$ ,  $p = 0,004$ ).

Interessanterweise deuteten die Überlebenskurven für Patientinnen mit späten, infiltrierenden, metastasierten Tumoren auf eine gegensätzliche Rolle von SFRP1 hin. Bei der Analyse der Subgruppe pT4, pN+ zeigte sich eine signifikant bessere Prognose für SFRP1-negative Tumore ( $p = 0,039$ ). Die 5-Jahres-Überlebensrate lag bei Patienten mit SFRP1-negativen Tumoren bei  $64,1\% \pm 9,3$  im Vergleich zu nur  $37,5\% \pm 9,3$  für Patienten mit SFRP1-positiven Tumoren (s. Abb. 29). In den pT4 Tumoren war die SFRP1-Expression ebenfalls ein unabhängiger Marker für das tumor-spezifische Überleben (Cox-Regressionsanalyse, relatives Risiko 2,4;  $p = 0,026$ ). Bei infiltrierenden Tumoren haben Patientinnen mit SFRP1-exprimierenden Tumoren ein mehr als zweifach höheres Risiko an der Tumorerkrankung zu versterben.

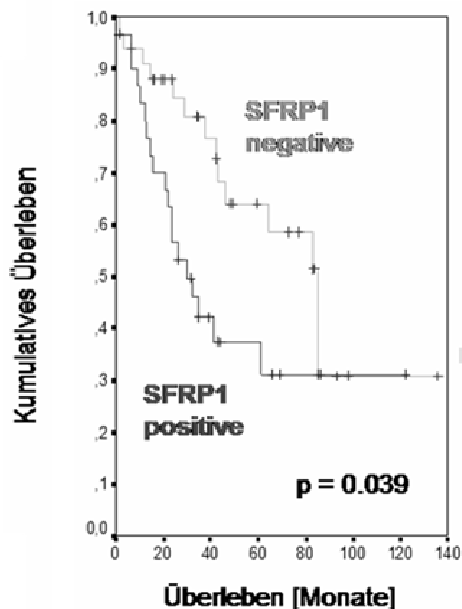


Abb. 29: Korrelation zwischen SFRP1-Expression und tumorspezifischem Überleben in pT4, pN+ Tumoren ( $n = 65$ ,  $p = 0,039$ ). SFRP1-positive Tumore sind durch die hellgraue dargestellt, die dunkelgraue Kurve repräsentiert SFRP1-negative Tumore.



### 4.3. Funktionelle Analyse von SFRP1

Aus der Literatur war bekannt, dass SFRP1 in MCF-7 Brust-Karzinom-Zellen die Anfälligkeit für apoptotische Stimuli (TNF-alpha, Ceramid oder Adriamycin) modifiziert und die Sensitivität gegenüber cytotoxischer Behandlung erhöht [Melkonyan *et al.*, 1997]. In Glioma-Zellen wurden eine reduzierte Migrationsaktivität und eine geringere Freisetzung von MMP-2 in SFRP1-Transfektanten beobachtet [Roth *et al.*, 2000]. Der Einfluss von SFRP1 auf das Zell-Wachstum (Proliferation), die Zell-Adhäsion und das Invasionsverhalten von Brust-Karzinom-Zellen ist bisher nicht untersucht worden. Die Ergebnisse aus den TMA-Analysen deuteten auf eine Bedeutung von SFRP1 in der frühen Tumorgenese hin. Das könnte einen Zusammenhang zwischen SFRP1-Expression und Proliferations- oder Adhäsionsverhalten von Epithelzellen bedeuten. Deshalb wurden Brusttumor-Zelllinien (MCF-7, SK-BR-3), die im Wildtyp kein SFRP1 exprimieren, mit einem SFRP1-tragenden Expressionsvektor transfiziert und in verschiedenen funktionellen Assays untersucht. Die Expression von SFRP1 in den Transfektanten wurde mit Western Blot und Immunfluoreszenzfärbungen kontrolliert (vgl. Abb. 22+23).

#### 4.3.1. Einfluss von SFRP1-Überexpression auf das Proliferationsverhalten von Mammakarzinom-Zelllinien

Die Proliferation wurde mit Hilfe des „Cell Proliferation Kits“ (XTT) von Roche gemessen. Im Experiment wurden die SFRP1-transfizierten Zellen mit den Leervektor-Kontrollen verglichen. Abb. 30 und Abb. 31 zeigen die gemittelten Extinktionswerte aus vier Experimenten für drei verschiedene Zeitpunkte (24h, 48h und 72h) und zwei verschiedene Zelllinien (SK-BR-3 und MCF-7), die Standardabweichung ist jeweils als Fehlerbalken angegeben. Das Liniendiagramm (Abb. 30A) stellt den Verlauf der Proliferation über 72h dar. Um einen besseren Vergleich zwischen den Leervektor-Kontrollen und den SFRP1-transfizierten Zellen zu ermöglichen, wurde in Abb. 30B eine andere Darstellung der Daten gewählt. Die Extinktionswerte der Leervektor-Kontrollen wurden hier für jeden Zeitpunkt gleich 100% gesetzt. Die mit SFRP1-transfizierten SK-BR-3 Zellen zeigten nach 24 Stunden und 48 Stunden eine verringerte Proliferation verglichen mit den Leervektor-Kontrollen (40% bzw. 10% geringer). Der Unterschied zu diesen Zeitpunkten ist statistisch signifikant (t-Test;  $p = 0.005$ ). Nach 72 Stunden Inkubation war die Proliferation von SFRP1-transfizierten Zellen und Kontrollen ungefähr gleich.

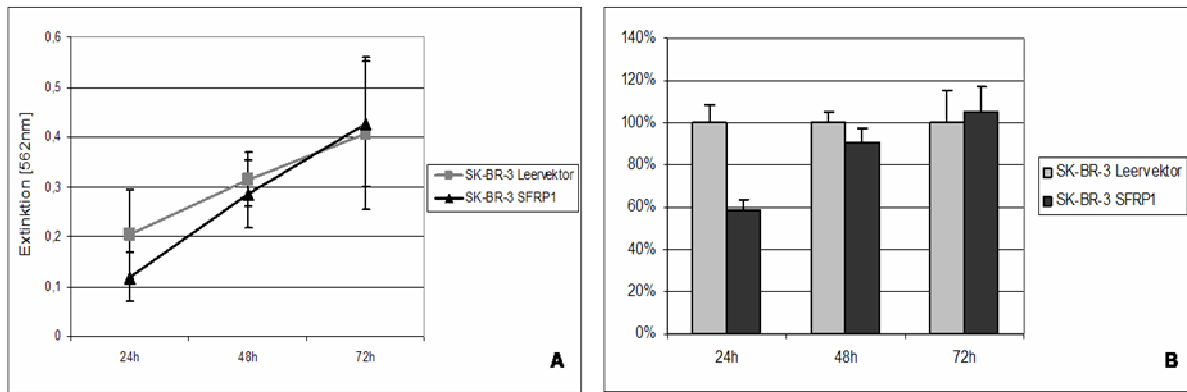


Abb. 30: Proliferationsassay mit SK-BR-3 Zellen. A: Die gemittelten Extinktionswerte der SFRP1-transfizierten Zellen (schwarz) sind im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen (grau) dargestellt. B: Für diese Darstellung wurden die Extinktionswerte der Leervektor-Kontrollen zum besseren Vergleich mit den SFRP1-transfizierten Zellen als 100% gesetzt.

Die mit SFRP1-transfizierten MCF-7 Zellen zeigten eine verringerte Proliferation verglichen mit den Leervektor-Kontrollen. Die Proliferations-Kurven von Leervektor-Kontrollen und SFRP1-transfizierten Zellen laufen zwischen 48h und 72h parallel (Abb. 31A). Die Fehlerbalken für die Leervektorkontrollen und SFRP1-Transfektanden sind für einen Zeitpunkt jeweils vergleichbar. Nach 72 Stunden Inkubation war die Zellzahl der SFRP1-transfizierten Zellen um mehr als 20% geringer als die der Leervektor-Kontrollen (Abb. 31B). Der größte Unterschied in der Proliferation zwischen SFRP1-transfizierten Zellen und Leervektor-Kontrollen zeigte sich nach 48 Stunden, hier lagen die SFRP1-transfizierten Zellen 40% niedriger als die Kontrollen. Wie bei den SK-BR-3 Zellen ist der Unterschied zum Zeitpunkt 48 Stunden als statistisch signifikant zu betrachten (t-Test,  $p = 0,006$ ). Zum Zeitpunkt 24 Stunden verhalten sich die SFRP1-transfizierten Zellen verschieden von den Leervektorkontrollen, aber statistisch gesehen ist der Unterschied an der Signifikanzgrenze (t-Test,  $p = 0,06$ ).

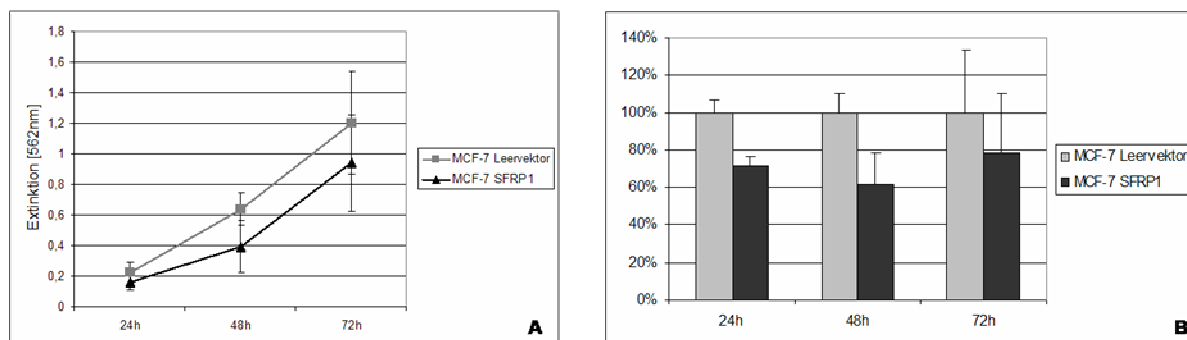


Abb. 31: Proliferations-Assay mit MCF-7 Zellen. A: Die gemittelten Extinktionswerte der SFRP1-transfizierten Zellen (schwarz) sind im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen (grau) dargestellt. B: Die Extinktionswerte der Leervektor-Kontrollen sind gleich 100% gesetzt und die Extinktionswerte der SFRP1-transfizierten im Vergleich dargestellt.

Neben dem Einfluss von SFRP1 auf die Proliferation sollte auch der Einfluss auf das Verankerungs-unabhängige Wachstum untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen auf einer Matrix aus polyHEMA ausgesät und die Zellzahl nach 5 Tagen und 7 Tagen wie beim Proliferationsassay mit XTT bestimmt. In Abb. 32 sind für beide Zelllinien die Ergebnisse aus zwei Experimenten zusammengefasst und die Standardabweichungen angegeben. Für MCF-7 Zellen war kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den SFRP1-transfizierten Zellen zu beobachten. Die Abweichungen zwischen den Einzelexperimenten waren sehr hoch. Die Werte für SK-BR-3 Zellen, besonders für die SFRP1-transfizierten, waren für eine Auswertung zu niedrig. Da die Zellen allgemein auf poly-HEMA beschichteten Platten nur sehr schlechtes Wachstum zeigten und die Messwerte für SK-BR-3 Zellen an der unteren Detektionsgrenze lagen, wurde dieser Versuch nach dem hier gezeigten Wiederholungsexperiment abgebrochen.

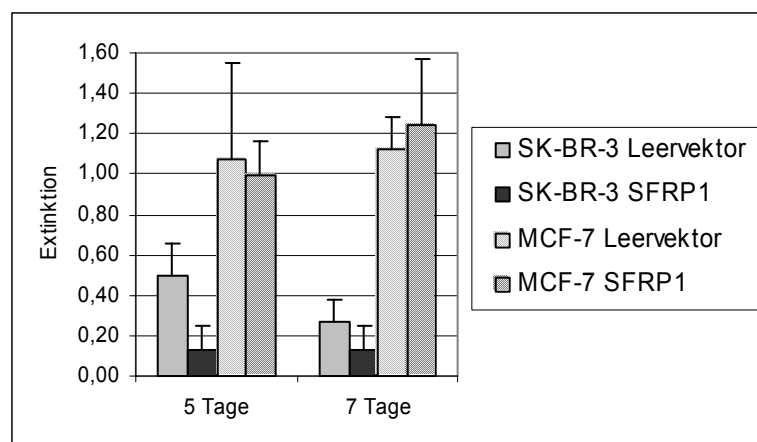


Abb. 32: Wachstum von SK-BR-3 (einfarbige Säulen) und MCF-7 (gestreifte Säulen) Zellen auf polyHEMA beschichteten Platten. Die Leervektor-Kontrollen sind in hellgrau, die SFRP1-transfizierten Zellen in dunkelgrau dargestellt.

#### 4.3.2. Adhäsionsverhalten von SFRP1-transfizierten Mammakarzinom-Zelllinien

Sowohl für den Adhäsionsassay als auch für den Invasionsassay wurde die Basalmembran im Experiment mit Matrigel simuliert. Mit Hilfe des Adhäsionsassays wurde die Fähigkeit von Zellen sich an eine Matrix anzuheften untersucht. Da die ersten Messungen mit einer Mischung aus transient transfizierten Klonen in Wiederholungsexperimenten große Schwankungen aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurde der Adhäsionsassay mit stabil transfizierten Klonen wiederholt. In Abb. 33 und Abb. 34 sind die Extinktionswerte für den Adhäsionsassay mit MCF-7 bzw. SK-BR-3 Zellen dargestellt. Die gezeigten Extinktionswerte sind Mittelwerte aus jeweils drei parallelen Ansätzen. Die Standardabweichung für jeden Wert ist in der Abbildung als Fehlerbalken angegeben.

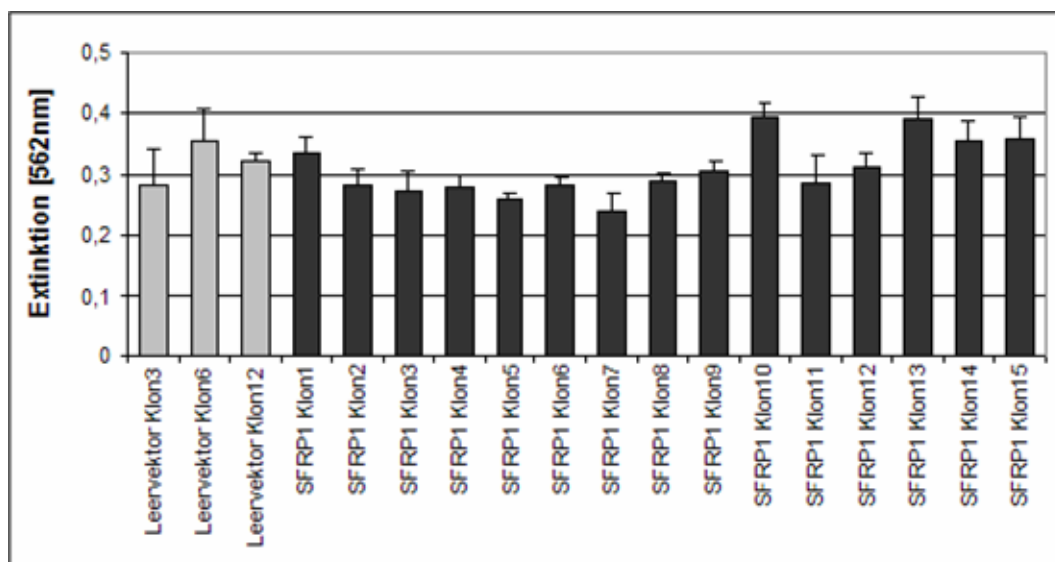


Abb. 33: Adhäsionsassay mit stabil-transfizierten MCF-7 Zellen. Gezeigt sind die nach 30 Minuten Inkubation gemessenen Extinktionswerte der adhären Zellen bei 562nm. Die Leervektor-Kontrollen sind als hellgraue Balken dargestellt. SFRP1-transfizierte Klone sind als schwarze Balken dargestellt.

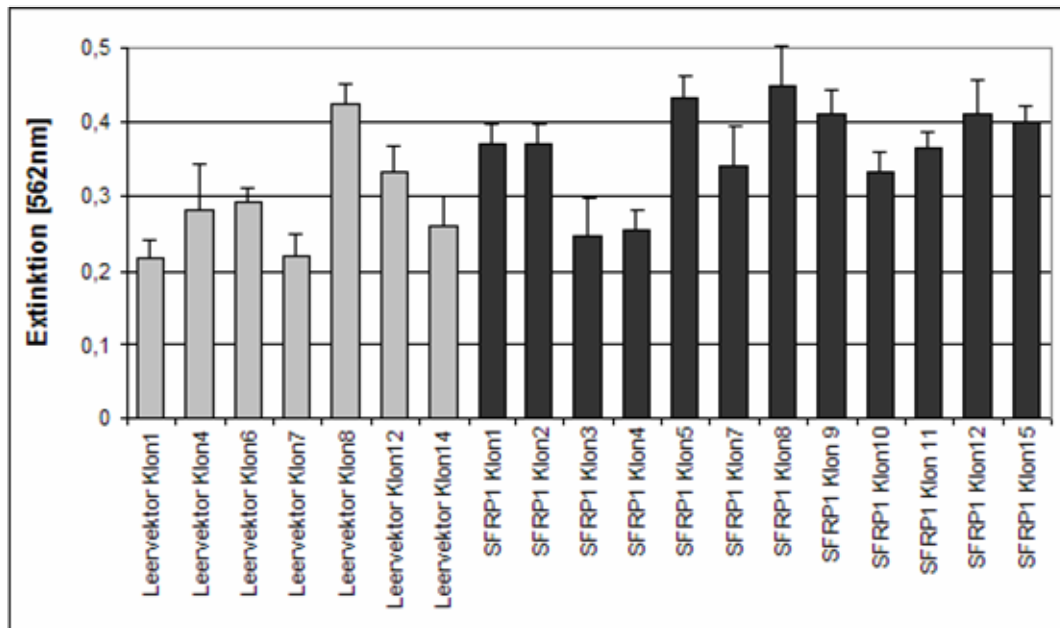


Abb. 34: Adhäsionsassay mit stabil-transfizierten SK-BR-3 Zellen. Gezeigt sind die nach 30 Minuten Inkubation gemessenen Extinktionswerte der adhärennten Zellen. Die Leervektor-Kontrollen sind als hellgraue Balken dargestellt. SFRP1-transfizierte Klone sind als schwarze Balken dargestellt.

Für MCF-7 Zellen war kein Unterschied zwischen Leervektor-Kontrollen und SFRP1-transfizierten Klonen zu beobachten. Die SFRP1-transfizierten SK-BR-3 Zellen zeigten hingegen für die Mehrzahl der untersuchten Klone eine erhöhte Adhäsion verglichen mit den Leervektor-Kontrollen. Obwohl für den Adhäsionsassay stabil-transfizierte Einzelklone verwendet wurden, variieren die Extinktionswerte zwischen den einzelnen Klonen immer noch stark. Die Varianz eines Einzelklons in den Wiederholungsexperimenten ist jedoch geringer, als bei Experimenten mit einer Mischung aus transient transfizierten Klonen.

#### 4.3.3. Einfluss von SFRP1 auf die Invasivität von Mammakarzinom-Zelllinien

Um die Invasivität der Zellen zu untersuchen, wurden mit Matrigel beschichtete Transwell™ Filter (Costar Corning, USA) verwendet. Die Quantifizierung der invasiven und nicht-invasiven Zellen erfolgte mit Hilfe eines Tetrazolium-basierten kolorimetrischen Assays [Imamura *et al.*, 1994]. Die Ergebnisse sind als Anteil invasiver Zellen in Prozent für SK-BR-3 Zellen in Abb. 35 und für MCF-7 Zellen in Abb. 36 dargestellt. Für jede Zelllinie wurden jeweils acht Wiederholungsexperimente durchgeführt. Neben den mit SFRP1-tragendem Vektor transfizierten Zellen wurden stets die Leervektor-Kontrollen als Referenz mitgeführt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass sich bei Fibroblasten-

Zellen 5% der Zellen invasiv verhalten (Daten nicht gezeigt). Dieser Wert wurde als Grund-Invasivität betrachtet, die in Fibroblasten durch den Zusatz von Serum im Medium induziert wurde. Als Höchstwert für Invasivität wurde in den Vorversuchen 60% bei MDA-MB-231 Zellen gemessen (Daten nicht gezeigt). MDA-MB-231 Zellen sind Brusttumorzellen, die in der Literatur als hoch-invasiv beschrieben worden sind [Sommers *et al.*, 1994; Sommers, 1996].

Die SK-BR-3 Zellen zeigten nach 72 Stunden sowohl in den Leervektor-Kontrollen als auch in den transfizierten Zellen einen höheren Anteil invasiver Zellen (42%) als die MCF-7 Zellen (8%). Wenn man einen Wert von 5% invasiver Zellen als Grund-Invasivität betrachtet, dann zeigten die MCF-7 kaum mehr als diese Grund-Invasivität. Bei beiden Zell-Linien waren zwischen den SFRP1-positiven Zellen und den Kontrollen nur geringe Unterschiede zu beobachten. Nach 48 Stunden waren die größten Unterschiede erkennbar, d.h. SFRP1-positive Zellen hatten 12% bzw. 25% weniger invasive Zellen als die Leervektor-Kontrolle. Aufgrund der hohen Standardabweichung waren die Daten statistisch nicht auswertbar.

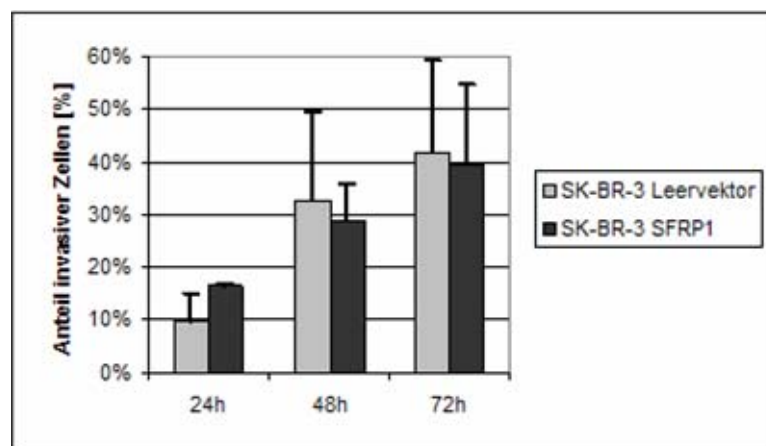


Abb. 35: Invasionsassay mit SK-BR-3 Zellen. Dargestellt sind die Median-Werte und die Standardabweichung aus acht Wiederholungsexperimenten für Leervektor-Kontrollen (hellgraue Balken) und SFRP1-transfizierte Zellen (schwarze Balken).

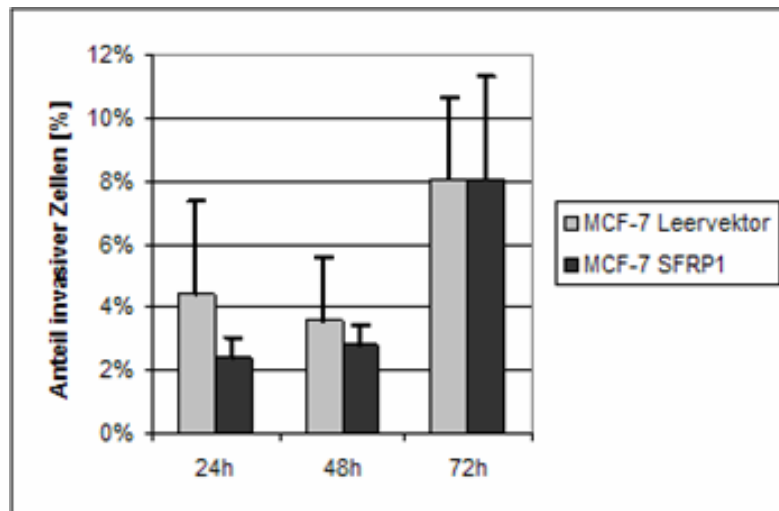


Abb. 36: Invasionsassay mit MCF-7 Zellen. Dargestellt sind die Median-Werte und die Standardabweichung aus acht Wiederholungsexperimenten für Leervektor-Kontrollen (hellgraue Balken) und SFRP1-transfizierte Zellen (schwarze Balken).