

5. Diskussion

Das biologische Verhalten einer Zelle (Wachstum, Differenzierung, Apoptose, etc.) im multizellulären Verband wird u.a. durch verschiedene extrazelluläre Faktoren bestimmt. Zu diesen Faktoren gehören Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion sowie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Neuropeptide und mechanische Kräfte. Signalmoleküle, die von einer Zelle sezerniert werden, können sowohl an weiter entfernten Zielzellen angreifen oder als lokale Mediatoren wirken, die nur Zellen in der unmittelbaren Umgebung der aktiven Zelle beeinflussen. Die lokalen Prozesse werden auch als parakrines Signal bezeichnet. Endokrine Zellen hingegen kontrollieren häufig entfernte Organe oder den gesamten Organismus. Die von endokrinen Zellen sezernierten Moleküle (Hormone), werden über das Blutssystem und über Diffusionsmechanismen im Körper verteilt. Durch einen weiteren Prozess, das so genannte autokrine Signal, kann eine Zelle sich selbst beeinflussen. Die sezernierten Signalmoleküle binden in diesem Fall an Rezeptoren der gleichen Zelle. Die Signalübertragung vom Zelläußeren ins Zellinnere erfolgt immer unter Beteiligung zahlreicher Proteine, die bestimmte Protein-Kaskaden bilden. Defekte in Proteinen dieser Signal-Transduktionskaskaden, die durch Mutationen oder fehlerhafte transkriptionelle oder translationelle Regulation auftreten können, führen möglicherweise zu einem unkontrollierten Zellwachstum und somit zur Tumorgenese (Bsp. Ras, [Malaney und Daly, 2001]). Die Kenntnis über Signaltransduktionswege, die durch fehlerhafte Komponenten oder gestörte Regulation zur Tumorgenese beitragen, ist ein wesentlicher Ansatzpunkt für eine gezielte molekulare Therapie oder eine verbesserte Diagnostik. Die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene *Tensin* und *SFRP1* sind nach den bisher bekannten Daten auf verschiedene Art an Signaltransduktionskaskaden beteiligt und stellen aufgrund ihrer Funktion potentielle Tumorsuppressorgene dar. Als solche sind sie mögliche Ansatzpunkte für diagnostische und therapeutische Strategien.

5.1. Tensin

Tensin ist eine Komponente der Fokalkontakte der Zelle. An diesen Kontaktstellen heften sich Zellen über Integrin-Rezeptoren an die extrazelluläre Matrix (ECM) an. Die Integrin-Rezeptoren vermitteln die Verbindung zwischen ECM und dem Zytoskelett der Zelle. Zu den wichtigsten zytoplasmatischen Proteinen, die die Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und den Integrin-Rezeptoren schaffen, gehört neben den Adapter- und Strukturproteinen Vinkulin, Paxillin, Talin und der Tyrosinkinase FAK auch das Tensin. Die SH2-Domäne des

Tensin ermöglicht sowohl die Rekrutierung von Tyrosin-phosphorylierten Signalmolekülen als auch die Interaktion mit Proteinen, die ebenfalls eine SH2-Domäne besitzen. Über die Fokalkontakte wird nicht nur die Erhaltung der Zellmorphologie kontrolliert, sondern auch Signaltransduktionsprozesse, wie die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade, gesteuert [Giancotti und Ruoslahti, 1999; Martin *et al.*, 2002]. Tensin ist außerdem unabhängig von FAK in der Lage Signaltransduktionswege wie JNK- oder p38-Signalweg zu aktivieren [Katz *et al.*, 2000]. Aufgrund der Funktion von Tensin, als Komponente der Fokaladhäsions-Komplexe, ist eine Bedeutung als Tumorsuppressorgen in der Entstehung von Tumoren denkbar.

Da in der Literatur keine Daten zur Expression von Tensin in Brustgewebe vorliegen, wurde zunächst die Lokalisation des *Tensin*-Transkripts in normalem Brustgewebe mit RNA *in situ* Hybridisierung untersucht. Das Transkript ist in Epithelzellen der Lobuli und der Milchgänge der Mamma sehr stark exprimiert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Endothelzellen der Gefäße im Brustgewebe *Tensin* sehr stark exprimieren. Die Expression in weiteren Normalgeweben wurde mit Northern Blot und quantitativer PCR untersucht. Die Unterschiede in den Ergebnissen mit beiden Methoden könnten darauf zurückzuführen sein, dass verschiedene Gene (β -Aktin bzw. GAPDH) für die Normierung verwendet wurden. Diese „house keeping“ Gene werden zwar als gleichmäßig exprimiert betrachtet und deshalb häufig zur Normalisierung eingesetzt; sie können sich aber dennoch zwischen verschiedenen Proben in ihrer Expressionsstärke unterscheiden. Neben den Normalisierungsmethoden sind die in den beiden Methoden verwendeten cDNAs verschieden, obwohl die MTN-Blots und die cDNAs für die quantitative PCR von der Firma Clontech bezogen wurden. Beide Methoden zeigten jedoch unabhängig voneinander eine starke *Tensin*-Expression in der Niere. In Experimenten mit Tensin-knock out Mäusen wurde gezeigt, dass die fehlende *Tensin*-Expression beim adulten Tier in der Niere zu Schädigungen führt, die auf unterbrochene Zell-Matrix-Verbindungen und Störungen in der Zellpolarität zurückzuführen sind [Lo *et al.*, 1997].

Bisher ist die *Tensin*-Expression in der Literatur in Zusammenhang mit Tumorentwicklung nur in einigen Brusttumor-Zelllinien untersucht worden. Die Analyse der Tensin-Expression in Zelllinien mit Western-Blot zeigte einen Verlust in allen untersuchten Brusttumor-Zelllinien mit Ausnahme von MCF-10A und MDA-MB-468 [Chen *et al.*, 2000]. MCF-10A ist eine nicht-transformierte Zelllinie und MDA-MB-468 gilt als wenig maligne Zelllinie [Zhang *et al.*, 1991]. In der Zelllinie MDA-MB-453 wurde ein verkürztes Tensin-Protein nachgewiesen. MDA-MB-453 ist als schwach tumorigen und nicht-metastasierend beschrieben. Die Autoren spekulierten, dass der Verlust von Tensin charakteristisch ist für die

Transformation von Zellen und ein frühes Ereignis in der Tumorentwicklung darstellt. Die in dieser Arbeit durchgeführten quantitativen PCRs konnten den Verlust von *Tensin* auf RNA-Ebene in Brusttumor-Zelllinien nicht bestätigen. Besonders die Zelllinien T47D und MDA-MB-231 zeigten eine deutliche *Tensin*-Expression. Chen *et al.* haben den *Tensin*-Verlust ausschließlich auf Protein-Ebene nachgewiesen. In der Publikation wurden keine RNA-Expressionsdaten gezeigt. Möglicherweise wird in allen Zelllinien noch ein nachweisbares *Tensin*-Transkript gebildet, aber die Translation durch post-transkriptionelle Mechanismen inhibiert.

Die chromosomale Lokalisation von *Tensin* (Chromosom 2q35) ist eine Region, die vor allem in Glioma häufig deletiert ist (*Progenetix* CGH online database; www.progenetix.net [Baudis und Cleary, 2001]), aber diese Region wurde noch nicht im Zusammenhang mit Mammakarzinomen beschrieben. Die Ergebnisse der *in silico* Analyse (eNorthern) gaben jedoch, zusätzlich zu den Daten von Chen *et al.*, Hinweise auf eine differentielle Expression von *Tensin* in soliden Tumoren wie Blasen-, Kolon-, Brust- und Ovarialtumoren. Die CPA-Hybridisierung bestätigte die reduzierte Expression von *Tensin* in Kolontumoren sowie in Brust- und Ovarialtumoren (88% bzw. 93% der Fälle). Die RNA für die Arrays der Firma Clontech wurde aus Gesamttumorgewebe gewonnen. Die Endothel-Expression von *Tensin*, die mit der RNA *in situ* Hybridisierung gezeigt wurde, könnte das Ergebnis der Expressionsanalyse in nicht-mikrodissezierten Proben, wie sie für den CPA verwendet wurden, beeinflussen. Deshalb wurden mit quantitativer PCR zusätzlich mikrodissezierte Proben aus Brusttumoren analysiert, die eine reinere Population von Epithelzellen bzw. Tumorzellen darstellen, d.h. sie enthalten zu 90% reine Epithel- bzw. Tumorzellen ohne Bindegewebs- oder Gefäßanteile. An mikrodissezierten Proben konnte die erniedrigte Expression von *Tensin* in 6/13 Fällen gezeigt werden, also einem niedrigeren Prozentsatz als in Experimenten mit nicht-mikrodisseziertem Gesamttumorgewebe. Die Expressionswerte der Tumorproben schwankten sehr stark zwischen den einzelnen Patienten. Einzelne Tumoren zeigten sogar eine wesentlich stärkere *Tensin*-Expression als das Normalgewebe. Zu den untersuchten Tumoren waren keine weiteren klinischen Daten verfügbar, um einen möglichen Zusammenhang zwischen klinischen Parametern und der *Tensin*-Expression im Tumorgewebe herzustellen.

Bei der Untersuchung von Brusttumoren mit RNA *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde ein ähnlicher Anteil Patienten mit Reduktion der *Tensin*-Expression wie in den quantitativen PCR-Analysen beobachtet, 50% (ISH) bzw. 46% (quantitative PCR). Die Diskrepanz zwischen den Resultaten der verschiedenen Methoden ist wahrscheinlich auf die

unterschiedliche Sensitivität und die Art der Probenaufbereitung zurückzuführen, wie im vorhergehenden Absatz dargestellt. Die Auswertung der ISH-Daten ließ keinen großen Unterschied zwischen IDC und ILC erkennen. In beiden Subtypen des invasiven Karzinoms war die *Tensin*-Expression in ca. der Hälfte der Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe stark reduziert oder verloren. Andere Tumortypen wie das tubuläre oder medulläre Karzinom waren auf dem Mamma-Gewebe-Array nur durch zwei Fällen bzw. gar nicht repräsentiert. Um die *Tensin*-Expression in verschiedenen Tumortypen zu vergleichen, müsste ein weiteres Tumorkollektiv untersucht werden, in dem alle Tumortypen durch mehrere Proben repräsentiert werden. Der Gewebe-Array enthielt nur eine DCIS-Probe, die in der ISH *Tensin*-Expression zeigte. Deshalb kann an dieser Stelle keine Aussage über einen Unterschied in der *Tensin*-Expression zwischen *in situ* und invasiven Brustkarzinomen gemacht werden. Diese Fragestellung müsste ebenfalls durch die Analyse eines größeren Probenkollektivs untersucht werden. Die RNA-Daten zur *Tensin*-Expression in Brusttumoren bestätigen generell die Vorhersagen der *in silico* Analyse und deuten auf eine mögliche Funktion des *Tensins* in der Tumorentwicklung hin.

Nach der Bestätigung der differentiellen Expression auf RNA-Ebene sollte mit Hilfe der Mutationsanalyse geprüft werden, ob das potentielle Tumorsuppressorgen *Tensin* in Brusttumoren Mutationen aufweist. Für bekannte Tumorsuppressorgene wie p53 sind häufige Mutationen in Tumoren nachgewiesen worden, die zu Veränderungen der Proteinsequenz mit Folgen für die Funktionalität des Proteins oder zu einem vorzeitigen Translationsabbruch führen. Mit einer SSCP-Analyse von 50 Brusttumorproben im kodierenden Bereich des *Tensin*-Gens konnten keine Veränderungen im Vergleich zur bekannten Gensequenz nachgewiesen werden. Der Nachweis von Mutationen im kodierenden Bereich wäre ein zusätzlicher Hinweis auf eine Bedeutung von *Tensin* für die Tumorgenese, aber keine Erklärung für den Mechanismus der Expressionsreduktion. Die Ursache der starken Expressionsreduktion des Gens ist wahrscheinlich auf eine Hypermethylierung des Promotors oder Sequenzveränderungen im Promotorbereich zurückzuführen. Denkbar wäre auch die Veränderung eines „trans-acting“ Faktors, der für die Regulation der *Tensin*-Expression mitverantwortlich ist. Diese Hypothesen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Wenn eine Analyse der *Tensin*-Expression auf Protein-Ebene eine ähnlich differentielle Expression wie auf der RNA-Ebene ergibt, würde das die Hypothese von *Tensin* als potentiellem Tumorsuppressorgen in Brustgewebe weiter stützen. Für diese Untersuchung müsste ein spezifischer Antikörper zur Verfügung stehen, um Tumorzelllinien und Patientengewebe mit Methoden wie Western Blot oder Immunhistochemie zu analysieren.

Proteine, die in Fokalkontakten lokalisiert sind, zeigen ein sehr spezifisches Muster in den Zellen. Eine Ko-Lokalisation von Tensin beispielsweise mit FAK im Brustgewebe ließe sich über Immunfluoreszenzfärbungen nachweisen. Die Färbung könnte im Gegensatz zu den RNA-Daten genauere Informationen zur Lokalisation von Tensin in den Zellen liefern. Es ist denkbar, dass nicht nur die reduzierte Expression, sondern auch eine Änderung der Lokalisation von Tensin in Tumorzellen im Vergleich zu normalen Epithelzellen zum Verlust der Funktion in Brusttumoren führen kann. Ein Ausfall von Tensin oder seiner Funktion in Epithelzellen könnte eine Änderung des Adhäsionsverhaltens bedingen und so die Migration und die Invasivität von Tumorzellen begünstigen. Neben der Beschreibung der Tensin-Proteinexpression in Brustgewebe wären zur Bestätigung der Tumorrelevanz als weiterführende Experimente vor allem funktionelle Analysen notwendig.

Die Bedeutung von Tensin für die Regulation des Migrationsverhaltens wurde bereits von Chen *et al.* (2002; 2003) in Tensin-exprimierenden HEK-293 Zellen, einer Nieren-Zelllinie, gezeigt. Die Fokalkontakte sind zudem von zentraler Bedeutung in Signaltransduktionsprozessen wie der Aktivierung von MAP-Kinase-Familienmitgliedern (JNK, ERK) und dem p38 Signalweg. Es wäre interessant den Einfluss der Tensin-Expression bzw. des Expressionsverlustes auf den Signalweg und die dadurch regulierten Zielgene im Zellkulturmodell zu untersuchen. Für funktionelle Analysen des *Tensin*-Gens ist die Klonierung der kodierenden Sequenz in einen Expressionsvektor wie pEF6 notwendig. Bisher war die Klonierung aufgrund der Größe der kodierenden Sequenz (5,2kb) nicht erfolgreich und es können deshalb keine Aussagen über die Funktion von Tensin in Brustzellen oder die Tumorrelevanz der reduzierten *Tensin*-Expression in Tumorzellen gemacht werden. Eine Alternative zur Überexpression von Tensin in Tensin-negativen Zelllinien wäre der Einsatz von RNAi-Technologie, um das *Tensin*-Transkript in einer Tensin-exprimierenden Zelllinie auszuschalten und diese anschließend in funktionellen Assays zu testen. „RNA interference“ (RNAi) ist ein natürlicher Mechanismus, der beispielsweise von Nematoden (*Caenorhabditis elegans*), *Drosophila melanogaster* und Pflanzen zur post-transkriptionellen Genregulation („gene silencing“) benutzt wird [Carthew, 2001] und wird als Methode zum spezifischen Ausschalten von Genen in Zellkultur-Modellen eingesetzt. Hierbei werden eine spezifische Reduktion der Transkriptmenge des Zielgens und eine Reduktion des entsprechenden Proteins herbeigeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen sind eine erste Beschreibung der Expressionsmuster von *Tensin* im Brustgewebe und des Verlustes der *Tensin*-Expression in Brusttumoren. Die reduzierte Expression von *Tensin* in Brusttumoren ist ein deutlicher erster

Hinweis auf eine potentielle Funktion von *Tensin* als Tumorsuppressorgen. Weitere Experimente wie Proteinexpressionsstudien und funktionelle Analysen, wie im letzten Absatz dargestellt, sind jedoch notwendig, um die RNA-Daten aus dieser Arbeit zu bestätigen und die Tumorrelevanz von *Tensin* zu zeigen.

5.2. Secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)

SFRP1 reguliert, neben anderen Wnt-inhibierenden Faktoren, durch kompetitive Bindung an den Wnt-Liganden die Aktivität des Wnt-Signalweges. Zu den Zielgenen dieses Signalweges zählen Onkogene wie *c-myc* und *cyclin D1* sowie Proteasen, die häufig in Tumorzellen detektiert werden (z.B. MMP-7). Das *SFRP1* Gen ist auf Chromosom 8p11.22 lokalisiert. Diese Region ist in gynäkologischen Tumoren durch häufigen Verlust gekennzeichnet. Die chromosomale Lokalisation und die biologische Funktion von *SFRP1* sprechen für eine mögliche Rolle als Tumorsuppressorgen in der Karzinogenese von gynäkologischen Tumoren.

Die Analyse der Expression durch den eNorthern deutete auf eine reduzierte Expression von *SFRP1* in gynäkologischen Tumoren hin. Diese Vorhersage konnte in Northern Blot- und quantitativen PCR-Analysen bestätigt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Expression des *SFRP1* Gens in 80%-90% der untersuchten Brustkarzinome reduziert oder vollständig verloren war. Während die Experimente für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, wurde die differentielle Expression von *SFRP1* auf RNA-Ebene in Brusttumoren und Zelllinien von mehreren Gruppen beschrieben [Zhou *et al.*, 1998; Ugolini *et al.*, 2001]. Ugolini *et al.* identifizierten *SFRP1* als differentiell exprimiertes Gen in Brusttumoren [Ugolini *et al.*, 1999]. In einem Kollektiv von 90 malignen Brust-Tumoren und 16 benignen Geweben der Brust wurde mit Northern-Expressionsanalyse eine reduzierte Expression von *SFRP1* in 78% der malignen Gewebe, aber nur in 19% der benignen Gewebe gezeigt. In weiteren Untersuchungen zeigte diese Gruppe mittels RNA *in situ* Hybridisierung eine Expression von *SFRP1* mRNA in Epithelzellen der normalen Mamma und einen Verlust der Expression in 80% der untersuchten Brusttumore [Ugolini *et al.*, 2001]. Eine reduzierte Expression von *SFRP1* ist in der Literatur zwischenzeitlich außerdem für Zervix-Karzinome [Ko *et al.*, 2002], Kolonkarzinome, Ovarial- und Nieren-Karzinome beschrieben worden [Zhou *et al.*, 1998].

Die in dieser Arbeit durchgeführte CPA-Analyse bestätigte neben der differentiellen Expression in Mammakarzinomen auch die differentielle Expression in Endometrium- und

Nierenkarzinomen, die im elektronischen Northern detektiert wurde. Die höhere Probenzahl des CPAs erlaubte außerdem eine bessere Charakterisierung der differentiellen Expression von *SFRP1* in Ovarial- und Nierentumoren, die in der Literatur nur mit einem kleinen Tumorkollektiv (4 bzw. 5 Tumore) beschrieben worden war [Zhou *et al.*, 1998]. Die CPA-Daten zeigten für Ovarial- und Nierenkarzinome eine noch deutlichere Expressionsreduktion als aus der Literatur bekannt war (73% bzw. 100% Expressionsreduktion). Für Tumor-Entitäten wie Kolon- oder Lungentumore, die im eNorthern keine signifikante Reduktion in Tumoren zeigten, konnte im CPA die Reduktion in zwei Drittel der Fälle nachgewiesen werden. Im Falle der Kolontumore muss hier angemerkt werden, dass im eNorthern im Kolon-Normalgewebe zwei Treffer aber kein Treffer im Tumorgewebe detektiert wurde, folglich konnte der Quotient N/T (Division mit 0) nicht berechnet werden. Wenn N/T keine Zahl ergibt, werden weder der p-Wert noch die Signifikanz berechnet. Insgesamt zeigten die RNA-Daten deutlich, dass *SFRP1* in allen gynäkologischen Tumor-Entitäten (Brust, Ovar, Endometrium) reduziert exprimiert war. Möglicherweise liegt eine gemeinsame, beispielsweise hormonabhängige, Regulation in den gynäkologischen Tumoren zugrunde. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten sich die weiteren Analysen auf die Bedeutung von *SFRP1* in Brusttumoren, da in dieser Entität durch Kooperationen mit dem Institut für Pathologie der Charité Berlin (Dr. G. Kristiansen) und dem Institut für Pathologie der Universität Regensburg (PD Dr. A. Hartmann) Patientenmaterial mit den dazugehörigen klinischen Daten zur Verfügung stand.

Um zu untersuchen, ob sich die differentielle *SFRP1*-Expression auf Protein-Ebene widerspiegelt, wurde ein polyklonaler Antikörper gegen humanes SFRP1 hergestellt. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch immunzytochemische Färbungen an *SFRP1*-transfizierten Zellen (SK-BR-3, MCF-7) und im Western Blot mit *in vitro* Translationsprodukten und Zell-Lysaten von transfizierten Zellen gezeigt. Die im Western Blot nachgewiesene Bande entsprach dem errechneten Molekulargewicht für *SFRP1* (~37kDa). Mit IHC und Immunfluoreszenzfärbungen an Paraffingewebe-Schnitten von Brustgewebe konnte das Protein im perinukleären Zytoplasma und der apikalen Region im Bereich der Zellmembran nachgewiesen werden. Mit der Immunfluoreszenzfärbung war ein punktförmiges Muster in Epithelzellen erkennbar. Dieses Expressionsmuster ist typisch für ein sezerniertes Protein, das sich im Golgi-Apparat oder in sekretorischen Vesikeln im Zytoplasma befindet [Holmgren *et al.*, 1991]. Nach der Sekretion bleibt *SFRP1* mit der Membran bzw. der Matrix assoziiert und konnte in einigen Präparaten an der Membran nachgewiesen werden. Allerdings ist *SFRP1* extrazellulär ein instabiles Protein, das relativ

schnell abgebaut wird [Finch und He, 1997], deshalb ist eine Membranfärbung nicht in allen untersuchten Proben zu beobachten.

Die SFRP1-Expression im Mammagewebe war nicht auf Epithelzellen begrenzt, sondern konnte außerdem in Endothel- und Stromazellen nachgewiesen werden. Die Stromazellen konnten durch gleichzeitige Färbung mit zelltyp-spezifischen Markern als Fibroblasten identifiziert werden. Die Expression des humanen SFRP1 in Fibroblasten der Mamma wurde bisher in der Literatur auf RNA-Ebene nicht beschrieben. Möglicherweise synthetisieren die Fibroblasten selbst kein SFRP1, d.h. ein Transkript wäre in diesen Zellen nicht nachweisbar. Die Fibroblasten könnten das sezernierte Protein aus der Umgebung, z.B. von benachbarten Epithelzellen, aufnehmen. Für diese Hypothese spricht, dass in Fibroblasten die Immunfluoreszenzfärbung nicht punktförmig, sondern gleichmäßig im gesamten Zytoplasma nachweisbar war. Für andere Gewebe beschrieben Han und Amar [2003] die Expression von SFRP1 in verschiedenen funktionell-spezialisierten Fibroblasten-Typen (periodontalen Ligament-Fibroblasten und gingivalen Fibroblasten). SFRP1 zeigte in diesen beiden Fibroblasten-Typen verschieden starke Expression und zudem unterschiedliche Funktionen bei der Apoptose-Regulation.

In Endothelzellen war für das Rinder-Ortholog von SFRP1 (FrzA) bereits eine potentielle Funktion beschrieben [Duplaa *et al.*, 1999]. Dufourcq *et al.* [2002] zeigten eine Expression von SFRP1 (FrzA) in frühen Phasen der Vaskularisierung im Embryo, sowie im Endothel von Arterien und Kapillaren von Erwachsenen. Humanes FrzA induzierte in Endothelzellen eine verstärkte Migration und wirkte anti-apoptotisch. SFRP1 scheint vor allem an der Induktion und Neubildung von Gefäßen, der Angiogenese, beteiligt zu sein [Dufourcq *et al.*, 2002]. In der Tumor-Angiogenese ist VEGF ein essentieller Faktor, der von den Tumorzellen selbst produziert wird und die Proliferation und Migration von Endothelzellen fördert. Die VEGF-Expression kann durch den PI3K-Signalweg stimuliert werden. D.h. PI3K fördert die Phosphorylierung und somit die Aktivierung von Akt, was wiederum die Synthese von Transkriptionsfaktoren (z.B. HIF-1 α) steigert und zur verstärkten VEGF Expression beiträgt. Die Funktion von SFRP1 war in den Untersuchungen von Dufourcq *et al.* allerdings unabhängig von VEGF/FGF-2 und Akt-Aktivierung, was auf eine Beteiligung des Wnt-Signalweges an der Differenzierung von Blutgefäßen hindeutet.

Neben der Beschreibung des Expressionsmusters in Mamagewebe, sollte mit IHC die SFRP1-Expression im Tumorgewebe untersucht werden. Die zuvor auf RNA-Ebene nachgewiesene differentielle Expression von *SFRP1* konnte in dieser Arbeit in gleichem Masse auf Proteinebene nachgewiesen werden (72% der Fälle, Charité-Tumorkollektiv). Diese ersten

Ergebnisse auf Proteinebene mit einem relativ kleinen Tumorkollektiv ergaben eine mögliche Assoziation zwischen SFRP1-Verlust und Tumorgrad. Durch die Analyse eines Prognostik-TMAs mit über 2000 Brusttumoren (in Kooperation mit PD Dr. A. Hartmann, Institut für Pathologie, Universität Regensburg/ Prof. Dr. G. Sauter, Universität Basel) konnte die Beziehung zwischen SFRP1-Expression und anderen prognostischen Faktoren eingehender untersucht werden. Hierbei zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Tumorgröße (pT) und SFRP1-Expression. Je größer ein Tumor, desto geringer war die SFRP1-Expression. Für andere klinische Parameter wie Nodal-Status (pN) oder Tumorgrad (BRE) konnte in diesem großen Tumorkollektiv keine Assoziation mit der SFRP1 Expression nachgewiesen werden. Es bestand kein Unterschied in der SFRP1-Expression zwischen Patientinnen mit und ohne hormonelle Therapie. Der Verlust der SFRP1-Expression war außerdem bei invasiven Karzinomen, mit Ausnahme der muzinösen Karzinome, unabhängig vom Tumortyp. Muzinöse Karzinome wiesen nur in 55% der Fälle einen Verlust von SFRP1 auf, die übrigen invasiven Karzinome jedoch in mehr als 70% der Fälle. Die Tumorhistologie ist eine der Standard-Prognosefaktoren und muzinöse Karzinome sind mit einer guten Prognose assoziiert [Ellis *et al.*, 1992; Donegan, 1997]. SFRP1 könnte folglich, in Ergänzung zur Tumorhistologie, einen molekularen Indikator für eine bessere Prognose bei invasiven Karzinomen darstellen.

Um den Zeitpunkt des SFRP1-Verlustes genauer zu charakterisieren, wurde ein weiterer Gewebe-Array verwendet, der Normalgewebe, benigne proliferative Veränderungen und *in situ* Karzinome beinhaltet. Die Analyse dieses Progressions-TMAs zeigte, dass ein geringer Teil der Patienten (13-15%) im Normalgewebe und in benignen proliferativen Veränderungen kein SFRP1 exprimieren. Die Zahl der Tumore mit SFRP1-Verlust stieg bereits bei *in situ* Karzinomen auf 43% und erhöhte sich bei invasiven Karzinomen auf 46%. Bei den *in situ* Karzinomen können zwei Gruppen unterschieden werden, niedrig-gradige („low-grade“) und hoch-gradige („high-grade“) DCIS, wobei die „high grade“ DCIS eine wesentlich schlechtere Prognose als „low-grade“ DCIS haben [Lagios, 1995]. Es konnte in Bezug auf die SFRP1-Expression jedoch kein Unterschied zwischen „low-grade“ und „high-grade“ DCIS nachgewiesen werden. Der Verlust tritt folglich in einer bislang nicht identifizierten Vorstufe während der Entwicklung vom Normalgewebe zum Karzinom auf. Die atypische duktale Hyperplasie (ADH) wird häufig als Vorstufe von Karzinomen bezeichnet und es ist bekannt, dass die Patientinnen mit ADH ein vierfach höheres Risiko für die Entwicklung eines invasiven Karzinoms haben [Page *et al.*, 1985]. Da der verwendete Progressions-TMA trotz der hohen Probenzahl nur drei ADH-Proben enthielt, kann an dieser Stelle keine Aussage

über den Status der SFRP1-Expression in dieser möglichen Karzinom-Vorstufe gemacht werden. Hierfür wäre ein speziell zusammengestelltes Proben-Kollektiv mit einer größeren Anzahl an ADH-Proben erforderlich. Der Verlust von SFRP1 in mehr als 40% der *in situ* Karzinome und die inverse Korrelation der SFRP1-Expression mit der Tumorgroße lassen dennoch den Schluss zu, dass der SFRP1-Verlust ein frühes Phänomen in der Tumorentwicklung ist. SFRP1 könnte demnach eine mögliche Bedeutung als prognostischer Marker in der Tumordiagnostik haben.

Um die prognostische Bedeutung von SFRP1 in invasiven Brustkarzinomen näher zu untersuchen, wurde die Beziehung zwischen SFRP1-Expression und tumorspezifischem Überleben an den Proben des Prognostik-TMAs ausgewertet. Bei der Betrachtung der Überlebenskurven des Gesamt-Tumorkollektivs mit Daten zum tumorspezifischen Überleben (843 Fälle) war kein Unterschied im Überleben zwischen Patientinnen mit SFRP1-positiven und SFRP1-negativen Tumoren zu erkennen. Aufgrund der zuvor beobachteten inversen Korrelation von SFRP1 mit der Tumorgroße, lag die Vermutung nahe, dass die prognostische Bedeutung möglicherweise vor allem in frühen Tumoren zum Tragen kommt. Deshalb wurden für die Überlebensanalyse Subgruppen entsprechend der Tumorgroße (pT-Status) gebildet, z.B. Patientinnen mit kleinen, frühen Tumoren (pT1) und Patientinnen mit infiltrierenden Tumoren (pT4). Die Analyse der Subgruppen ergab im Gegensatz zum Gesamtkollektiv eine signifikant schlechtere Prognose für Patientinnen mit frühen, nicht-hochgradigen Tumoren (pT1, G1/2), die SFRP1 nicht mehr exprimieren. Das relative Risiko am Mammakarzinom zu versterben steigt bei diesen Patientinnen um das Vierfache. Die Cox-Regressions-Analyse zeigte, dass die SFRP1 Expression in diesen Tumoren ein prognostischer Faktor für das tumor-spezifische Überleben ist. Neben der SFRP1-Expression sind andere Faktoren ebenfalls prognostisch relevant, vor allem der Lymphknotenstatus (pN0 vs. pN1-pN3) und das Tumorstadium (G1&G2 vs. G3). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass SFRP1 in der Brusttumor-Entwicklung als Tumorsuppressorgen wirkt und besonders in frühen Tumoren von prognostischer Bedeutung ist. Der Verlust von SFRP1 könnte in diesen Tumoren zu einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges und somit zur verstärkten Expression von Zielgenen, wie den Onkogenen *c-myc* und *Cyclin D1*, führen [Esteller, 2002]. Für den verwendeten Prognostik-TMA standen keine Daten zur Protein-Expression von *c-myc* oder *Cyclin D1* in den Tumoren zur Verfügung. Es kann deshalb an dieser Stelle nicht bewiesen werden, dass der Verlust von SFRP1 einen Einfluss auf die Expression dieser Wnt-Zielgene hat.

Im Gegensatz zu der Tumorsuppressor-Funktion in frühen Tumoren besitzt SFRP1 in späten

infiltrierenden Tumoren (pT4) möglicherweise Eigenschaften eines Onkogens. Die Überlebensanalyse in der Subgruppe der pT4-Tumore ergab interessanterweise eine signifikant bessere Prognose für Patientinnen mit SFRP1-negativen Tumoren. Über die Ursache für dieses bivalente Verhalten kann hier nur spekuliert werden. Möglicherweise spielt in pT4-Tumoren der Einfluss von SFRP1 auf die Angiogenese eine größere Rolle als in den kleinen pT1 Tumoren. Die in dieser Arbeit erhobenen IHC-Daten zeigen sowohl im normalen als auch im malignen Brustgewebe eine starke SFRP1-Expression in Blutgefäßen. Dufourcq *et al.* haben in einem Glioma-Modell gezeigt, dass FrzA (Homolog von SFRP1) das Tumolvolumen und –Gewicht vergrößert, was die Autoren vor allem auf den dramatischen Anstieg der Gefäßdichte zurückführten [Dufourcq *et al.*, 2002]. Vergleichbare Experimente in Mammakarzinom-Modellen sind bisher nicht beschrieben worden. Außerdem gibt es Hinweise in der Literatur, dass SFRP1 konzentrationsabhängig als bivalenter Modulator wirken kann und in geringer Konzentration die Stabilisierung von β -Catenin im Zytoplasma fördert statt inhibiert [Üren *et al.*, 2000]. Die Konzentration und Lokalisation von β -Catenin ist für die Tumorproben auf den Gewebe-Arrays nicht untersucht worden. Unter Umständen liegt in pT4-Tumoren eine konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalweges durch ein mutiertes und dadurch stabilisiertes β -Catenin oder durch Mutationen im Axin oder APC-Gen vor. Eine Regulation des Wnt-Signalweges durch SFRP1 wäre in so einem Szenario nur noch eingeschränkt möglich (vgl. Modelle in [Taketo, 2004]). Eine Färbung mit dem anti-SFRP1 Antikörper muss zudem nicht bedeuten, dass das detektierte Protein funktionell aktiv ist. Es ist möglich, dass SFRP1 in pT4-Tumoren, die Expression zeigten, durch Mutationen verändert ist und deshalb keine Funktion ausübt oder neue Funktionen in der Tumorzelle übernimmt. Zu den Patienten-Proben auf dem TMA war keine genomische DNA oder RNA verfügbar, um das *SFRP1*-Gen in den pT4-Tumoren auf Mutationen hin zu untersuchen und diese Hypothese zu bestätigen.

Das *SFRP1*-Gen wurde vor Beginn der Protein-Expressionsstudien in einem anderen Tumorkollektiv auf LoH und Mutationen untersucht, um mögliche Mechanismen für einen Funktionsverlust in Tumoren, zusätzlich zur Expressionsreduktion; zu analysieren (E. Klopocki, Diplomarbeit). Zu diesem Tumorkollektiv waren keine klinischen Daten, wie TNM-Status oder Überlebensdaten, verfügbar. *SFRP1* ist wie bereits erwähnt auf Chromosom 8p11-p12 lokalisiert, diese Region ist in Brusttumoren häufig deletiert [Yaremko *et al.*, 1995]. LoH-Untersuchungen mit zwei verschiedenen Markern an 50 Primärtumoren der Mamma bestätigten einen Verlust dieser Region in 43,7% bzw. 33,3% der Fälle (Marker: D8S268 bzw. D8S532; Dr. B. Betz und Dr. D. Niederacher, Frauenklinik Universität Düsseldorf). Eine

Analyse dieser 50 Brusttumoren auf Mutationen im kodierenden Bereich des *SFRP1*-Gens, führte jedoch nicht zur Identifikation von Mutationen, die einen möglichen Funktionsverlust in den Tumoren erklärt hätten (E. Klopocki, Diplomarbeit, 2000). Auch Mutationen an Splice-Stellen des *SFRP1*-Gens können in diesem Kollektiv ausgeschlossen werden, da die Splice-Stellen und die angrenzenden Intron-Sequenzen ebenfalls analysiert wurden. Der Promotor-Bereich des *SFRP1*-Gens ist in diesen Analysen jedoch nicht untersucht worden. Es wäre denkbar, dass Tumore Mutationen in regulatorischen Bereichen, z.B. Transkriptionsfaktor-Bindestellen, des Promotors aufweisen und in Folge dessen die Genexpression beeinflusst wird. Wahrscheinlicher ist es allerdings, dass der Verlust und die reduzierte Expression von *SFRP1* in Brusttumoren auf epigenetische Mechanismen zurückzuführen sind. Das Zusammenwirken von Promotor-Hypermethylierung und LoH könnte die Expressionsreduktion in dem hohen Prozentsatz, wie auf RNA- und Proteinebene beobachtet erklären (vgl. Modell in Abb. 3D). Die Änderung von Methylierungsmustern erhält eine immer größere Bedeutung als frühes Phänomen in der Tumorentwicklung [Esteller, 2002; Jones und Baylin, 2002]. Die genspezifische Hypermethylierung in Tumorzellen durch DNA-Methyltransferasen (DNMT1/DNMT3b) führt durch die Rekrutierung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen (MBDs) und Histondeacetylasen (Korepressor-Komplex) zu Veränderungen in der Genexpression und der Chromatinstruktur [Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998]. Über die genauen molekularen Ursachen der gezielten, genspezifischen Hypermethylierung wird noch spekuliert. Eine Hypothese legt eine fehlgerichtete DNMT-Aktivität aufgrund von Änderungen in der Chromatin-Zugänglichkeit zugrunde [El-Osta, 2003]. Suzuki *et al.* haben eine häufige Hypermethylierung des *SFRP1*-Promotors in Kolonkarzinomen nachgewiesen. Das Auftreten der Promotor-Hypermethylierung korrelierte mit den Expressionsraten des *SFRP1*-Gens [Suzuki *et al.*, 2002]. Da das *SFRP1*-Gen in Kolontumoren in einem mit Brusttumoren vergleichbaren Prozentsatz (80% bzw. 90%, vgl. CPA-Daten) dereguliert ist, liegt es nahe auch in Brusttumoren eine epigenetische Inaktivierung als Ursache für den Expressionsverlust zu vermuten. Diese Vermutung steht in keinem Widerspruch zu den möglicherweise veränderten Funktionen von *SFRP1* in pT4 Tumoren, da eine Promotor-Hypermethylierung einen reversiblen Prozess darstellt. Das Gen könnte in pT4 Tumoren durch Demethylierung des Promotors wieder aktiviert werden. Genomische Demethylierung ist seit längerem mit maligner Transformation in Verbindung gebracht worden [Gama-Sosa *et al.*, 1983] und wurden in verschiedenen Tumor-Entitäten und Tumorzelllinien beobachtet [Diala *et al.*, 1983].

Unabhängig von dem Mechanismus, der die reduzierte Expression bzw. den Verlust von SFRP1 in Brusttumoren bedingt, ist für die Validierung von *SFRP1* als Tumorsuppressorgen die Untersuchung der Funktion dieses Proteins in Brustepithelzellen von Bedeutung. Der Carboxyl-Terminus von SFRP1 enthält eine Netrin-Domäne, mit Ähnlichkeit zu Netrin 1. Diese Domäne ist möglicherweise von regulatorischer Bedeutung in Apoptose-Prozessen und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen. SFRP1 wurde in früheren Studien bereits mit einer Rolle in Apoptose in Verbindung gebracht und wird deshalb auch als SARP2 („secreted apoptosis related protein 2“) bezeichnet [Melkonyan *et al.*, 1997]. Um weitere Funktionen von SFRP1 und die Bedeutung des Verlustes für die Tumorgenese zu untersuchen, wurden funktionelle Assays eingesetzt, die tumorrelevante Mechanismen wie Proliferation, Adhäsion und Invasion untersuchten. Mindestens einer dieser zellulären Prozesse ist in allen Tumorentitäten an der Tumorgenese beteiligt, allerdings durch die verschiedensten Strategien [Hanahan und Weinberg, 2000]. Bereits in einem frühen Stadium der Tumorentwicklung beginnen Epithelzellen sich vermehrt zu teilen. Da, wie durch die TMA-Analysen gezeigt wurde, der Verlust von SFRP1 bereits früh in der Tumorgenese auftritt und Zielgene des Wnt-Signalweges u.a. an der Zellzyklus-Regulation beteiligt sind, wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen SFRP1-Expression und Proliferation untersucht. Eine statistisch signifikante Reduktion der Proliferation durch die Überexpression von SFRP1 konnte in den beiden untersuchten Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3 nur zu bestimmten Zeitpunkten (24h und 48h) beobachtet werden. Da der von SFRP1 ausgelöste Proliferationshemmende Effekt nicht besonders deutlich war, scheint SFRP1 nicht direkt an der Regulation der Zellproliferation beteiligt zu sein bzw. die Proliferation der Tumorzelllinien ist nicht ausschließlich durch die Überexpression dieses einen Faktors kontrollierbar. Für die Funktion von SFRP1 ist das Vorhandensein der entsprechenden Wnt-Liganden und Frizzled-Rezeptoren von nicht unerheblicher Bedeutung. Für SFRP1 wurde von Bafico *et al.* [1999] eine Interaktion mit Wnt-1 und Wnt-2 sowie mit dem Rezeptor Frizzled6. Die Interaktionen führten zu einer Inhibierung des Wnt-Signalweges sowohl über autokrine als auch über parakrine Mechanismen. Ob die Expression von diesen Komponenten des Wnt-Signalweges (Wnt-Liganden, Frizzled-Rezeptoren, etc.) in den verwendeten Tumorzelllinien möglicherweise reduziert oder verloren ist, wird in der Arbeitsgruppe von Dr. E. Dahl untersucht. Da die Daten noch nicht vorliegen, kann ein Defekt im Signalweg an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Neben der Proliferation wurden weitere in der Tumorgenese relevante Mechanismen untersucht. Die Epithelzellen des Normalgewebes sind für ihr Überleben im Gewebeverband

auf die Interaktion mit ihren Nachbarzellen und der ECM durch Adhäsionsmoleküle angewiesen. Ein erster Schritt zur Malignität ist der Gewinn der Fähigkeit ohne diese Interaktion überleben zu können. Ein Ablösen aus dem Gewebeverband ermöglicht den entarteten Epithelzellen später außerdem die Invasion von Blutgefäßen und anderen Organen, die Metastasierung. Das zentrale Molekül des Wnt-Signalweges, β -Catenin, spielt gleichzeitig eine Rolle in der Cadherin-vermittelten Zell-Adhäsion [Gumbiner, 2000; Jamora und Fuchs, 2002]. Es ist folglich denkbar, dass Änderungen in der Regulation des Wnt-Signalweges, z.B. durch den Verlust von SFRP1, Bedeutung für bestimmte Zell-Adhäsionsmechanismen haben könnten. Der Einfluss von SFRP1 auf das Adhäsionsverhalten ist deshalb in zwei Tumorzell-Modellen untersucht worden. Zu Beginn der Zellkultur-Experimente wurden nur transient transfizierte Zellen verwendet, die Ergebnisse der Experimente waren jedoch teilweise aufgrund der großen Schwankungen nicht auswertbar. Für den Adhäsionsassay wurden die Experimente deshalb mit stabil transfizierten Zellen wiederholt. Die stabil transfizierten Zelllinien zeigten in Wiederholungsexperimenten ein wesentlich homogeneres Verhalten als die transient transfizierten Zelllinien, was sich an den deutlich geringeren Standardabweichungen erkennen lässt. Bei einem Einfluss von SFRP1 auf die Adhäsion würde in *SFRP1*-transfizierten Zellen ein verbessertes Adhäsionsverhalten im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen bzw. den Leervektor-Kontrollen erwartet. Dies war im Experiment nur für die SK-BR-3 Zellen zu beobachten. In MCF-7 Zellen konnte kein Unterschied zu den Leervektor-Kontrollen festgestellt werden. Ein Nachweis der Stärke der SFRP1-Proteinexpression für die einzelnen stabilen Klone konnte nicht durchgeführt werden, da der verwendete polyklonale Antikörper zu diesem Zeitpunkt nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Es ist daher nicht möglich das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen SFRP1-positiven Klone mit der Expressionsstärke des jeweiligen Klons zu korrelieren. Möglicherweise ist der Effekt von SFRP1 auf das Adhäsionsverhalten in SK-BR-3 Zellen besser zu beobachten, da SK-BR-3 eine weniger differenzierte Tumor-Zelllinie als die MCF-7 Zelllinie ist. Der beobachtete Effekt von SFRP1 auf das Adhäsionsverhalten der SK-BR-3 Zellen kann jedoch nicht E-Cadherin abhängig sein, auch wenn die Verbindung über β -Catenin diesen Schluss nahe legt, da E-Cadherin in SK-BR-3 Zellen aufgrund einer homozygoten Deletion eines Teils des E-Cadherin-Gens verloren ist [Pierceall *et al.*, 1995]. Komponenten des Wnt-Signalweges können allerdings unabhängig von β -Catenin und E-Cadherin die Zell-Adhäsion und Migration beeinflussen. Nämlich über den Signalweg, der in *Drosophila* beispielsweise die Regulation der Zell-Polarität steuert („planar polarity“) und bei Vertebraten offensichtlich für die Ausbildung der epithelialen Gewebepolarität verantwortlich

ist [Veeman *et al.*, 2003]. Dieser β -Catenin-unabhängige Wnt-Signalweg („noncanonical Wnt signaling“) ist zudem in der Lage den β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg („canonical Wnt signaling“) zu inhibieren. Unter Berücksichtigung dieses Antagonismus zwischen β -Catenin-unabhängigem und β -Catenin-abhängigem Signalweg sowie der bekannten Verbindung zwischen verstärkter Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges und der Tumorentstehung [Miller *et al.*, 1999] erscheint es möglich, dass der β -Catenin-unabhängige Signalweg die Tumorentstehung unterdrücken kann. Experimente mit Brustepithelzellen (C57MG) haben gezeigt, dass der Verlust von *wnt-5a* durch antisense-Technologie einen ähnlich transformierenden Effekt hat wie die Überexpression von *wnt-1* [Olson und Gibo, 1998]. Dass Mitglieder der SFRP-Familie im β -Catenin-unabhängigen Signalweg eine ähnliche regulatorische Funktion wie im Wnt/ β -Catenin-Signalweg ausüben, ist generell denkbar. In bisherigen Studien ist diese Hypothese allerdings nicht untersucht worden. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die einzelnen Mitglieder der SFRP-Familie jeweils nur mit einigen Wnt-Liganden interagieren und nicht alle Wnt-Liganden an beiden Signalwegen beteiligt sind.

Zusätzlich zum Adhäsionsverhalten wurden die beiden Tumorzelllinien MCF-7 und SK-BR-3 auf Invasivität untersucht. Tumorzellen können die Fähigkeit erlangen sich in anderen Geweben als dem Tumor-Ursprungsgewebe anzusiedeln. Für diesen Metastasierungsprozess ist es erforderlich, dass die Tumorzellen Gewebegrenzen wie die Basalmembran und die extrazelluläre Matrix überwinden. Diese Vorgänge der Migration und Invasion werden durch erhöhte Zell-Motilität, Veränderungen in der Zytoskelett-Struktur, geringere Zell-Adhäsion und verändertes Protease-Expressionsprofil erleichtert und gefördert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Invasions-Experimente konnten für die Wildtyp-Zellen und Leervektor-Kontrollen von MCF-7 und SK-BR-3 bestätigen, dass beide Zelllinien nur eine geringe bis mäßige Invasivität zeigen. SK-BR-3 Zellen sind weniger differenziert als MCF-7 Zellen und hier konnte im Experiment eine stärkere Invasivität nachgewiesen werden. Die mit *SFRP1* transfizierten Zellen zeigten, entgegen der Erwartung, auch in der stärker invasiven Zelllinie SK-BR-3 keine deutlich verringerte Invasivität im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen. Eine statistische Auswertung war außerdem wegen der hohen Schwankungen zwischen den Wiederholungsexperimenten nicht möglich. Ein potentieller Einfluss von SFRP1 wäre unter Umständen in einem Invasionsassay mit einer hoch-invasiven Zelllinie erkennbar, wo sich bereits die Wildtyp-Zellen wesentlich stärker invasiv verhalten als die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien MCF-7 und SK-BR-3.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit gezeigte Reduktion der SFRP1-

Expression in Brusttumoren auf RNA- und Protein-Ebene, einen wichtigen Hinweis auf die mögliche Relevanz von SFRP1 in der Brusttumor-Entwicklung gibt. Mit der vorliegenden Arbeit konnten die bekannten Daten von Ugolini *et al.*, die nur eine differentielle Expression auf RNA-Ebene zeigten, um Daten zur differentiellen Expression von SFRP1 auf Proteinebene erweitert werden. Bisher wurde der Zusammenhang zwischen SFRP1 und klinischen Faktoren der Brusttumorgenese nicht untersucht. Die in dieser Arbeit gezeigte inverse Korrelation mit dem pT-Status der Brusttumore, sowie der Nachweis, dass SFRP1 als prognostischer Faktor in frühen Tumoren von Bedeutung ist, bestätigen die Hypothese, dass *SFRP1* ein potentielles Tumorsuppressorgen darstellt. Für den Einsatz von SFRP1 in diagnostischen Fragestellungen müssen allerdings noch weitere Daten in anderen Tumorkollektiven erhoben werden. Die funktionellen Daten geben erste Hinweise auf eine Bedeutung von SFRP1 für die Regulation der Zellproliferation und der Zell-Adhäsion. Die Tumorrelevanz von SFRP1 konnte in den funktionellen Analysen nicht endgültig bestätigt werden. Möglicherweise ist SFRP1, wie aus den Ergebnissen der TMA-Experimenten gefolgert, vor allem in frühen Stadien der Tumorgenese von Bedeutung, d.h. späte Prozesse wie die Metastasierung sind, im Gegensatz zur Adhäsion oder Proliferation, durch SFRP1 nicht mehr beeinflussbar. Um über die Bedeutung von SFRP1 und dem Wnt-Signalweg in diesen Prozessen genauere Aussagen machen zu können, müssten mit Hilfe der hier verwendeten Assays weitere Komponenten aus dem Wnt-Signalweg untersucht werden. In den verwendeten Tumorzelllinien wurde bisher nicht nachgewiesen, ob der Wnt-Signalweg noch funktionell aktiv ist oder ob möglicherweise wichtige Bestandteile nicht exprimiert werden oder durch Mutationen verändert sind. Eine durch Mutationen ausgelöste konstitutive Expression von β -Catenin könnte beispielsweise dazu führen, dass regulatorische Effekte von SFRP1 trotz der Überexpression in den Zelllinien nicht relevant sind. Um die Expression der Komponenten des Signalweges zu überprüfen, werden in der Arbeitsgruppe von Dr. E. Dahl quantitative PCR-Analysen u.a. von verschiedenen Wnt-Liganden und Frizzled-Rezeptoren in Mamma-Zelllinien durchgeführt. Die Daten liegen zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht vor. Außerdem wäre eine Untersuchung von weiteren Brusttumorzelllinien interessant, die aus frühen Tumoren, z.B. DCIS oder pT1, gewonnen wurden. Die Durchführung der funktionellen Assays (Proliferation und Adhäsion) mit Mammakarzinom-Zelllinien aus frühen Tumorstadien hätte unter Umständen deutlichere Ergebnisse gebracht. Da die Auswertung der TMA-Experimente zu Beginn der funktionellen Studien noch nicht abschließend vorlag, konnte im Versuchsansatz auf diese Resultate noch nicht eingegangen werden.

Möglicherweise ist der Verlust von SFRP1 nur zusammen mit der Deregulation von weiteren Faktoren aus dem komplexen Wnt-Signalweg in der Lage zelluläre Prozesse wie die Proliferation entscheidend zu modulieren. Neben SFRP1 werden SFRP2 und SFRP4 mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht und es sind weitere Wnt-inhibierende Faktoren, wie WIF („Wnt inhibitory factor“ [Hsieh *et al.*, 1999]), beschrieben worden [Kawano und Kypta, 2003]. Es ist beispielsweise nicht bekannt, ob Unterschiede zwischen verschiedenen SFRPs eine unterschiedliche Spezifität für bestimmte Wnt-Liganden und/oder Frizzled-Rezeptoren widerspiegeln. Das Verhältnis zwischen SFRP-Expression und resultierenden Veränderungen im β -Catenin-Spiegel ist, wie in verschiedenen Studien gezeigt werden konnte, nicht konsistent [Melkonyan *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 2000; Ugolini *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2002]. Das legt den Schluss nahe, dass mehr als ein Signalweg ausgehend von Wnt beteiligt ist. In der Tat ist beim Wnt-Signalweg, wie bereits oben erwähnt, nicht nur der „canonical pathway“ bekannt, der die Signalantwort über β -Catenin auslöst. Es gibt mindestens zwei weitere β -Catenin-unabhängige, so genannte „non-canonical pathways“ [Li *et al.*, 1999b; Sheldahl *et al.*, 1999], die unter Umständen durch eine Verlagerung der Signalantwort bei einer konstitutiven β -Catenin-Aktivierung größere Bedeutung erlangen. Es ist nicht auszuschließen, dass SFRP1 seine Hauptfunktion nicht wie angenommen im β -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg liegt, sondern in der Regulation des β -Catenin-unabhängigen Signalweges besteht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Auswahl von Kandidatengenem über einen *in silico* Ansatz wie den eNorthern ein guter Ansatz ist, um mit relativ geringem Zeit- und Kostenaufwand Kandidatengene zu selektieren. Die im eNorthern vorhergesagte differentielle Expression ließ sich mit Labormethoden wie Northern Blots oder quantitativer PCR in beiden hier dargestellten Fällen bestätigen. In einem größeren Ansatz im Rahmen des „Gynecological Cancer Consortiums“ wurden 40 ausgewählte Kandidatengene bearbeitet und hier wurde mit Nass-Experimenten die differentielle Expression von 65% der Kandidatengene bestätigt (Dahl *et al.*, *Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer*, Manuskript eingereicht). Durch den in dieser Arbeit benutzten methodischen Ansatz lassen sich vor allem Gene identifizieren, die bisher in der Literatur nicht mit Tumorentwicklung in Verbindung gebracht wurden. Die Auswahl der Kandidatengene kann durch Einbeziehen von Literaturdaten zur Funktion oder chromosomalen Lokalisation, wie in der Einleitung beschrieben, weiter verbessert werden. Für beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kandidatengene wurde ein deutlicher Unterschied in der Expression zwischen Tumor- und Normalgewebe gezeigt. Beide

Kandidatengene stellen demnach potentielle Tumorsuppressorgen dar. Tumorsuppressorgene können in zwei Klassen eingeteilt werden: Klasse I Gene sind im Tumor mutiert oder deletiert, im Gegensatz zu Klasse II Genen, die keine Veränderungen auf DNA-Ebene aufweisen, sondern eine Änderung der RNA-/Protein-Expression zeigen [Sager, 1989, 1997]. Sowohl *Tensin* als auch *SFRP1* wurden auf inaktivierende Mutationen hin untersucht, aber für keins der Gene konnte in jeweils 50 Mammakarzinomen eine Mutation in der kodierenden Sequenz oder an den Splice Stellen nachgewiesen werden. Die deutliche Reduktion der Genexpression ist jedoch für beide Kandidatengene in Mammakarzinomen mit mehreren unabhängigen Methoden demonstriert worden. Dies lässt für die hier analysierten Kandidatengene die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei beiden Genen um Tumorsuppressorgene der Klasse II handelt.