

Aus dem Experimental and Clinical Research Center
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

MACC1 als prognostischer Marker für das Mammakarzinom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Haustein

aus Pirna

Datum der Promotion: 05.06.2016

Inhalt

Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	4
1.1 Mammakarzinom.....	4
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	4
1.1.2 Tumorgenese	5
1.1.3 Pathologie	7
1.1.4 Metastasierung.....	9
1.1.5 Diagnostik und Staging.....	11
1.1.6 Therapie	13
1.1.7 Bisherige Prognosefaktoren	15
1.2 MACC1	16
1.2.1 Entdeckung, Aufbau und Funktion anhand des Kolonkarzinoms	16
1.2.2 Bedeutung für weitere untersuchte solide Tumore	20
1.3 Zielstellung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Materialien.....	24
2.2 Patienten/Kohorte.....	28
2.3 Zelllinien	29
2.4 Transfektion und Transduktion von Mammakarzinomzelllinien	30
2.4.1 Transfektion.....	30
2.4.2 Lentiviraler Gentransfer.....	31
2.5 qRT-PCR.....	31
2.5.1 Taqman-PCR	31
2.5.2 Lightcycler-PCR.....	33

2.6	Immunhistochemie und Immunreaktiver Score	34
2.7	Western Blot.....	36
2.8	Migrationsassay mit xCELLigence.....	37
2.9	Statistische Analyse	38
3	Ergebnisse	39
3.1	Evaluierung der klinischen Bedeutung von MACC1	39
3.1.1	Ergebnisse aus immunhistochemischen Bestimmungen der MACC1- Expression.....	39
3.1.2	MACC1-Expression mittels qRT-PCR	45
3.2	Ergebnisse der In-vitro-Versuche	51
3.2.1	Endogene MACC1-Expression von Mammakarzinom-Zelllinien	51
3.2.2	MACC1-Expression nach Transfektion bzw. Transduktion und dessen Einfluss auf das Migrationsverhalten	52
4	Diskussion	61
4.1	Der prognostische Wert von MACC1.....	61
4.2	Migrationsfördernde Wirkung von MACC1	66
4.3	Ausblick	69
5	Literaturverzeichnis	73
6	Abkürzungsverzeichnis	90
	Eidesstattliche Versicherung	93
	Lebenslauf	94
	Kongressbeitrag	96
	Danksagung.....	97

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau. In Deutschland ist circa jede neunte Frau im Laufe ihres Lebens betroffen. MACC1, metastasis-associated in colon cancer 1, wurde im Jahr 2009 als neuer aussagekräftiger Biomarker für das Gesamtüberleben und das metastasenfreie Überleben von Kolonkarzinompatienten entdeckt. In nachfolgenden Studien stellten Forschungsgruppen weltweit einen prognostischen Wert von MACC1 für zahlreiche weitere Tumorentitäten fest.

In dieser Arbeit wurde die MACC1-Expression in 170 primären Mammakarzinomen mittels Immunhistochemie und qRT-PCR gemessen und auf Zusammenhänge mit den klinischen Verläufen der Patienten untersucht. Zudem wurde in zwei Mammakarzinom-Zelllinien mit niedriger endogener MACC1-Expression mittels Transfektion oder Transduktion eine MACC1-Überexpression generiert. Der Einfluss dieser MACC1-Erhöhung auf die Mammakarzinomzellen wurde mithilfe von Migrationsassays untersucht.

Bei der immunhistochemisch ermittelten MACC1-Expression ergab sich für Patienten mit hoher MACC1-Expression im Primärtumor ein signifikant schlechteres metastasenfreies Überleben. Bei den mit der qRT-PCR bestimmten MACC1-Spiegeln zeigt sich außerdem der Trend, dass eine hohe MACC1-Expression mit einem niedrigeren Gesamtüberleben einhergeht. Wir fanden keine Korrelation der MACC1-Expression des Primärtumors mit dem TNM-Stadium, Grading des Tumors, Alter der Patienten, HER2-Status oder Hormonrezeptorstatus. Die mittels Transfektion und Transduktion generierten MACC1-überexprimierenden Mammakarzinomzellen zeigten in funktionellen Assays eine deutlich gesteigerte Migration im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen der gleichen Ausgangszellkultur.

Somit bestätigt sich MACC1 ebenfalls für das Mammakarzinom als prognostischer Biomarker für das metastasenfreie Überleben und tendenziell auch für das Gesamtüberleben. Insbesondere die Ermittlung der MACC1-Expression mittels Immunhistochemie ließe sich gut in die Routinediagnostik des Mammakarzinoms integrieren. Weiterführende klinische Studien mit größeren Kohorten zu bestimmten Mammakarzinom-Untergruppen, wie beispielsweise ausschließlich lobulären oder triple-negativen Tumoren, sind zu empfehlen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass MACC1 das Migrationsverhalten von Mammakarzinomzellen fördert, was auf eine bedeutende Rolle von MACC1 im molekularbiologischen Metastasierungsprozess hinweist. In der weiteren Detektion molekularer Prozesse in Mammakarzinomen, welche durch MACC1 beeinflusst werden, liegt großes Potential die Metastasierung von Mammakarzinomen besser zu verstehen und mögliche Therapieziele zu ermitteln. Zudem empfiehlt sich die Durchführung weiterer funktioneller Assays mit MACC1-überexprimierenden Mammakarzinomzellen, wie zum Beispiel Invasionsassays. Mit analogen Versuchen in weiteren Mammakarzinomzelllinien könnte überprüft werden, ob die getroffenen Aussagen für alle Mammakarzinome gelten. Zusammenfassend hat MACC1 großes Potential sich als prognostischer Marker für das Mammakarzinom zu etablieren und Forschungsgegenstand neuer molekularer Therapieziele zu werden.

Abstract

Breast cancer is the most common malignancy in women. In Germany about every ninth woman is going to be affected someday. MACC1, metastasis-associated in colon cancer 1, has been identified in 2009 as a new meaningful biomarker for overall survival and metastasis-free survival of colon cancer patients. During subsequent studies several research groups worldwide discovered that MACC1 is of prognostic value for numerous other tumour entities.

Tissues of 170 primary malignant breast tumours have been analysed for their MACC1 expression by IHC and qRT-PCR and have been examined regarding the clinical course of the patients. Additionally, two breast cancer cell lines with a low endogenous MACC1 expression have been transfected respectively transduced to generate a MACC1 overexpression. The influence of this MACC1 overexpression has been investigated using migration assays.

Results of the immunohistochemical analysis showed a significantly worse metastasis-free survival of patients with a high MACC1 expression in their primary tumour. In reference to qRT-PCR determined MACC1 levels a trend has been noticed that high MACC1 levels correlate with a poor overall survival. A correlation between the MACC1 expression of the primary tumour and the TNM-stage, the grading of the tumour, the

patient's age, the HER2 status or the hormone receptor status could not be detected in this study. Additionally, transfected or transduced MACC1 overexpressing breast cancer cells showed a clearly increased migration in comparison to their respective control cells.

Hence, MACC1 can be confirmed as a prognostic biomarker for the metastasis-free survival of breast cancer patients, too. A similar trend can be observed regarding overall survival of breast cancer patients. Especially immunohistochemical determination of the MACC1 expression could easily be incorporated into the common clinical diagnostics. Further clinical studies with larger cohorts of certain breast cancer subgroups, such as exclusively lobular or triple-negative tumours, are recommended. Moreover, MACC1 was detected to induce the migration of breast cancer cell lines, implying an important role of MACC1 in the biomolecular process of metastasis. There is big potential in the further detection of molecular processes of breast cancer that have been influenced by or connected to MACC1 in order to gain a broader insight into the metastasis of breast cancer and possible therapy targets. We suggest the execution of additional functional assays with MACC1 overexpressing breast cancer cells, e.g. invasion assays. Using an analogous experimental setup with additional cell lines, this study's findings could be validated extensively.

In conclusion MACC1 possesses a great potential to become an established prognostic biomarker for breast cancer and a research subject for new biomolecular therapy targets.

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom ist sowohl in den westlichen Industrieländern als auch weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau.¹ Im Jahr 2012 gab es in Deutschland schätzungsweise 75.000 Neuerkrankungen.² In den Jahren 1980 bis 2004 stieg die Inzidenz um 65%.² Die Hälfte der Patientinnen erkrankt vor dem 65. Lebensjahr. Aus statistischer Sicht ist jede achte bis zehnte Frau im Laufe ihres Lebens von einem Mammakarzinom betroffen. Bei einer 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 86% im Jahr 2008 starben in Deutschland 18.000 Frauen an den Folgen eines Mammakarzinoms.² Weltweit versterben sogar jährlich 508.000 Frauen daran.¹ Die 5-JÜR liegen in Entwicklungsländern oftmals unter 40%.³

1% aller Mammakarzinompatienten sind männlich.⁴ Bei Männern wird die Erkrankung meist später diagnostiziert. Zu ihren Risikofaktoren zählen genetische Disposition, Veränderungen im Östrogen-Testosteron-Haushalt und radioaktive Strahlung.⁵ Die 5-Jahres-Überlebensrate der männlichen Mammakarzinompatienten lag 2008 in Deutschland bei 76%.²

Zwischen Frauen unterschiedlicher Ethnizitäten variieren die Inzidenzen stark. So sind beispielsweise Kaukasierinnen vier- bis fünfmal häufiger betroffen als Frauen aus Ostafrika.^{1,6} Da bei Immigrantinnen in westlichen Ländern nach einer Anpassung der Lebensweise jedoch nahezu ebenso hohe Inzidenzraten erreicht werden, liegen die Ursachen vermutlich in exogenen Faktoren.⁶ Frauen, die bereits an einem Mammakarzinom erkrankt waren, haben ein zwei- bis sechs-fach-erhöhtes Risiko der kontralateralen Entstehung eines primären Mammakarzinoms.⁷

Trägerinnen einer BRCA1(BReast CAncer 1)- oder BRCA2(BReast CAncer 2)-Mutation, welche sich auf Chromosom 17 bzw. 13 befinden, haben ein circa 80%-iges lebenslanges Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms.⁸ Vermutlich sind Mutationen weiterer Gene, z.B. der Phosphatase PTEN, der Serin Threonin Kinase 11 (STK11), des Cadherins CDH1, des ATM (Ataxia teleangiectasia mutated), der CHK2 (checkpoint kinase 2) und des BRIP-1 (Mangel an Fanconi-Anämie-Gruppe-J-Protein) in die Entstehung von Mammakarzinomen involviert.^{8,9} Frauen mit einer positiven

Familienanamnese für Mammakarzinome haben ein um den Faktor 1,57 erhöhtes Risiko ebenfalls daran zu erkranken.¹⁰ Eine besonders lange Einwirkungszeit endogener Östrogene wie beispielsweise bei einer frühen Menarche und einem späten Klimakterium, aber auch exogene Östrogene beispielsweise durch eine lange Antikonzeptiva-Einnahme oder Hormonersatztherapie während Menopause und/oder Klimakterium erhöhen das Risiko der Entstehung eines Mammakarzinoms ebenfalls.^{11,12} Des Weiteren zählen Kinderlosigkeit und eine späte erste Geburt als Risikofaktoren für ein Mammakarzinom.^{13,14} Zudem weisen stillende Mütter ein geringeres Risiko als nicht-stillende auf.¹⁵ Auch das Rauchen von Zigaretten erhöht deutlich das Risiko sowohl für die Entstehung als auch für die Metastasierung von Mammakarzinomen.^{16,17,18} Außerdem gilt ein übermäßiger Alkoholkonsum als risikoerhöhend.^{19,20,21} Der "westliche Lebensstil" mit wenig körperlicher Bewegung, einer kohlenhydrat-, protein- und tierische Fette reichen Ernährungsweise und häufigem Übergewicht führt zu Insulinresistenz und hohen Serumspiegeln von Wachstumsfaktoren und Sexualhormonen, was die Karzinogenese fördert.²² Zudem wurde nachgewiesen, dass eine Senkung des IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1)-Spiegels, beispielsweise durch diätetische Ernährung und gesteigerte körperliche Aktivität erzielt, protektiv sowohl bezüglich der Entstehung von Mammakarzinomen als auch bezüglich des Rezidivrisikos wirken.^{23,24} Des Weiteren ist ionisierende Strahlung als Risikofaktor für Mammakarzinome bekannt.²⁵ Darüber hinaus werden viele weitere Faktoren diskutiert: Beispielsweise ist die Rolle von Parabenen als Risikofaktor bzw. potentieller Auslöser von Mammakarzinomen seit Jahren umstritten.^{26,27,28,29,30,31} Jedoch sind auch zahlreiche Mammakarzinom-Patientinnen zu finden, die keine der bekannten Risikofaktoren aufweisen.¹¹

Es gibt verschiedene Modelle zur Berechnung des Risikos für die Entwicklung eines Mammakarzinoms, z. B. Gail Model, Claus Model, BRCAPRO Model und Cuzick-Tyrer Model. Diese Modelle beziehen Informationen aus der Familienanamnese, Alter bei der ersten Geburt u.v.m. ein.^{32,33,34} Sie sollen Ärzten helfen Hochrisikopatientinnen zu erkennen.

1.1.2 Tumorgenese

Die genauen Mechanismen der Mammakarzinogenese sind derzeit noch unklar. Es gibt jedoch einige wissenschaftliche Fortschritte und Modelle zu der multifaktoriellen

Genese.³⁵ Circa 5% der Mammakarzinome sind mit einer genetischen Tumorgenese assoziiert.

Durch Störungen in den verschiedenen Abschnitten des Zellzyklus kann die Tumorgenese gefördert werden. Diese Beeinträchtigungen können beispielsweise die Gentranskription, die Apoptose, die Migration, Zellwachstum und -teilung u.v.m. betreffen. Der Signaltransfer der Transkription wird durch Proteinkinasen reguliert, wobei Störungen der Phosphorylierung und der Aktivität von Protoonkogenen möglich sind.

Im Folgenden werden einige ausgewählte Aspekte der Mammakarzinogenese vorgestellt. Wachstumsrezeptoren wie z.B. der Rezeptor des Epidermal Growth Factors (EGF) erhöhen die Zellteilungsrate und unterstützen dadurch die Pathogenese von Karzinomen. Zu den EGF-Rezeptoren zählt auch der HER2-Rezeptor (Human epidermal growth factor receptor 2). Dieser ist bei einem Teil der Mammakarzinome nachweislich für die Pathogenese und als Therapieziel von großer Bedeutung.³⁶ Östrogen reguliert zahlreiche wachstumsfaktor- und zellzyklusmodulierenden Gene, die zur Mammakarzinogenese beitragen.³⁷ Für mutierte Bcl-2(B-cell lymphoma 2)-Proteine wurde im Mammakarzinom eine Störung der Apoptose aufgrund einer Apoptoseresistenz festgestellt.³⁸ Außerdem besteht die Vermutung, dass Tumorstammzellen an der Mammakarzinogenese beteiligt sind.^{39,40} Zudem scheint der HGF/Met-Signalweg an der Umwandlung von benignen Läsionen zu In-situ-Karzinomen der Mamma beteiligt zu sein.⁴¹ Studien haben ergeben, dass die onkogene Wirkung von Wnt-1 auf das Mammaepithel durch Progenitorzellen ausgelöst wird.⁴²

Das Protein p53 ist in der Hälfte menschlicher Tumortypen erhöht, so auch bereits in frühen Stadien zahlreicher Mammakarzinome.^{43,44} Patienten mit mutiertem PT53 (Gen von p53) sind oft bereits im niedrigen Lebensalter von Mammakarzinomen und anderen Tumoren betroffen.⁴⁵ Durch Punktmutationen verliert p53 seine Funktionalität als „Wächter des Genoms“, wodurch entartete Zellen ungehindert proliferieren und/oder ihre Apoptoserate gemindert wird.^{43,46} Als weiteres Tumorsuppressorgen der Mammakarzinogenese wurde kürzlich RUNX3 identifiziert, welches Östrogen- α -Rezeptoren reguliert.^{47,48} Außerdem wurde das Onkogen Myc, welches die Expression aller in einer Zelle aktiven Gene verstärkt und somit kanzerogen wirkt, in einigen Mammakarzinomen nachgewiesen.^{49,50}

Es gibt zahlreiche weitere Forschungsansätze zur Aufklärung der Pathogenese des Mammakarzinoms.

Interessanterweise ist die Verdopplungszeit des mittleren Tumorumfangs bei Frauen unter 50 Jahren mit durchschnittlich 80 Tagen deutlich geringer als bei Frauen ab 50 Jahren (157 Tage).⁵¹

1.1.3 Pathologie

Häufigste Lokalisation für maligne Mammatumore ist der obere äußere Quadrant.⁵² Allerdings haben dort lokalisierte Tumore eine bessere Prognose als die der anderen Quadranten.^{53,54}

Zu den bisher bekannten prämaligen Mammaläsionen zählen die atypische duktale Hyperplasie, die atypische lobuläre Hyperplasie und das lobuläre carcinoma in situ (LCIS), wohingegen das duktale carcinoma in situ (DCIS) bereits als präinvasive maligne Läsion gilt.^{55,56}

Entstehungsort der meisten Mammakarzinome ist die terminale duktulo-lobuläre Einheit.⁵⁷ Die mit Abstand häufigsten histologischen Typen des Mammakarzinoms sind das invasive duktale (70-80%) und das invasive lobuläre Karzinom (10-15%). Die invasiv-lobulären Karzinome sind meist sowohl makroskopisch als auch radiologisch schwerer vom umliegenden Gewebe zu unterscheiden als die invasiv-duktales, da sie in länglichen Verbänden wachsen und das Adhäsionsmolekül E-Cadherin funktionsgestört ist bzw. nicht mehr exprimiert wird.⁵⁸

Aktuell unterteilt die WHO-Klassifikation 23 Subtypen des Mammakarzinoms:⁵⁹

- Invasives duktales Karzinom, not otherwise specified (NOS)
- Invasives lobuläres Karzinom
- Tubuläres Karzinom
- Kribriiformes Karzinom
- Karzinom mit medullären Merkmalen
- Muzinöses Karzinom und Karzinom mit Siegelringzellendifferenzierung
- Neuroendokrines Karzinom
- Invasives papilläres Karzinom
- Invasives mikropapilläres Karzinom
- Karzinom mit apokriner Differenzierung
- Metaplastisches Karzinom
- Lipidreiches Karzinom
- Sekretorisches Karzinom

- Onkozytäres Karzinom
- Adenoid-zystisches Karzinom
- Mukoepidermoidkarzinom
- Polymorphes Karzinom
- Azinuszell-Karzinom
- Glykogenreiches hellzelliges Karzinom
- Sebaziöses Karzinom
- Inflammatorisches Karzinom
- Bilaterales und nicht synchrones Karzinom
- Speicheldrüsen/Hauptanhangsdrüsen-Typ Tumoren

In der Biopsie oder spätestens im Tumorpräparat werden routinemäßig die Expression der Rezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie von HER2 immunhistochemisch bestimmt. Zum Nachweis der HER2-Überexpression wird zusätzlich die FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) eingesetzt.

Der Hormonrezeptorstatus eines Mammakarzinoms ist sowohl für die Sensitivität für antihormonelle Therapien als auch für die Prognoseeinschätzung von Bedeutung. Circa 75-80% aller Mammakarzinome sind hormonrezeptorpositiv.⁶⁰ Östrogen wird bei prämenopausalen Frauen hauptsächlich im Ovarialfollikel und im Corpus luteum sowie bei Schwangeren durch die Plazenta gebildet. Bei der Östrogensynthese katalysiert die Aromatase die Umwandlung von Testosteron zu Östrogen. Der Östrogenrezeptor bildet nach Bindung eines Liganden ein Homodimer, wodurch im Zellkern die Transkription von Genen aktiviert wird, welche unter anderem die Zellproliferation stimulieren und die Apoptose inhibieren.^{61,62} Progesteron zählt zu den Gestagenen und wird bei prämenopausalen Frauen größtenteils vom Corpus luteum in der zweiten Hälfte des Menstruationszyklus bzw. im Falle einer Schwangerschaft in großen Mengen durch die Plazenta produziert. Die humane Progesteronsynthese erfolgt aus Cholesterin. Durch Bindung eines Liganden an den Progesteronrezeptor wird dessen inhibierende Wirkung auf die Transkription verschiedener Gene, beispielsweise für Wachstumsfaktoren, im Zellkern aufgehoben.⁶³ Dabei agieren u.a. Kinasen als Mediatoren und auch RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) scheint Signalwege in der Mammakarzinogenese zu regulieren.^{63,64}

Das Onkogen HER2 wurde 1985 von King et al. entdeckt.⁶⁵ Es befindet sich auf Chromosom 17q21. Circa 15-30% der Mammakarzinome überexprimieren HER2.^{60,66} Durch FISH-Untersuchungen wurde ermittelt, dass in 97% der Fälle eine Amplifikation des zugrundeliegenden Gens auf Chromosom 17 vorliegt.⁶⁷ Auf physiologischen Brustepithelzellen wird der transmembranöse Wachstumsfaktorrezeptor HER2 nur in geringer Anzahl exprimiert. Bindet ein Ligand an diesen Rezeptor, so werden Tyrosinkinase aktiviert, wodurch mehrere intrazelluläre Signalwege angeregt werden, welche Zellwachstum und –differenzierung regulieren. Zur Karzinogenität HER2-überexprimierender Zellen tragen vor allem erhöhte Proliferationsraten und eine Apoptosehemmung bei.⁶⁸ Dabei wird die Proliferation besonders über den RAS-MAP-Kinase-Weg gefördert und die Hemmung der Apoptose erfolgt hauptsächlich über den mTOR-Signalweg.^{69,70}

Triple-negative Mammakarzinome entsprechen einem Anteil von 10-20% aller Mammakarzinome und sind in bestimmten Untergruppen, wie beispielsweise bei BRCA1-Trägerinnen, der häufigste Subtyp.^{60,71,72} Ihre Prognose bezüglich rezidiv- und metastasenfremem Überleben und Gesamtüberleben erwies sich als deutlich schlechter als die hormonrezeptorpositiver und HER2-positiver Mammakarzinome.^{73,74}

1.1.4 Metastasierung

Früher wurde angenommen, dass einzelne Tumorzellen mit dem Potenzial zu metastasieren in späten Stadien der Tumorgenese entstehen.⁷⁵ In neueren Veröffentlichungen, wie beispielsweise von Ramaswamy und seinen Kollegen, wird ein Metastasierungspotential im Großteil der Tumorzellen bereits in der früheren Tumorgenese beschrieben.⁷⁶ Die molekularbiologischen Prozesse der Metastasierung von Mammakarzinomen sind bisher ungeklärt.⁷⁷ Prinzipiell werden Tumorprogression und Metastasierung durch Angiogenese, Migration, Proliferation und Invasion realisiert. Ein möglicher Schutz intravasal disseminierender Tumorzellen vor Apoptose besteht in der extrazellulären Matrix.⁷⁸ Die Initiierung von Fernmetastasen scheint noch vor Entfernung des Primärtumors zu erfolgen und die Entstehung von Fernmetastasen aus anderen Fernmetastasen wird mittlerweile für sehr unwahrscheinlich gehalten.⁷⁹

20-40% aller Patientinnen mit Mammakarzinom entwickeln im Laufe der Erkrankung Metastasen, wobei bereits bei Diagnosestellung 4-10% betroffen sind.⁸⁰ Mammakarzinome können sowohl lymphogen als auch hämatogen metastasieren. Für den lymphatischen Metastasierungsweg bedarf es eines Anschlusses des Tumors an

das Lymphsystem. Eine höhere Anzahl an Lymphgefäßen mit größeren Durchmessern in der Tumorumgebung führen zu verstärkter Lymphdrainage, mit der mehr metastasierende Tumorzellen in die jeweiligen Lymphknoten der Lymphstromgebiete gelangen.⁸¹ Für die Lymphangiogenese sind die Faktoren VEGF-C und VEGF-D (vascular endothelial growth factor-C and -D) sowie die durch sie aktivierten VEGFR-3-Rezeptoren an lymphatischen Endothelzellen von großer Bedeutung.^{82,83} Vorteile der lymphogenen gegenüber der hämatogenen Metastasierung liegen in der geringeren Flussgeschwindigkeit, wodurch weniger Tumorzellen verenden, in dem höheren Anteil an Hyaluronsäure, welche die Tumorzellen schützt und der Diskontinuität der Membran zur unkomplizierteren Intra- und Extravasation der Tumorzellen.⁸¹ Der zuerst involvierte Lymphknoten wird als Sentinel- oder „Wächter“-Lymphknoten bezeichnet. Mammakarzinome mit Lokalisation im oberen äußeren Quadranten metastasieren vorzugsweise in die axillären Lymphknoten, aber Infiltrationen der supra- und subklavikulären, intramammären und thorakalen Lymphknoten sind möglich. Bei Tumoren der inneren Quadranten besteht zusätzlich die Option der Metastasierung in parasternale Lymphknoten. Die axillären Lymphknoten werden entsprechend Ihrer Lagebeziehung zum M. pectoralis minor in 3 Level eingeteilt:

- Level I: kaudal und lateral des M. pectoralis minor
- Level II: zwischen lateralem und medialem Rand des M. pectoralis minor sowie interpektorale Rotter-Lymphknoten (zwischen M. pectoralis major und minor)
- Level III: kranial und medial des M. pectoralis minor

In seltenen Fällen treten „Skip-Metastasen“, also Lymphknotenmetastasen in Level III unter Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen in Level I und II, auf.⁸⁴ Von befallenen Lymphknoten aus kann die systemische Metastasierung erfolgen. Die häufigste Art von Fernmetastasen stellen Knochenmetastasen, gefolgt von hepatischen/viszeralen, pulmonalen/pleuralen, zentralnervösen und Hautmetastasen, dar.⁸⁵

Für die Entstehung von Fernmetastasen ist auch die hämatogene Metastasierung von Bedeutung. Diese wird durch Angiogenese im Tumorgebiet gefördert, welches viele pro-angiogenetische Faktoren aufweist, wobei VEGF eine besonders wichtige Rolle spielt.⁸⁶ Aus Imbalancen zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren resultieren Blutgefäße mit strukturellen Unregelmäßigkeiten und eingeschränkter Funktionalität.⁸⁷ Auch Chemokine der CXC-Familie, im speziellen solche mit dem aus drei Aminosäuren bestehenden ELR-Motiv, fördern als Promotoren der Angiogenese die hämatogene

Metastasierung.^{88,89} Die Affinität von Mammakarzinomen für bestimmte Metastasenlokalisationen ist bisher zu kleinen Teilen aufgeklärt. Zum Beispiel scheinen das von Mammakarzinomzellen gebildete Enzym Heparanase durch seine osteolytische Wirkung und IL(Interleukin)-8 durch seine Osteoklastogenese stimulierende Wirkung die ossäre Metastasierung zu begünstigen.^{90,91} Als unterstützend für die Entstehung von Lebermetastasen von Mammakarzinomen gilt unter anderem das Protein Claudin-2.⁹² Die Symptome des metastasierten Mammakarzinoms können sehr vielfältig ausfallen. Beispielsweise führen fortgeschrittene Knochenmetastasen oftmals zu starken Schmerzen oder pathologischen Frakturen, während Lebermetastasen einen Ikterus, Oberbauchschmerzen und Übelkeit hervorrufen können und Metastasen in Lunge oder Pleura von Dyspnoe und Husten begleitet sein können. Zudem werden bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom häufig Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fatigue beobachtet.

1.1.5 Diagnostik und Staging

Im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen sollten Frauen ab dem 30. Lebensjahr eine klinische Brustuntersuchung mit Inspektion und Palpation sowie Frauen ab dem 50. Lebensjahr zusätzlich eine Mammographie angeboten werden.⁹³ Mammographiebefunde werden den BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System)-Kategorien zugeordnet.⁹⁴ Bei sehr dichtem Brustdrüsengewebe ist zur Abklärung von Raumforderungen oftmals die Mammasonographie sensitiver als die Mammographie und deshalb bei Frauen unter 40 Jahren Diagnostikum der ersten Wahl.⁹⁵

Im Falle eines auffälligen Sonographiebefunds oder einer Einstufung des Mammographiebefunds als BI-RADS 4 (verdächtiger Befund) oder BI-RADS 5 (hochgradig verdächtig) sollte zur weiteren Abklärung eine Biopsie durchgeführt werden.⁹⁶ Mit der möglichst sonographisch gesteuerten Stanzbiopsie sollten mindestens drei Gewebeproben gewonnen werden, alternativ können stereotaktisch gestützte Vakuumbiopsien durchgeführt werden.⁹⁶

Zur Einteilung der Malignität mithilfe des Gradings nach Elston und Ellis werden die Kriterien Kernpolymorphie, tubuläre Differenzierung und Mitoserate berücksichtigt. Es ergeben sich das Grading G1 für gut differenzierte, langsam wachsende Tumore, G2 für mäßig differenzierte Tumore und G3 für undifferenzierte, hoch proliferative Tumore. Patientinnen mit G1-Tumoren haben eine signifikant bessere Überlebenschance.^{97,98}

Auch Hormonrezeptor- und HER2-Status sollten, wenn möglich, bereits im Biopsiematerial bestimmt werden.

Der Diagnose des Mammakarzinoms folgen im Regelfall zur Detektion von Fernmetastasen eine Skelettszintigraphie, eine Oberbauch-Sonographie und ein Röntgenbild des Thorax. Zur Stadieneinteilung maligner Erkrankungen wurde von der UICC die TNM-Klassifikation etabliert, welche von prognostischem Wert ist und als Grundlage für die Wahl der Therapie dient.⁹⁹

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms nach UICC¹⁰⁰

T Primärtumorgröße		N Befallene Lymphknoten		M (Fern-) Metastasen	
T0	Kein Primärtumor nachweisbar	pN1mic	Mikrometastase(n)	M0	Keine Fernmetastasen
Tis	In-situ (DCIS)	pN1A	1-3 axilläre Metastasen	M1	Fernmetastasen
T1	≤ 2 cm	pN1b	A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar		
T1mic	≤ 0,1 cm	pN1c	pN1 a und pN1 b		
T1a	≥ 0,1 cm - ≤ 0,5 cm	pN2a	4-9 axilläre Metastasen		
T1b	> 0,5 cm - ≤ 1,0 cm	pN2b	A. mammaria interna, klinisch erkennbar. Keine axillären Metastasen.		
T1c	> 1,0 cm - ≤ 2,0 cm	pN3a	über 10 axilläre Metastasen oder infraclaviculär		
T2	> 2,0 cm - ≤ 5,0 cm	pN3bi	Axillär und A. mammaria interna, klinisch erkennbar		
T3	> 5,0 cm	pN3bii	über 3 axilläre Metastasen und A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar		
T4	Infiltration von Brustwand und/oder Haut	pN3c	Supraclaviculär		

T4a	Brustwand
T4b	Haut
T4c	T4a und T4b
T4d	Entzündliches Karzinom

Tabelle 2: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC¹⁰⁰

Stadium	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1mic, T1	N0	M0
Stadium IB	T0, T1mic, T1	N1mic	M0
Stadium IIA	T0, T1mic, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0, T1mic, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Stadium IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Stadium IIIC	nicht relevant	N3	M0
Stadium IV	nicht relevant	nicht relevant	M1

1.1.6 Therapie

Bei operablen Mammakarzinom-Patientinnen sollte eine Tumorsektion in sano erfolgen, da der Resektionsrandstatus mit der Lokalrezidivrate korreliert.¹⁰¹ Die brusterhaltende Therapie (BET) mit obligater postoperativer Radiatio ist im Outcome der alleinigen modifizierten radikalen Mastektomie (MRM) gleichwertig und bei bis zu 73% der Patientinnen möglich.^{102,103} Indikationen der MRM stellen diffuse, maligne Kalzifikationen, Multizentrität, Multifokalität, inkomplette Tumorsektionen, inflammatorische Mammakarzinome, Lokalrezidive, Kontraindikationen der anschließenden Radiatio und voraussichtlich inakzeptable kosmetische Ergebnisse bei

BET dar.^{104,105} Invasive Mammakarzinome erfordern eine intraoperative Sentinel-Lymphonodektomie um histologisch den Nodalstatus bestimmen zu können.^{106,107} Bei Patientinnen mit negativen Sentinellymphknoten ist die Sentinel-Lymphonodektomie für die lokale Kontrolle gleichwertig mit der Axilladisektion.¹⁰⁸ Sollte der Sentinellymphknoten positiv sein, ist eine Axilladisektion mit der Exstirpation von mindestens 10 Lymphknoten der Level I und II indiziert.¹⁰³

Die perkutane Radiotherapie im Rahmen der BET soll das gesamte restliche Brustgewebe und die angrenzende Thoraxwand erreichen, wobei die Strahlendosis sich bei konventioneller Fraktionierung auf ca. 50 Gy (5 × 1,8 - 2,0 Gy/Woche) belaufen sollte.^{109,110}

Bei mastektomierten Patientinnen stellen eine R1- oder R2-Resektion mit fehlender Möglichkeit der Nachresektion und ein Befall von mehr als 3 Lymphknoten Indikationen zur Radiotherapie dar. Zudem ist die Bestrahlung im Falle des T-Stadiums 4 immer und im Falle des T-Stadiums 3 dann indiziert, wenn die Patientin das 50. Lebensjahr noch nicht erreicht hat, ein G3-Tumor vorliegt oder eine Lymphgefäßinvasion nachgewiesen werden kann.^{111,112,113,114,115}

Für Patientinnen mit inflammatorischen oder primär inoperablen Mammakarzinomen sind die neoadjuvante Chemotherapie, im Anschluss die Operation und dann eine Radiotherapie empfohlen.^{116,117}

Bei Patientinnen mit positivem Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor ist die endokrine Therapie indiziert, wobei sie erst nach Abschluss der Chemotherapie zum Einsatz kommen sollte.^{118,119} Diesbezüglich stellt Tamoxifen, ein kompetitiver Inhibitor von Östrogenrezeptoren, für prämenopausale Patientinnen in einer Dosierung von 20 mg täglich über 5 Jahre die Therapie der Wahl dar.¹¹⁸ Für postmenopausale Patientinnen wird hingegen die Therapie mit Aromatasehemmern der dritten Generation empfohlen.¹²⁰

Neoadjuvante Chemotherapeutika finden Einsatz bei primär inoperablen, lokal fortgeschrittenen und inflammatorischen Mammakarzinomen.^{121,122,123} Zu den Indikationen einer adjuvanten Chemotherapie zählen hormonrezeptornegative, HER2-positive und nodal-positive Tumore sowie ein Grading 3, ein Alter der Patientin unter 35 Jahren und ein sehr hohes Rezidivrisiko resultierend aus weiteren Gründen.¹²⁴ Dabei sind anthrazyklin- und taxanhaltige Chemotherapeutika von Vorteil und sollten in 6-8 Zyklen über einen Zeitraum von 18-24 Wochen verabreicht werden.^{125,126,127,128}

Eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab, welches an HER2 bindet, sollte bei Patientinnen mit HER2-überexprimierenden Tumoren und einem Durchmesser von mindestens 1 cm für 1 Jahr angewendet werden.¹²⁹

In den letzten Jahren gab es viele Veröffentlichungen zu neuen Therapieansätzen und –möglichkeiten. Beispielsweise sind Inhibitoren des Proteins PARP (Poly(ADP-ribose)-Polymerase), welches bei DNA-Schäden aktiviert wird, ein potentielles Therapeutikum der Zukunft für BRCA1/2-mutierte und triple negative Mammakarzinome und wirken dabei spezifisch in Karzinomzellen.^{130,131} Auch für HER2-überexprimierende Tumore wurden neue molekulare Targets untersucht.¹³²

Die Therapie von Metastasen erfolgt organspezifisch und kann unter anderem in der Resektion oder Bestrahlung liegen. Beispielsweise stellte sich für resektable hepatische Metastasen die Thermoablation sowohl allein als auch in Kombination mit anderen Therapien als vielversprechende Intervention heraus.¹³³

Bei beschwerdefreien Patientinnen beinhaltet eine Nachsorgeuntersuchung die Anamnese, Inspektion und Palpation des Operationsgebietes und der kontralateralen Brust und den Umfangvergleich der Oberarme zur Abschätzung von Lymphödemen.^{134,135} Beidseitige Mammasonographien und beidseitige Mammographien sollten jährlich erfolgen, wobei die Zeitabstände der Mammographie bei brusterhaltend operierten Patientinnen in den ersten drei Jahren nur sechs Monate betragen sollten.¹³⁶ Sind die Patientinnen beschwerdefrei und alle Untersuchungsbefunde unauffällig, so erübrigen sich weitere Diagnostikmittel wie beispielsweise die Bestimmung von Tumormarkern, Skelettszintigraphien, Oberbauch-Sonographien, MRT oder Röntgen.¹³⁴

1.1.7 Bisherige Prognosefaktoren

Zu den etablierten Prognosefaktoren des Mammakarzinoms bezüglich pathologischer Komplettremissionen zählen das Alter, das T-Stadium, der Nodalstatus, der histologische Tumortyp, das histologische Grading, der Hormonrezeptorstatus und der HER2-Status.¹³⁷

Zudem gibt es in der Forschung der letzten Jahre vielseitige Ansätze zur Etablierung prognostischer Marker für das Mammakarzinom. Beispielsweise untersuchten Lucci et al. den prognostischen Wert zirkulierender Tumorzellen im Blut metastasenfrier Patienten, deren Vorhandensein mit einem schlechteren metastasenfrier und einem schlechteren Gesamtüberleben korrelierte.¹³⁸

Da sich aktuell die Prognosestellung für Mammakarzinompatientinnen hauptsächlich auf histopathologische Kriterien stützt, müssen viele Patientinnen die starken Nebenwirkungen insbesondere der Chemotherapie unnötigerweise ertragen und bei anderen Patientinnen könnte durch bessere Risikoabschätzung eventuell mit intensiverer Therapie die Bildung von Rezidiven und Metastasen verhindert werden. Demzufolge gibt es einen großen Bedarf an neuen prognostischen Markern, die in der Lage sind Hochrisikopatientinnen zuverlässig zu identifizieren.

1.2 MACC1

1.2.1 Entdeckung, Aufbau und Funktion anhand des Kolonkarzinoms

Stein et al. entdeckten das Gen MACC1 (metastasis associated in colon cancer 1) durch die Analyse der genomweiten Genexpression in Primärtumoren und Metastasen von Kolonkarzinom-Patienten sowie in physiologischer Kolonmukosa mittels Display RT-PCR.¹³⁹ Das Gen MACC1 liegt auf Chromosom 7 (7p21.1), setzt sich aus 2559 Basenpaaren zusammen, verfügt über sieben Exons und das zytosolische Protein, welches durch die Exons vier bis sieben codiert wird, besteht aus 852 Aminosäuren.^{139,140} Auf dem Chromosom 7 befinden sich in der Nähe von MACC1 mehrere Gene, die zur Signaltransduktion beitragen und Zelladhäsion und Zellmotilität beeinflussen.¹⁴¹

In Kolonkarzinom-Zelllinien zeigte sich, dass MACC1 die Migration, Invasion, Proliferation und Kolonieformation fördert.¹³⁹ Schnell erwies sich MACC1 als stadienunabhängiger Biomarker für Prognosen bezüglich des Metastasierungsverhaltens von kolorektalen Karzinomen. So wurde für Kolonkarzinom-Patienten mit niedriger MACC1-Expression im Primärtumor eine 5-JÜR von 80% ermittelt, während sich für die Patienten mit hohem MACC1-Level im Primärtumor nur eine 5-JÜR von 15% ergab.¹³⁹ Auch für das metastasenfreie Überleben von Kolonkarzinom-Patienten erwies sich MACC1 als ein aussagekräftiger prognostischer Marker.¹³⁹ Außerdem wurden die MACC1-Level im Blutserum von Kolonkarzinom-Patienten bestimmt und auch hier stellte sich ein hoher MACC1-Spiegel als wegweisend für schlechtere Gesamtüberlebenschancen heraus.¹⁴²

Als erstes Transkriptionsziel von MACC1 stellte sich Met, der Rezeptor für HGF (hepatocyte growth factor), heraus.^{139,143} HGF reguliert unter anderem das Zellwachstum, wenn nach seiner Bindung mit dem Protoonkogen Met der Tyrosinkinase-Signalweg aktiviert wird.^{144,145} Durch Zellinteraktionen im Tumorstroma steigert HGF die Invasivität von Tumorzellen, wobei eine erhöhte HGF-Expression im Tumorstroma von Mammakarzinomen und anderen Malignomen beobachtet wurde.¹⁴⁶ Durch Aktivierung der VEGF-Expression und Downregulation von Thrombospondin-1 mit resultierenden Blutgefäßneubildungen ist HGF in der Lage, die endotheliale Zellproliferation und Migration zu fördern, was zu erhöhter Invasivität und Metastasenbildung führt.¹⁴⁷ Bei Implantation von Kolonkarzinomzellen mit ektopter Überexpression von HGF oder Met in Mausversuchen wurden gesteigerte Tumorbildungs- und Metastasierungsraten erfasst.^{148,149}

Unter Einsatz von HGF bindet MACC1 nach Translokation in den Zellkern mit Gen-Promotoren wie Met und aktiviert somit deren Transkription, was zu einer gesteigerten Met-Expression führt. Als Folge dieses positiven Feedbacks können mehr HGF-Moleküle binden, der HGF/Met-Signalweg wird vermehrt durchlaufen und letztlich werden die Zellmotilität und die Metastasierungsneigung gesteigert.¹⁵⁰ Bezüglich der MACC1-induzierten Met-Promoter-Aktivität stellte sich die Sp1(Specificity protein 1)-Bindungsstelle des Met-Promoters als unverzichtbar heraus.¹⁵¹

Auf der Suche nach weiteren Transkriptionszielen durch Microarray-Analysen mit Leervektor- und MACC1-transfizierten Kolonkarzinom-Zellen wurden S100P (S100 calcium binding protein P) und SPON2 (spondin 2, extracellular matrix protein) als Transkriptionsziele von MACC1 entdeckt.^{152,153} Somit reguliert MACC1 die Expression anderer metastasierungsfördernder Gene.

Da das MACC1-Protein eine Domänenkombination aus ZU5, SH3 und zwei C-terminalen Death Domänen (DD) beinhaltet, scheinen die Steuerung des Met-Signalwegs und die Regulierung der Apoptose in diesem Protein vereint.¹⁵⁴ Zudem befinden sich im C-terminalen Ende mehrere mögliche Tyrosin-Phosphorylierungsplätze.^{139,140} Des Weiteren wurden in der N-terminalen Region eine Clathrinbox, zwei Interaktionsstellen für das EH (Epsin homology) 15 Motiv sowie eine AP2 α (Activator protein 2 alpha)-Bindungsstelle identifiziert.¹⁴⁰ Jedoch waren in untersuchten Kolonkarzinom-Zelllinien die MACC1-Proteine, denen das prolinreiche Motiv vor der SH3-Domäne oder die SH3-Domäne selbst fehlten, in ihren Funktionen

als Aktivator der Met-Transkription im Zellkern und Förderer der Migration und Proliferation gestört.¹³⁹



Abbildung 1: Putative Domänen des Proteins MACC1 (modifiziert nach Stein et al.¹⁴⁰)

Voss et al. beschreiben eine Mitwirkung von MACC1 in der Apoptoseregulation, da seine SH3-Domäne mit dem prolinreichen Motiv von CD178 (FasL) in Verbindung steht.¹⁵⁵

MACC1 gilt zugleich als Zielgen und als Aktivator des Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-Signalwegs.^{139,150} Dieser beeinflusst mehrere Signalkaskaden sowie zelluläre Prozesse und ist als Mediator für Inflammation und neoplastische Transformation bekannt.^{156,157,158} MAPK-Signalwege wiederum werden durch HGF aktiviert und sind für HGF-vermittelte Proliferation und Migration erforderlich.^{159,160}

Mithilfe von Promoter-Luziferase-Konstrukten untersuchten Juneja et al. den Gen-Promoter von MACC1 im kolorektalen Karzinom.¹⁶¹ Zu verschiedenen hineinklonierten Promotoren der 5'UTR-Region wurde jeweils die Luziferaseaktivität gemessen. Daraus ergab sich die Lage des Core-Promoters in der Region zwischen -426 und -18. Ebenso ließen sich als mit dem MACC1-Promoter interagierende Transkriptionsfaktoren AP1 (activating protein 1), Sp1 und C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) identifizieren. Ihre Downregulation führte zu verringerter MACC1-Expression und verminderter Migration von Kolonkarzinom-Zellen.¹⁶¹ Die Expressionslevel von AP1 und Sp1 korrelierten in Kolonkarzinomen sowohl mit den MACC1-Leveln als auch mit dem Metastasierungsverhalten.¹⁶¹

MiRNAs (MicroRNAs) sind kleine RNA-Moleküle mit der Fähigkeit Gene posttranskriptionell zu modulieren. Für die miRNA miR-1 ist für Kolonkarzinomzellen eine onkosuppressive Wirkung durch Negativregulation von Met bekannt, wobei in Kolonkarzinomen häufig gleichzeitig eine Downregulation der miR-1 und eine Überaktivität von MACC1 beobachtet wurden.¹⁶² Durch diese interagierende Wirkung von miR-1 und MACC1 steigt die Met-Expression und daraus folgen vermehrte Tumorprogression und Metastasierung.¹⁶² Auch die miR-143 ist in Kolonkarzinomen oftmals herabreguliert und steht in Wechselwirkung mit MACC1.¹⁶³ In vitro wurde gezeigt, dass Karzinomzellen nach Wiederherstellung der miR-143-Funktion und mit

stark erniedrigtem MACC1 deutlich weniger Zellwachstum, Migration und Invasion aufweisen.¹⁶³

In quantitativen Proteomikuntersuchungen wurden Anreicherungen von MACC1 in den extrazellulären Vesikeln metastatischer Zelllinien festgestellt.^{164,165} Auch Greening et al. beschreiben, dass MACC1 im extrazellulären Mikromilieu von Kolonkarzinomzellen für die Tumorprogression von Bedeutung ist.¹⁶⁶

Im Mausmodell implantierte Kolonkarzinom-Zelllinien mit exogener MACC1-Überexpression durch Transfektion weisen eine deutlich erhöhte Tumorprogression und Lebermetastasenbildung auf, wobei durch Behandlung der Mäuse mit MACC1-shRNA (short hairpin RNA) die Lebermetastasenbildung deutlich reduziert werden kann und die MACC1-Level mit der Fähigkeit Metastasen zu bilden korrelieren.^{139,167}

Auch für die Rezidivwahrscheinlichkeit bei Kolonkarzinompatienten mit Zustand nach Lebermetastasen und erfolgter Leberteileresektion stellte sich MACC1 als unabhängiger prognostischer Marker heraus.¹⁶⁸

Reece-Smith et al. untersuchten für die Genese von Lebermetastasen mit Ursprung in Kolonkarzinomen die Transition von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften, was die Fähigkeit zur Migration erhöht.¹⁶⁹ Die Lebermetastasen aller Kolonkarzinomstadien mit starker epithelial-mesenchymaler Transition wiesen deutlich erhöhte MACC1-Level auf.¹⁶⁹

Auch der prognostische Wert von MACC1 für das Ansprechen auf neoadjuvante Radiochemotherapien(RCT) wurde bereits untersucht. Kawamura et al. bestimmten die Expression von MACC1 und Met in Rektumkarzinomen nach erfolgter neoadjuvanter RCT und stellten für beide Gene eine Korrelation zwischen hoher Genexpression und einem deutlich geringeren rezidivfreien Überleben fest.¹⁷⁰ Patienten mit hohen MACC1-Leveln in den neoadjuvant behandelten Tumoren haben folglich ein höheres Risiko, nicht oder schwächer auf die RCT angesprochen zu haben als Patienten mit niedriger MACC1-Expression.

Für MACC1 sind zahlreiche SNPs (Einzelnukleotid-Polymorphismen), also punktuelle Abwandlungen von Basenpaaren in einem DNA-Strang, bekannt. Insbesondere MACC1 SNP rs1990172, mit Lokalisation in einer Intronregion von MACC1, wurde als Prädiktor für schlechtere Gesamtüberlebensraten beschrieben.¹⁷¹ In anderen Analysen verschiedener SNPs aus codierenden Exonregionen von MACC1 ließ sich jedoch keinerlei Korrelation mit dem Überleben der Kolonkarzinompatienten nachweisen.¹⁷²

Hier zeigte sich lediglich für SNP rs975263 bei den Patienten unter 60 Jahren eine herabgesetzte metastasenfreies-Überleben-Rate.¹⁷²

MACC1 scheint zudem für Kolonadenome ein aussagekräftiger Biomarker zur Unterscheidung zwischen hoch- und geringgradigen Dysplasien zu sein.¹⁷³

1.2.2 Bedeutung für weitere untersuchte solide Tumore

Huang et al. untersuchten kürzlich die MACC1-Expression in Mammakarzinomen, wobei sie eine Korrelation zwischen hohen MACC1-Leveln und Lymphknotenmetastasierung, Fernmetastasierung, kürzerem rezidivfreien Überleben und ungünstigerem Gesamtüberleben feststellten.¹⁷⁴

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits die Bedeutung von MACC1 für das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) untersucht. Shirahata et al. bemerkten den prädiktiven Wert von MACC1 für die Entstehung vaskulo-invasiver HCC.¹⁷⁵ In der Studie von Qiu et al. wurden in HCC-Gewebe höhere MACC1-Level gemessen als in umliegendem physiologischen Gewebe und die MACC1-Expression korreliert mit dem Ausmaß der Expression von Met und dem Tumormarker AFP (Alpha-1-Fetoprotein).¹⁷⁶ Dabei erwies sich MACC1 als prognostischer Marker sowohl für das rezidivfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben der Patienten mit HCC.¹⁷⁶ Auch für Hepatitis-B-assoziierte HCC besteht eine Korrelation zwischen hohen intratumoralen MACC1-Leveln und einer Erniedrigung des tumorfreien und des Gesamtüberlebens.¹⁷⁷ Gao et al. fanden in HCC-Gewebe ebenfalls deutlich erhöhte MACC1-Level im Vergleich zum angrenzenden physiologischen hepatischen Gewebe.¹⁷⁸ Im Rahmen dieser Studie entdeckten sie eine Korrelation zwischen erhöhter nuklearer MACC1-Expression und schlechter Differenzierung der Tumore sowie der Bildung intrahepatischer Metastasen oder der Infiltration der V. portae.¹⁷⁸ Des Weiteren regulierten Gao et al. mithilfe von shRNA MACC1 in HCC-Zellen herunter, was zu einem Rückgang der Zellmigration- und invasion führte und von einer verminderten Expression der Gene MMP2 (Matrix-Metalloprotease 2), MMP9 und Met begleitet wurde, was eine Regulation dieser Gene durch MACC1 nahelegt.¹⁷⁸ Hohes MACC1 ist auch für HCC-Patienten in frühen Stadien und solche mit normalen AFP-Werten ein prognostischer Marker für niedrigere Überlebensraten.¹⁷⁹ Des Weiteren korrelierte die MACC1-Expression in fortgeschrittenen HCC mit kürzerem progressionsfreiem und Gesamtüberleben nach deren Kryoablation.¹⁸⁰

Bei Untersuchungen des Genexpressionsprofils von intrahepatischen Cholangiokarzinomen (ICC) wurde ebenfalls eine deutlich erhöhte MACC1-Expression festgestellt.¹⁸¹

Auch für das Magenkarzinom wurde die Rolle von MACC1 bereits zum Teil erkundet. Beispielsweise wurden bei peritoneal disseminierten Magenkarzinomen signifikant häufiger hohe MACC1-Expressionen verzeichnet als bei nicht peritoneal disseminierten.¹⁸² In der Studie von Wang et al. förderte MACC1 in vitro die Proliferation, Migration und Invasion von Magenkarzinom-Zellen und in vivo führte eine MACC1-Überexpression zu gesteigertem Tumorwachstum und höheren Metastasierungsraten.¹⁸³ Außerdem fiel im Rahmen dieser Untersuchungen eine Korrelation zwischen der Expression von MACC1-mRNA und Markern der epithelial-mesenchymalen Transition auf, da MACC1 mutmaßlich den mesenchymal-epithelial transition factor hochreguliert.¹⁸³ Ge et al. fanden in Magenkarzinomen signifikant höhere MACC1-Level als in umliegendem physiologischen Gewebe und vertreten die Hypothese, dass eine MACC1-Überexpression mit besseren Überlebenschancen einhergeht.¹⁸⁴

Für das Pankreaskarzinom ist ebenfalls ein Zusammenhang zwischen hoher MACC1-Expression und der Metastasierung beschrieben: Wang et al. bestimmten mittels ELISA die MACC1-Serumspiegel von Pankreaskarzinompatienten, welche mit der Entwicklung von Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie den späteren TNM-Stadien korrelierten.¹⁸⁵ Zudem konnten sie in vitro durch Inhibition von MACC1 mit siRNA die Zellproliferation und -migration vermindern und für Zellen mit herabregulierter MACC1-Expression eine höhere Sensitivität für das Chemotherapeutikum Gemcitabine nachweisen.¹⁸⁵ Eine bisher unveröffentlichte Studie zeigt auch für Pankreaskarzinome einen prognostischen Wert der MACC1-Spiegel im Patientenserum bezüglich Überleben und Metastasenbildung.¹⁸⁶

Zu den Tumorentitäten mit MACC1-Einfluss zählt auch das Bronchialkarzinom. Sowohl Shimokawa et al. als auch Chundong et al. bestimmten in Adenokarzinomen der Lunge die MACC1-Expression und fanden für die überexprimierenden Tumore eine signifikante Verschlechterung des postoperativen rezidivfreien Überlebens.^{187,188} In Tumoren von NSCLC(non-small cell lung cancer) korrelieren hohe MACC1-Level mit schlechter Differenzierung, fortgeschrittenem T-Stadium, Lymphknotenmetastasierung und der 5-JÜR.¹⁸⁹

In Ovarialkarzinomen herrschen höhere MACC1-Spiegel als in physiologischem Ovarialgewebe und in Ovarialkarzinomzellen bestätigte sich die Beobachtung der Studien mit anderen Tumorentitäten, dass eine in vitro Herabregulation von MACC1 zu reduzierter Zellproliferation, -migration und -invasion führt.¹⁹⁰ Zudem korreliert eine hohe MACC1-Expression ebenfalls mit Stadium, Differenzierungsgrad und Lymphknotenmetastasierung eines Ovarialkarzinoms.¹⁹¹

Bezüglich des Einflusses auf die Progression von Glioblastomen stellte sich MACC1 in vitro als migrations- und proliferationsverstärkend und in vivo als Tumorformation fördernd heraus.¹⁹² Außerdem korreliert eine hohe in Glioblastombiopsien gemessene MACC1-Expression mit hohen WHO-Graden und niedrigerer Überlebensrate.¹⁹² Zudem wurde MACC1 in genomischen Regionen, die mit Glioblastomen assoziiert sind, identifiziert.¹⁹³

Des Weiteren wurde auch für Osteosarkom-Zelllinien eine proliferations-, kolonieformations-, invasions- und wachstumssteigernde Wirkung festgestellt.¹⁹⁴ Im Rahmen dieser Studie wurde ebenfalls eine Aktivierung des Akt-Signalwegs durch MACC1 beobachtet.¹⁹⁴

Ferner scheint MACC1 über die Beeinflussung des Akt/ β -Catenin-Signalwegs an der Karzinogenese von Nasopharynxkarzinomen (NPC) beteiligt zu sein.¹⁹⁵ In MACC1-herabregulierten NPC-Zellkulturen gab es eine deutliche Verminderung der Proliferation, Migration, Invasion und Kolonieformation sowie eine starke Apoptoseaktivierung.¹⁹⁵ Zudem korreliert eine hohe MACC1-Expression in Tumorgewebe aus NPC mit dem klinischen Stadium und der Lymphknoteninfiltration sowie ebenfalls erhöhtem Met und β -Catenin.¹⁹⁵

Des Weiteren scheint MACC1 auch mit der Metastasierung von Nierenzellkarzinomen in Zusammenhang zu stehen. So wiesen metastasierte Nierenzellkarzinome durchschnittlich deutlich höhere MACC1-Level auf als nicht metastasierte und durch Herabregulation von MACC1 konnten in vitro die Invasion und Proliferation gesenkt werden.^{196,186}

Auch das Ösophaguskarzinom zählt zu den Tumorentitäten, für die MACC1 von prognostischem Wert ist. Eine hohe MACC1-Expression korreliert mit der Lymphknotenmetastasierung und dem TNM-Stadium der Ösophaguskarzinome und hohe MACC1-Level sind mit einer deutlich geringeren 5-JÜR verbunden.¹⁹⁷

1.3 Zielstellung

Diese Dissertation wurde mit folgenden Zielen aufgenommen:

- Quantifizierung der Expression von MACC1 in Mammakarzinomgeweben von 170 Patienten durch Immunhistochemie und qRT-PCR
- Untersuchung des Zusammenhangs zwischen MACC1 und klinischen Daten wie dem metastasenfremen Überleben und dem Gesamtüberleben
- Feststellung des prognostischen Werts von MACC1 für das metastasenfreme Überleben und das Gesamtüberleben von Mammakarzinompatienten
- Transfektion MACC1-niedrigexprimierender Zelllinien (MDA-MB-231 and MCF-7) mit MACC1-cDNA und Ermittlung des Effekts auf das Migrationsverhalten dieser Zellen

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden sind alle verwendeten Materialien tabellarisch aufgeführt. Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 1, die Chemikalien in Tabelle 2 und die Zellkulturmaterialien in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Geräte

Countess® Automated Cell Counter	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese Power supply ST 606T	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
Elektrophorese-Kammer: Horizon 58	GIBCO BRL, Karlsruhe, Deutschland
FACScalibur	Becton Dickinson, CA, USA
Fluoreszenzmikroskop Axio Observer.Z1	Zeiss, Jena, Deutschland
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Light cycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
NanoDrop TM2000	Thermo Fisher Scientific, NC, USA
NuPAGE® -Kammer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Pap Pen	DAKO, Hamburg, Deutschland
Schnellkochtopf	Herkunft unbekannt
Semi-Dry Transfer Cell Transferkammer	BioRad Laboratories Inc., München, Deutschland
Stratagene Mx3000P™	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
The Belly Dancer	Stovall Life Science, NC, USA
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultra low Temperature Freezer (-80°C)	Sanyo Fisher Sales, München, Deutschland
Versant kPCR Molecular System	Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn, Deutschland
Vitro Clud	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Vortex-Mixer VM-3000	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
xCELLigence HT Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Zellinkubator	Rudolf Hasse KG, Berlin, Deutschland
Tabelle 4: Chemikalien	
Albumin-Standard [2 mg/mL]	Pierce, IL, USA
Ampicillin (100 mg/ml)	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
Antibody diluent reagent	Zytomed Systems, San Francisco, USA
Anti-Goat IgG HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland
Anti-Maus IgM	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Anti-Rabbit IgG HRP-konjugiert	Promega, Madison, USA
Bovines Serumalbumin, pH7	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
BSA-Lösung (5%)	5% (w/v)BSA in TBST
Dako Blockierungspuffer S2023	DAKO, Hamburg, Deutschland
Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	DAKO, Hamburg, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
dNTPs	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution Low pH (50x) (Citratpuffer)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Fast Start DNA Master HybProbe Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (150)	Roboklon GmbH, Berlin, Deutschland
Genitacin 418 (500 mg/ml)	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
Gentamycin (10 mg/ml)	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
Hämalaunlösung	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Kaninchen-MACC1-Antikörper Nr. HPA020103	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
LightCycler® h-G6PDH Housekeeping Gene Set	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Magnesiumchlorid	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Maus-β-Tubulin-Antikörper	BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
Metafectene	Biontex, Martinsried/Planegg, Deutschland
Milchblocklösung	1,5% (w/v) Trockenmilchpulver, 1,5% (w/v) BSA in TBST
MOPS	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
20x MOPS-Puffer	50 mM MOPS, 50 mM Tris (pH 7,5), 0,1% (w/v) SDS, 1 mM EDTA
MuLV Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit	Lonza Rockland, ME, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NuPAGE® LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
10x PBS	188,9 mM Na ₂ HPO ₄ , 17,6 mM KH ₂ PO ₄ , 26,8 KCl, 8% (w/v) NaCl
Penicillin/Streptavidin	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, IL, USA
Primer und Sonde	Tibmolbiol, Berlin, Deutschland
Randomisierte Primer Hexamere	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

1x RIPA-Puffer (pH 7,5)	50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat, 1 Tablette Proteaseinhibitor pro 50 mL
RNAse Inhibitor	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Rpl37a Housekeeping Gene Set	Micro-Science, Newton Aycliffe, UK
Spectra™ Multicolor Broad Range	Fermentas, Leon Rot, Deutschland
SuperScript® III Platinum® One-Step qRT-PCR Kit w/ROX	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
1x TBST-Puffer (pH 7,5)	50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20
1x Transferpuffer	50 mM Tris (pH 7,5), 200 mM Glycin, 0,1% (v/v) SDS, 20% (v/v) Methanol
TransIT®-2020 Transfection Reagent	Mirus Bio LLC, Madison, USA
Tris-Base	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Trockenmilchpulver, fettfrei	Bio-Rad, Hercules, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Ultra pure H2O	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Universal Reference Total RNA	Clontech Laboratories, Mountain View, USA
Western Bright™ ECL Western Blotting Detection Kit	Advanta Corporation, Menlo Park, USA
Xylen	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tabelle 5: Zellkulturmaterial

Countess® Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
---	------------------------------------

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle Medium)	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
DMEM ohne Phenolrot	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Life Technology (GIBCO), Darmstadt, Deutschland
Trypan-Blau	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Zellkulturflaschen (T150, T75, T25)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-, 96- Wells)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

2.2 Patienten/Kohorte

In die Studie wurden Gewebeproben von 170 Patienten eingeschlossen, die in den Jahren 2006-2008 nach der Diagnosestellung eines Mammakarzinoms in der Charité Universitätsmedizin Berlin oder im DRK Klinikum Köpenick operiert und betreut wurden. Ausnahmslos alle diese Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis zur Nutzung des entnommenen Gewebes für Forschungszwecke gegeben. Sie wurden in die Metacancer-Kohorte eingeschlossen, einem EU-geförderten Forschungsprojekt zur Suche nach Biomarkern mittels Metabolomics.¹⁹⁸

Die klinischen Daten erhielt ich zum Teil von Mitarbeitern des Instituts für Pathologie, zum Teil durch Datenrecherche mithilfe des SAP der Charité Universitätsmedizin Berlin, zum Teil durch Datenrecherche in der Abteilung für Studienkoordination des Brustzentrums Köpenick und zum Teil durch Telefonate mit den jeweils betreuenden niedergelassenen Ärzten.

Im Juni 2013 waren 85,9% der Patienten am Leben und 14,1% verstorben. Bedeutende Charakteristika des Patientenkollektivs sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 6: Charakteristika des Patientenkollektivs

Merkmal	Anzahl der Patientinnen	%
Histologischer Typ		
duktal	131	80,9
lobulär	21	13
andere	10	6,2
T-Stadium		
pT1	48	29,6
pT2	94	58,0
pT3	15	9,3
pT4	5	3,1
Lymphknotenstatus		
N0	96	60,4
N1	41	25,8
N2	10	6,3
N3	12	7,5
Differenzierungsgrad		
G 1	18	10,7
G 2	93	55,4
G 3	57	33,9
Östrogen- /Progesteronrezeptorstatus		
beide negativ	40	23,7
mind. einer positiv	129	76,3
HER2-Status		
negativ	147	90,2
positiv	16	9,8

2.3 Zelllinien

MCF-7 ist die erste jemals aus Mammakarzinomgewebe isolierte Zelllinie. Sie wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Kaukasierin mit invasivem duktalem Mammakarzinom gewonnen.¹⁹⁹

Auch MDA-MB-231 stammt aus einem Pleuraerguss einer Patientin mit einem invasiven duktalem Mammakarzinom aus dem Jahr 1973. Die zu diesem Zeitpunkt 51-jährige Patientin war ebenfalls Kaukasierin.²⁰⁰

Die Zelllinie MCF-7 ist Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv und HER2-negativ.²⁰¹

MDA-MB-231 hingegen ist eine triple-negative Zelllinie.²⁰¹

MCF-7 erwies sich in vitro als nicht bzw. schwach invasiv, während MDA-MB-231 aus der Literatur als invasive Zelllinie bekannt ist.^{202 203}

Beide Zelllinien wuchsen adhärend in Zellkulturflaschen in Inkubatoren bei 37 °C, 20% O₂ und 5% CO₂. Für MCF-7 wurde das Medium RPMI, mit 10% FBS versetzt, verwendet, während MDA-MB-231 mit DMEM mit 10% FBS kultiviert wurde. Nach 3-4 Tagen erfolgte eine Passage der Zellen. Dazu wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und danach für 5-15 min mit Trypsin-EDTA im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um die Zellen von der Zellkulturflasche ablösen. Im Anschluss wurde das entsprechende Medium mit 10% FBS zugegeben und circa 1/6 dieser Suspension weiter kultiviert.

2.4 Transfektion und Transduktion von Mammakarzinomzelllinien

2.4.1 Transfektion

Zur Herstellung transienter Klone wurden jeweils 1×10^6 Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät. Nach 24 Stunden wurden sie dann mittels Metafectene (Biontex) entsprechend dem Herstellerprotokoll transfiziert. In einem späteren Versuch wurde stattdessen das Transfektionsreagenz TransIT-2020 (Mirus) verwendet. Die für die Transfektionen verwendeten Plasmide pcDNA3.1D/MACC1 und pcDNA3.1D (Leervektor) wurden freundlicherweise durch Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe (AG Stein/ am ECRC der Charité und dem MDC) zur Verfügung gestellt. Von den derart transfizierten Zellen wurden durch Zugabe von 1,5 mg/ml Genitocin 418 (Invitrogen) stabile Klone selektiert, da sie über eine im Vektor enthaltene G418-Resistenz verfügen. Nach dieser mehrwöchigen Behandlung standen genug Zellen zur Verfügung, um mittels qRT-PCR und Western Blot die Expression des durch Transfektion entstandenen Fusionsproteins MACC1-V5-Histag bestimmen zu können

und das Migrationsverhalten der transfizierten Zellen im xCELLigence, einem Gerät zur Impedanz-basierten Zellanalytik mit Echtzeit-Monitoring, untersuchen zu können.

2.4.2 Lentiviraler Gentransfer

Mit von Lentiviren abstammenden Vektoren kann man sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen transduzieren.²⁰⁴ Bei den verwendeten Vektoren handelt es sich um lentivirale Vektoren der 3. Generation, welche mit dem Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisiert wurden. Diese wurden mir freundlicherweise durch Kollegen aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 wurden jeweils mit MACC1-GFP (Green Fluorescence Protein) sowie mit reinem GFP mit in Medium gelösten Lentiviren transduziert. Am Folgetag erhielten die Zellen frisches Medium ohne Lentiviren. Nach 10 Tagen wurden diese transduzierten Zellen in eine Suspension mit PBS (1×10^6 Zellen/ml) gebracht, um mithilfe des FACS (Fluorescence-activated cell sorting) die fluoreszierenden zu ermitteln und zu sortieren. Für die MACC1-GFP-transduzierten Zellen war dieser Schritt nach zwei Wochen erneut erforderlich. Ab dem Zeitpunkt der ersten FACS-Sortierung wurden dem Medium stets 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin und 5 µg/ml Gentamycin zugesetzt. Für Verlaufskontrollen wurde die Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie genutzt.

2.5 qRT-PCR

Die quantitative Real Time PCR ermöglicht eine genaue Messung der Amplifikationsprodukte in Echtzeit.²⁰⁵

Aus technischen Gründen wurden sowohl Taqman PCR nach dem One Step Prinzip, also ohne vorhergehende Reverse Transkription, als auch Light Cycler PCR mit vorhergehender Reverser Transkription durchgeführt.

2.5.1 Taqman-PCR

Die RNA-Extraktion aus dem Formalin fixierten, paraffineingebetteten Gewebe erfolgte voll automatisiert durch das Versant kPCR Molecular System von Siemens.

Durch Anwendung des SuperScript III One-Step Quantitative RT-PCR Systems laufen die Reverse Transkription zur cDNA-Synthese und die qRT-PCR in einem Schritt ab. Das Design und die Herstellung der intronüberspannenden Primer und der Fluoreszenzsonde für das Zielgen MACC1 übernahm die Firma TibMolbiol, während das Housekeeping-Gen Ribosomal Protein L37A (RPL37A) von der Firma Siemens Healthcare Diagnostics Products angefertigt wurde. Die Sequenzen der MACC1 Primer und Sonde sind in Tabelle 8 aufgeführt. In Tabelle 7 ist der Reaktionsansatz der One-Step-qRT-PCR dargestellt. Als Positivkontrolle wurde eine Referenz-RNA der Firma Clontech mit einer Konzentration von 10 ng/µl verwendet.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für Reverse Transkription und qRT-PCR in einem Schritt

Puffer (enthält je 0,4mM dNTP, 6mM MgSO ₄ und ROX)	10 µl
Primermix aus Sonde und Primern	2,5 µl
Taq Polymerase	0,4 µl
H ₂ O	5,1 µl

Tabelle 8: Sequenzen (5'-3') der MACC1-Primer und Sonde (TaqMan)

Primer MACC1 F	TTC TTT TgA TTC CTC Cgg TgA
Primer MACC1 A	ACT CTg ATg ggC ATg TgC Tg
Tamra-Sonde	6FAM-CTT Agg CAg ACT TCC TCA AgA AAT TCT ggA--TMR

Tabelle 9: Protokoll für die qRT-PCR mit TaqMan-Sonden

Vorinkubation:	1.) 50°C für 30 min 2.) 95°C für 2 min
gefolgt von 40 Zyklen:	1.) Denaturierung bei 95°C für 15 s 2.) Primerhybridisierung bei 60°C für 30 s

Für jede Probe wurden Triplikatmessungen sowohl für das Housekeeping-Gen RPL37A als auch für MACC1 durchgeführt. Die Expression von MACC1 wurde dann relativ zu RPL37A mithilfe der Formel $20^{-\Delta CT(CT_{MACC1} - CT_{RPL37A})}$ berechnet.

2.5.2 Lightcycler-PCR

Die RNA-Isolation aus kultivierten Zellen wurde mithilfe des GeneMatrix Universal RNA Purification Kits von Roboklon gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die photometrische Quantifizierung der RNA im Nanodrop-Messgerät mit einer Wellenlänge von 260 nm.

Für die Reverse Transkription im Thermocycler, in welcher die RNA in komplementäre cDNA umgeschrieben wird, wurden je Probe 50 ng RNA in 3 µl H₂O eingesetzt. Zur Herstellung des Standards wurden 200 ng RNA aus SW620-Zellen verwendet. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes, von welchem 17 µl zu jeder Probe gegeben wurden, ist Tabelle 10 zu entnehmen:

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

MgCl ₂	4 µl
10x RT Buffer	2 µl
dNTPs (gemischt)	8 µl
Random Hexamere	1 µl
MuLV reverse Transkriptase	1 µl
RNAse Inhibitor	1 µl

Das gewählte Programm des T3000 Thermocyclers beinhaltet eine 15-minütige Phase bei 42°C, eine 5-minütige Phase bei 99°C und ein anschließendes 5-minütiges Kühlen bei 4°C.

Zur Quantifizierung mit Hilfe von Hybridisierungssonden wurde der Fast Start DNA Master HybProbe Kit von Roche verwendet. Als Housekeeping Gen diente das LightCycler hG6PDH Housekeeping Gene Set von Roche mit spezifischen Primern und Sonden für Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). Unter einer sterilen Arbeitsbank wurden in 96-Well-Platten je well 8 µl Reaktionsmix (siehe Tabelle 11) und 2 µl der cDNA-Lösung, welche der Reversen Transkription entstammte, eingesetzt. Die qRT-PCR erfordert den Einsatz von zwei Primern und zwei Sonden. Ihre Sequenzen sind in Tabelle 12 aufgeführt. Das Programm der Zeiten und Temperaturen ist in Tab. 13 dargestellt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen und anschließend mit den Werten des Housekeeping Gens G6PDH per Division der Mittelwerte normalisiert.

Tabelle 11: PCR (Lightcycler) Ansatz

H ₂ O	4,6ul
10mM Forward Primer	0,5ul
10mM Reverse Primer	0,5ul
10mM FITC Sonde	0,3ul
10mM LCRed Sonde	0,3ul
25mM MgCl ₂	0,8ul
Hybr MasterMix	1,0ul

Tabelle 12: Sequenzen (5'-3') der MACC1-Primer und Sonden

Primer Fwd	TTC TTT TgA TTC CTC Cgg TgA
Primer Rev	ACT CTg ATg ggC ATg TgC Tg
FITC-probe	gCA gAC TTC CTC AAg AAA TTC Tgg AAg ATC TA -FITC
LCRed640	LCRed640- AgT gTT TCA gAA CTT CTg gAC ATT TTA gAC gA

Tabelle 13: Protokoll für die qRT-PCR mit Hybridisierungssonden

Vorinkubation:	1.) 95°C für 10 min
anschließend 45 Zyklen:	1.) Denaturierung bei 95°C für 10 s 2.) Primerhybridisierung bei 60°C für 30 s 3.) Elongation bei 72°C für 4 s

2.6 Immunhistochemie und Immunreaktiver Score

Zur Entparaffinierung und Dehydratation wurden die Objektträger mit den Formalin fixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten für 20 Minuten im Xylolbad und anschließend in Alkoholbädern mit abnehmender Konzentration inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger in einen mit Citratpuffer befüllten Dampfkochtopf gegeben, welcher für 5 Minuten zum Kochen gebracht wurde und dann für 15 Minuten langsam abkühlte. Dies diente der hitzeinduzierten Demaskierung des Antigens. Nachfolgend wurden sie für 15 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden auf den Objektträgern die zu färbenden Schnitte mit dem DAKO PAP Pen umrandet. Im

Anschluss wurde die endogene Peroxidase durch 15-minütiges Auftragen des Peroxidase-Block-Puffers „S2023“ geblockt, welcher dann vorsichtig abgegossen, jedoch nicht gespült, wurde. Dann erfolgte die einstündige Inkubation mit dem primären MACC1-Antikörper Nr. HPA020103 von Sigma in einer Verdünnung von 1:50 in einer feuchten Kammer. Danach wurden die Objektträger mit Leitungswasser, destilliertem Wasser, TBS mit 0,5% Tween und zuletzt mit reinem TBS gespült. Dadurch wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper, welcher biotinyliert ist, aufgetragen und nach 15 Minuten mit TBS abgespült. Dann folgte die 15-minütige Inkubation mit Streptavidin, an welches das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gebunden ist. Da Streptavidin über mehrere Bindungsstellen für Biotin verfügt, entstand ein Netz aus Avidin-Biotin-Enzymkomplexen, was zu einer Signalverstärkung führte. Anschließend folgte ein Waschgang mit TBS. Im nächsten Schritt wurde in einem lichtgeschützten Eppendorf-Tube 1000 µl Substratpuffer mit 20 µl DAB+ Chromogensubstrat gemischt, welches umgehend auf die Objektträger aufgetragen wurde. Die nötige Inkubationszeit wurde dann unter mikroskopischer Sicht ermittelt, wobei sie nicht mehr als 10 Minuten betragen sollte. Das Chromogen band mit dem HRP des sekundären Antikörpers, was zu einer Braunfärbung führte. Nach dem Abspülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaun für 15 Sekunden, welches dann mit Leitungswasser abgespült wurde. Abschließend wurden die Objektträger in Alkoholbäder aufsteigender Konzentration und in ein Xylolbad getaucht. Nachdem das Eindeckmittel Vitro-Clud auf die Objektträger gegeben wurde, wurden Deckgläschen aufgelegt. MACC1-positive Zellen stellen sich nach der immunhistochemischen Behandlung braun dar.

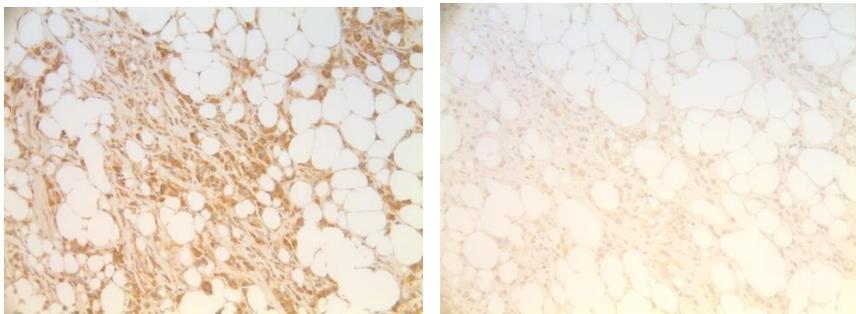


Abbildung 2: Immunhistochemie eines TMA-Ausschnitts mit (links) und ohne (rechts) MACC1-Antikörper

Der Immunreaktive Score (IRS) berechnet sich aus Punkten, die jeweils für die Färbeintensität und den prozentualen Anteil gefärbter Zellen vergeben werden (siehe

Abbildung 3). Somit können Werte zwischen 0 und 12 erreicht werden. Für die Einteilung in die Gruppen „Hohes MACC1“ und „Niedriges MACC1“ wurde der Grenzwert 5 gewählt, sodass TMAs mit einem IRS von 0-4 als wenig MACC1-exprimierend zählen und TMAs mit einem IRS von 6-12 als viel MACC1-exprimierend gelten.

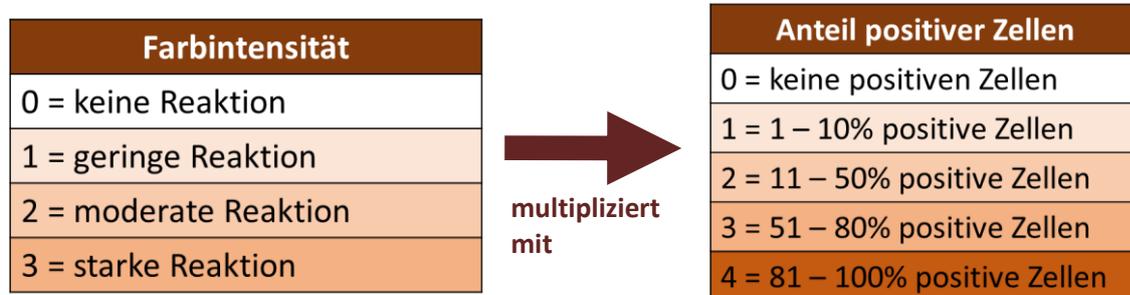


Abbildung 3: Berechnung des Immunreaktiven Scores (IRS)

2.7 Western Blot

Der Western Blot kann MACC1 auf Proteinebene nachweisen.

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung im Proteinlysate, welches 1:10 mit PBS verdünnt war, wurde der Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Dann erfolgte die Messung im Infinite M200 Pro Reader von Tecan bei einer Absorption von 595nm und die Auswertung mithilfe der Magellan 7 Software. Es wurden 50 µg des Gesamtproteins mit einfachem Nupage loading Buffer und 10% Dithiothreitol (DTT) versetzt. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Denaturierung der Proben bei 95°C. Danach wurden sie mit dem Proteinmarker Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder auf Nupage Novex 10% Bis-Tris Gele gegeben, sodass die 45-minütige Auftrennung bei 200 V gestartet werden konnte. Die Proteine, welche nun nach Größe und Ladung aufgetrennt waren, wurden durch semidry Elektroblothing (Transferkammer von Bio-Rad) mit Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol, pH 7,5) 30 bis 60 Minuten lang bei 20 V auf eine Hybond C Extra Nitrocellulose Membran (Amersham Biosciences) übertragen („geblottet“). Im Anschluss erfolgte die einstündige Inkubation mit TBST (Blockierungspuffer, 5% Milchpuffer). Dann wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit den primären Antikörpern inkubiert. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper wurden nur die

Proteine, die von Interesse sind, angefärbt. Zum Zweck der Ladungskontrolle wurde das zytoskeletale Protein β -Tubulin bzw GAPDH eingesetzt. Am Folgetag wurde die Membran zunächst für 30 Minuten mit TBST gewaschen, um dann einstündig mit den sekundären Antikörpern, welche 1:10000 mit TBST verdünnt wurden, bei Raumtemperatur inkubiert zu werden. Darauf folgte ein erneuter halbstündiger Waschgang mit TBST. Nachdem die Membran für eine Minute mit dem ECL Western Blotting Detektions-Reagenz von Advansta inkubiert wurde, wurde in der Dunkelkammer mit CL-XPosure™ Filmen (Pierce) in einer Expositionszeit von einigen Minuten das Proteinsignal detektiert.

Tabelle 14: Übersicht Antikörper für Western Blot

	Zielprotein:	Antikörper
Primäre Antikörper	β -Tubulin	Purified Mouse Anti- β -Tubulin
	GAPDH	Purified Goat Anti-GAPDH
	MACC1	Purified Rabbit Anti-MACC1
Sekundäre Antikörper	β -Tubulin	Anti-Mouse IgM
	GAPDH	Anti-Goat IgG HRP
	MACC1	Anti-Rabbit IgG HRP

2.8 Migrationsassay mit xCELLigence

Das xCELLigence Instrument von Roche ermöglicht eine kontinuierliche Echtzeit-Messung des Migrationsverhaltens von Zellen. Es arbeitet Impedanz-basiert, markierungsfrei und nicht invasiv, um adhärenz, migrierte Zellen zu messen. Impedanzänderungen korrelieren mit der Anzahl adhärenz Zellen.²⁰⁶

Zur Beschichtung der Platten wurde vorab 1:60 verdünntes Matrigel aufgetragen.

In den vier Stunden vorher wurden die Zellen starviert, also mit Medium ohne FBS gehalten. Nach einer Messung des Leerwertes des Mediums mit 0,5% FBS wurden dann 100.000 Zellen pro Well eingesät, wobei die Messung in Triplikaten erfolgte. Dann wurde die Messstation samt Platte in den Inkubator gestellt.

Die Analyseeinheit maß nun über die Sensor-Elektroden der Platte die elektronische Impedanz und leitete die Daten an die RTCA-Software. Der für das Migrationsverhalten

der Zellen ausgewertete Zeitraum beginnt 30 Minuten nach Beginn der Messung und endet 12 Stunden nach Beginn der Messung.

2.9 Statistische Analyse

Zur Berechnung von Überlebensstatistiken wurde das Ende des Beobachtungszeitraumes individuell festgelegt. War inzwischen der Tod einer Patientin eingetreten, so wurde das Todesdatum eingesetzt. Für die anderen Patientinnen wurden das Datum des letzten ermittelbaren Kontakts zu Ärzten sowie einige Angaben des Einwohnermeldeamtes verwendet.

Für die Analysen und Erstellung von Graphiken wurden die Programme SPSS (PASW Version 18.0), Excel und GraphPad PRISM benutzt.

Die MACC1-Level wurden bezüglich histologischem Typ, Differenzierungsgrad (Grading), Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Hormonrezeptor- und HER2-Status und Alter analysiert. Für die Überlebenszeitanalysen kamen Kaplan-Meier-Kurven mit Log-Rank-Test zum Einsatz. Auch die Cox-Regressionsanalyse wurde genutzt.

Mittels Chi-Quadrat-Tests bzw. Mann-Whitney-U-Tests wurden die Korrelationen von Kreuztabellen aus klinischen Parametern und den MACC1-Spiegeln untersucht.

Cutoff-Werte zur Einteilung in die Gruppen „Low MACC1“ und „High MACC1“ wurden mithilfe von ROC-Analysen ermittelt.

Für die Analyse der In-vitro-Daten wurden je nach Anzahl der unabhängigen Stichproben und nach Gleichverteilung der T-Test, der Mann-Whitney-U-Test und die ANOVA genutzt.

Ein p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Evaluierung der klinischen Bedeutung von MACC1

3.1.1 Ergebnisse aus immunhistochemischen Bestimmungen der MACC1-Expression

3.1.1.1 Zusammenhänge zwischen MACC1 und klinischen Parametern

Im Folgenden sind zunächst die Verteilungsmuster des IRS (Immunreaktiver Score) für MACC1 aus den immunhistochemisch gefärbten TMAs (Tissue Microarrays) der Mammakarzinomproben dargestellt. Die IRS-Werte sind nicht normalverteilt (siehe Abb. 4), der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung bestätigt dies mit einer zweiseitigen asymptotischen Signifikanz von 0,000.

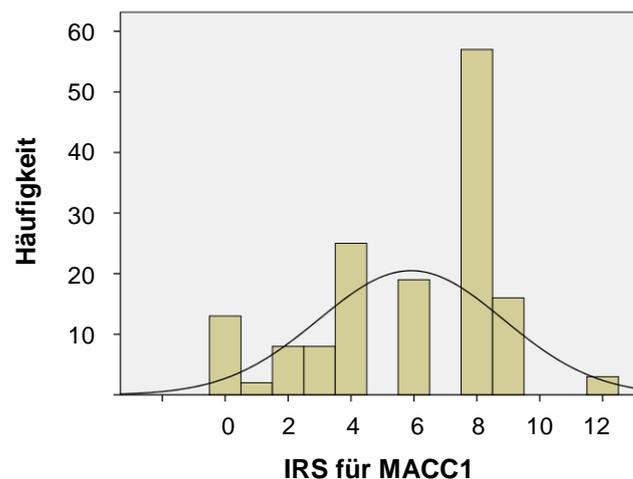


Abbildung 4: Verteilung der IRS-Werte für die MACC1-Expression in Mammakarzinom-geweben mittels Immunhistochemie ermittelt

Nun sollen die Zusammenhänge der MACC1-Expression mit den klinischen Parametern Grading, T-Stadium und Nodalstatus des primären Mammakarzinoms überprüft werden. Zwischen den immunhistochemisch bestimmten IRS-Werten der MACC1-Expression und dem Grading des Primärtumors (siehe Abb. 5) ist kein Zusammenhang festzustellen. Der Spearman Rangkorrelationskoeffizient beträgt in diesem Fall 0,058, was auf das Nichtvorliegen einer Korrelation schließen lässt.

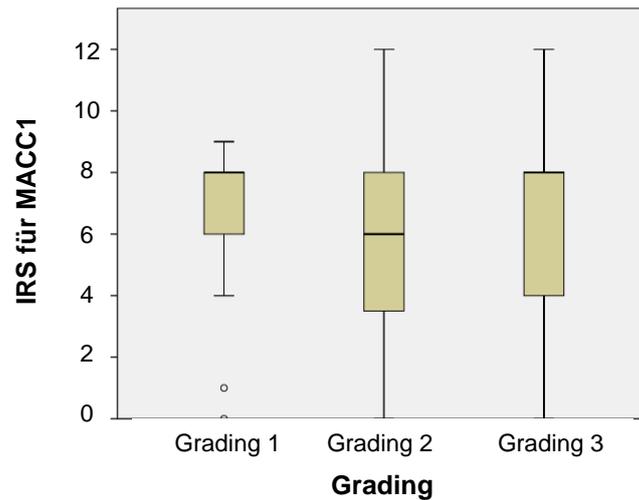


Abbildung 5: Immunhistochemisch ermittelte IRS-Werte der MACC1-Expression für die verschiedenen Grading der Primärtumore

Auch zwischen den T-Stadien der Primärtumore und den IRS-Werten der MACC1-Expression ist bei einem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten von 0,131 von keinem oder einem sehr geringen Zusammenhang auszugehen. (siehe Abb. 6).

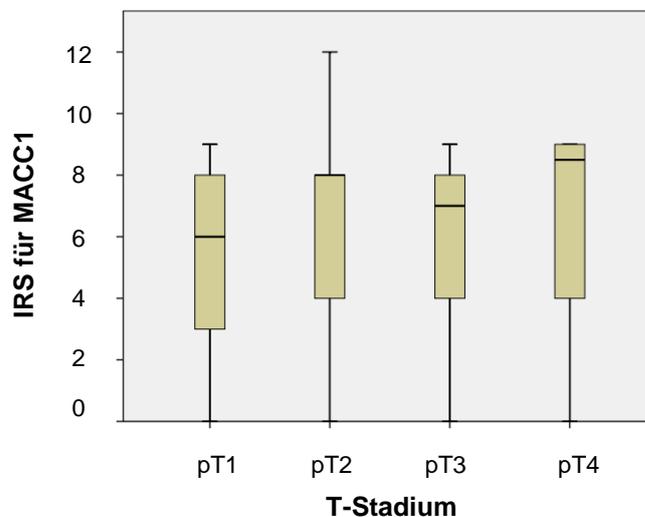


Abbildung 6: Immunhistochemisch ermittelte IRS-Werte der MACC1-Expression für die verschiedenen T-Stadien der Primärtumore

Ebenfalls bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Nodalstatus des Primärtumors und den IRS-Werten der MACC1-Expression ergibt sich mit dem geringen Spearman Rangkorrelationskoeffizient von 0,111, dass zwischen dem N-Stadium und der MACC1-Expression kein oder kaum ein Zusammenhang besteht (siehe Abb. 7).

Da MACC1 mit keinem der Parameter Grading, pT und pN korreliert, kann von einer Stadienunabhängigkeit ausgegangen werden.

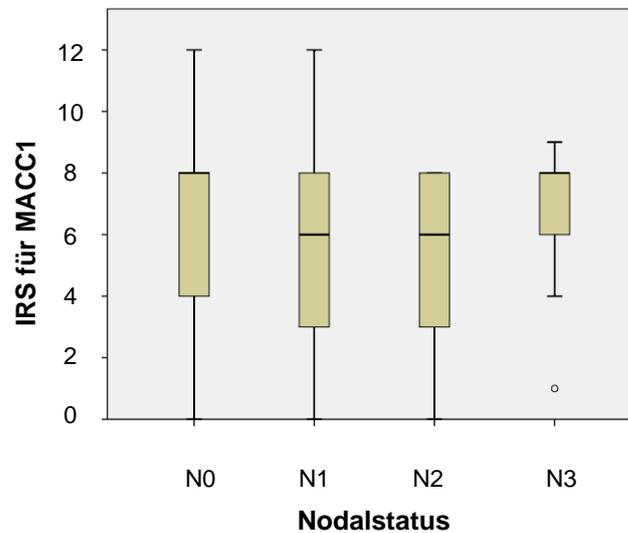


Abbildung 7: Immunhistochemisch ermittelte IRS-Werte der MACC1-Expression für die verschiedenen N-Stadien der Primärtumore

3.1.1.2 MACC1 ist ein prognostischer Marker für das metastasenfremie Überleben

Nun soll der prädiktive Wert der MACC1-Expressionslevel für das metastasenfremie Überleben (MFS) von Mammakarzinompatienten untersucht werden. Das MFS für die Patientengruppen mit immunhistochemisch niedrigem MACC1 und hohem MACC1 ist in Abbildung 8 dargestellt. Dazu wurde der Cutoff beim IRS-Wert 5 gesetzt. Die Patienten mit derart klassifiziertem hohem MACC1-Spiegel weisen ein signifikant ($p=0,006$) kürzeres MFS auf als die mit niedrigem MACC1-Level. Das durchschnittliche MFS für immunhistochemisch hohe MACC1-Spiegel im Primärtumor beträgt 56,82 Monate, wohingegen Patienten mit niedrigen MACC1-Werten ein durchschnittliches MFS von 63,24 Monaten aufweisen. Die mittels Cox Regression bestimmte Hazard Ratio eines auf diese Weise eingeteilten Patienten mit hohem MACC1 beträgt bezüglich des MFS und im Vergleich zu niedrigem MACC1 im Primärtumor 3,358 ($p=0,058$; 95% CI: 0,962–11,726).

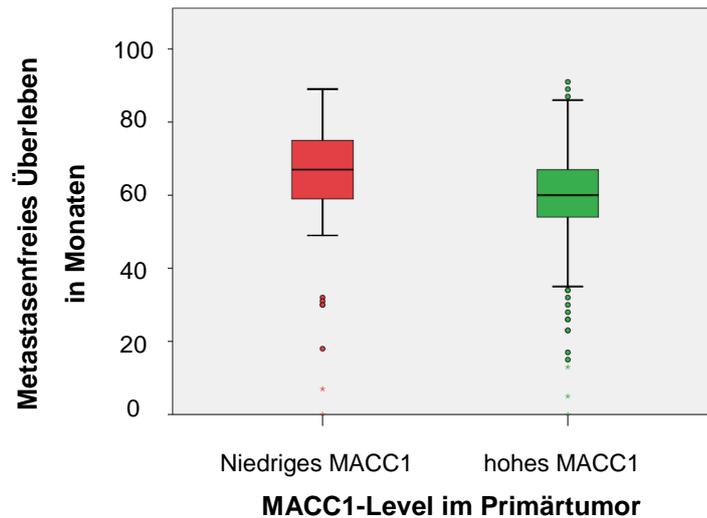


Abbildung 8: Metastasenfreies Überleben in Monaten für immunhistochemisch bestimmte niedrige (IRS 0-4) und hohe (IRS 6-12) MACC1-Spiegel: Patienten mit niedrigem MACC1 leben signifikant länger metastasenfrei. $p=0,006$

Nun werden die beiden Patientengruppen einerseits mit Entwicklung von Metastasen im Krankheitsverlauf und andererseits ohne Metastasierung betrachtet. Erstere haben mit einem durchschnittlichen IRS von 6,94 und einem Median-IRS von 8 eine höhere MACC1-Expression des Primärtumors zu verzeichnen als Patienten ohne Metastasierung im Verlauf, deren durchschnittlicher IRS 5,83 und Median-IRS 6 beträgt. (siehe Abb. 9)

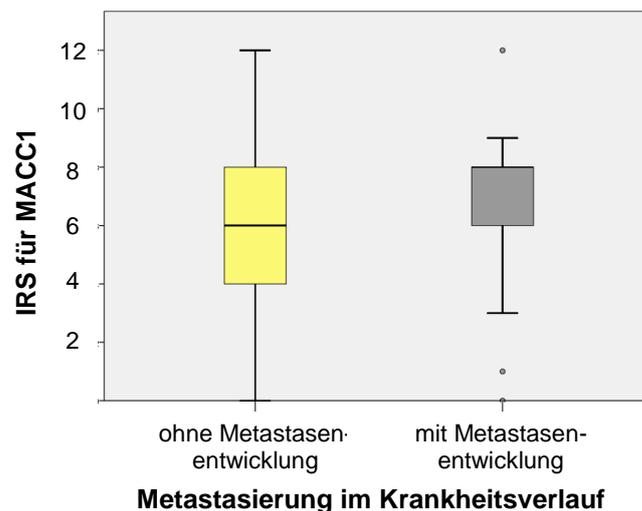


Abbildung 9: Mittels Immunhistochemie ermittelte IRS-Werte der MACC1-Expression für Patienten ohne und mit Metastasen im Krankheitsverlauf: metastasenfreie Patienten weisen durchschnittlich niedrigere IRS auf als Patienten mit Metastasen im Krankheitsverlauf. $p=0,108$

Als Nächstes wird mittels Kaplan-Meier-Methode das metastasenfrie Überleben für Patienten mit immunhistochemisch bestimmten niedrigen MACC1-Leveln (IRS 0-4) und hohen MACC1-Leveln (IRS 6-12) im Primärtumor analysiert (siehe Abb. 10). Der zugehörige Log-Rank-Test ergibt ein signifikant besseres metastasenfrees Überleben für Mammakarzinompatienten aus der Niedriges-MACC1-Gruppe.

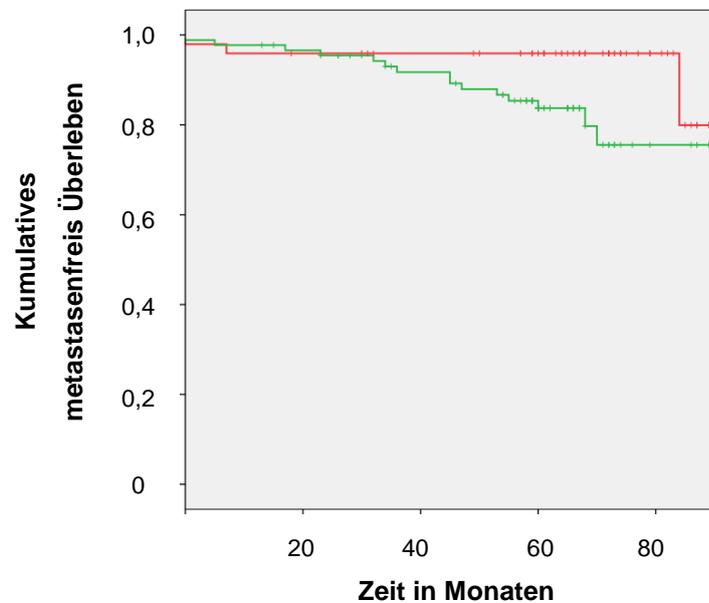


Abbildung 10: Metastasenfrees Überleben der gesamten Kohorte. Vergleich des metastasenfrees Überlebens bei immunhistochemisch bestimmten hohen (grüne Kurve) und niedrigen (rote Kurve) MACC1-Leveln des Primärtumors: Patienten mit niedrigem IRS der MACC1-Expression leben signifikant länger metastasenfrees als Patienten mit hohem IRS der MACC1-Expression. $p=0,044$

3.1.1.3 Prognostischer Wert von MACC1 für das Gesamtüberleben

Für das Gesamtüberleben ergab sich keinerlei aussagekräftiger, prognostischer Wert für mittels IHC bestimmte MACC1-Spiegel in Primärtumoren von Mammakarzinomen.

3.1.1.4 Ausgewählte Subgruppenanalysen

Im Folgenden werden ausgewählte Analysen für Subgruppen der Kohorte dargestellt. Zunächst wurden ausschließlich Mammakarzinome im T-Stadium 2 betrachtet. Zum einen wurden diese in die immunhistochemisch ermittelten Gruppen „niedriges MACC1“ (IRS 0-4) und „hohes MACC1“ (6-12) eingeteilt, wobei mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,207 im Log-Rank-Test die Patienten mit T2-Tumoren und niedrigeren MACC1-Spiegeln ein deutlich besseres metastasenfrees Überleben aufwiesen (siehe Abb. 11).

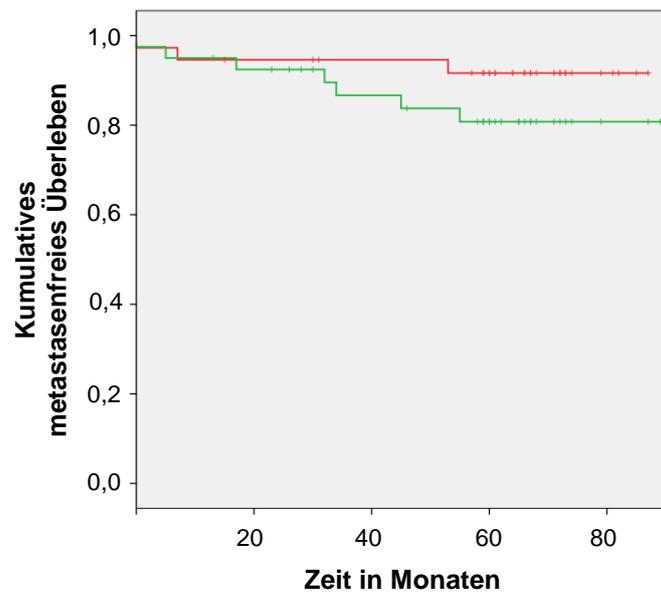


Abbildung 11: Metastasenfreies Überleben bei T2-Stadium. Vergleich des metastasenfreien Überlebens bei immunhistochemisch bestimmten hohen (grüne Kurve) und niedrigen (rote Kurve) MACC1-Leveln (*Cutoff IRS=5*) des Primärtumors ausschließlich für Tumore im Stadium T2: Patienten mit niedrigem IRS der MACC1-Expression leben länger metastasenfrei als Patienten mit hohem IRS der MACC1-Expression. Log Rank Test: $p=0,207$.

Exemplarisch sei an dieser Stelle auch die Untergruppe der Patienten unter 65 Jahren beleuchtet. Bei einem Cutoff der immunhistochemisch ermittelten IRS-Werte von 5 ergibt sich für die Patienten mit niedriger MACC1-Expression (IRS 0-4) im Primärtumor ein besseres Gesamtüberleben als für die mit hoher MACC1-Expression (IRS 6-12) (siehe Abb. 12). Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt dabei 0,239 gemäß Log Rank Test.

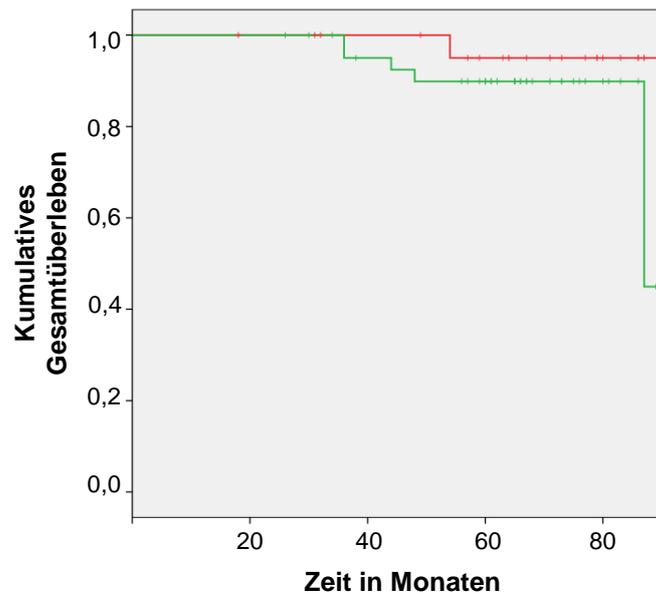


Abbildung 12: Überleben der Patientinnen unter 65 Jahren. Vergleich des Gesamtüberlebens bei immunhistochemisch bestimmten hohen (grüne Kurve) und niedrigen (rote Kurve) MACC1-Leveln (*Cutoff* *IRS* = 5) des Primärtumors ausschließlich für Patienten unter 65 Jahren: Patienten mit niedriger MACC1-Expression leben länger als Patienten mit hoher MACC1-Expression. Log Rank Test: $p=0,239$.

3.1.2 MACC1-Expression mittels qRT-PCR

3.1.2.1 Zusammenhänge zwischen MACC1 und klinischen Parametern

Im Folgenden ist zunächst das Verteilungsmuster der mittels qRT-PCR generierten Messwerte für MACC1 in der Einheit $20-\Delta CT$ dargestellt. Die Messwerte der qRT-PCR unterliegen einer Gleichverteilung (siehe Abb. 13), welches der Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung mit einer zweiseitigen asymptotischen Signifikanz von 0,06 bei einem Signifikanzniveau von 5% bestätigt.

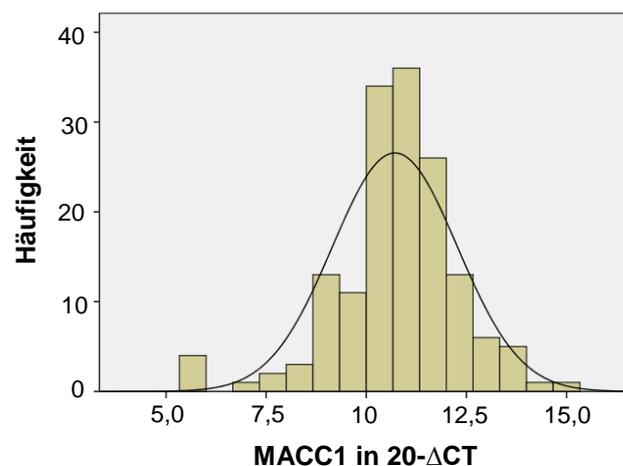


Abbildung 13: Verteilung der MACC1-Messwerte aus qRT-PCR mit RNA aus Mammakarzinomgeweben

Nun sollen die Zusammenhänge der mittels qRT-PCR ermittelten MACC1-Level mit den klinischen Parametern Grading, T-Stadium und Nodalstatus des primären Mammakarzinoms überprüft werden.

Für die Korrelation zwischen den mittels PCR bestimmten MACC1-Werten der Tumor-RNA und dem Grading der Primärtumore (siehe Abb. 14) ergibt sich bei einem Spearman Rangkorrelationskoeffizienten von 0,2 ein lediglich schwacher Zusammenhang.

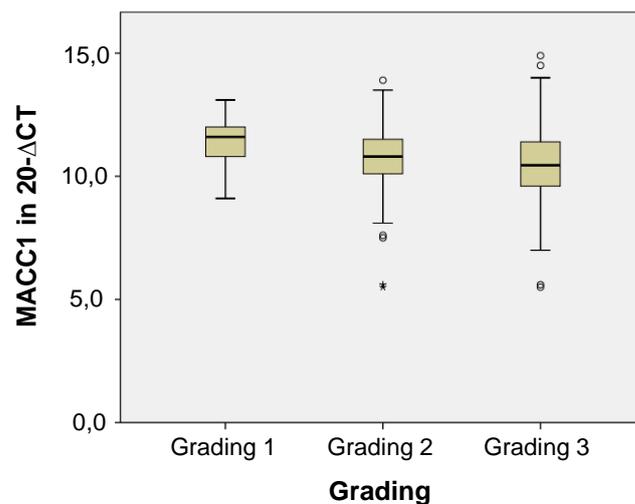


Abbildung 14: Durch PCR ermittelte MACC1-Werte in $20-\Delta CT$ für die verschiedenen Grading der Primärtumore

Auch für die T-Stadien und die MACC1-RNA-Werte besteht bei einem Spearman Test mit einem Rangkorrelationskoeffizienten von 0,148 nur eine sehr geringe Korrelation (siehe Abb. 15).

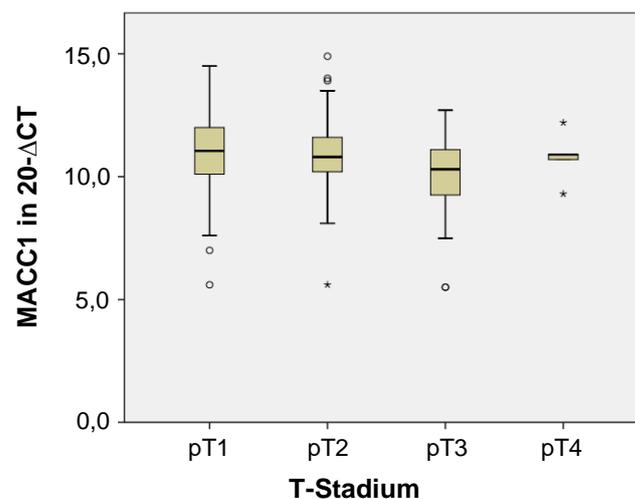


Abbildung 15: Durch PCR ermittelte MACC1-Werte in $20-\Delta CT$ für die verschiedenen T-Stadien der Primärtumore

Ebenso besteht keine bis kaum Korrelation zwischen den N-Stadien und den MACC1-Leveln auf RNA-Ebene, dies zeigt der Spearman Rangkorrelationskoeffizient von 0,023.(siehe Abb. 16). Somit haben sich auch mittels qRT-PCR quantifizierte MACC1-Werte ohne Zusammenhang zu Grading, pT und pN gezeigt.

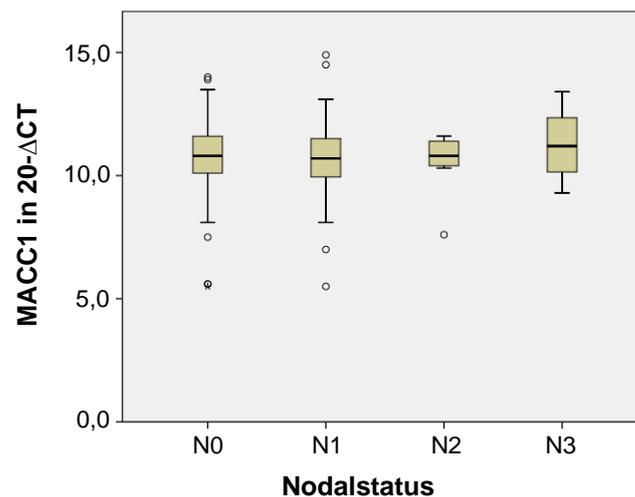


Abbildung 16: Durch PCR ermittelte MACC1-Werte in $20-\Delta CT$ für die verschiedenen N-Stadien der Primärtumore

3.1.2.2 Zusammenhänge zwischen MACC1 und dem metastasenfrem Überleben

Mittels ROC-Analysen wurden geeignete Cutoffs zur Einteilung der Ergebnisse aus der qRT-PCR in die Gruppen hohes MACC1 und niedriges MACC1. Bei einem ROC-basiert ermittelten Cutoff von $20-\Delta CT = 11,9$ ergeben sich bei der Kaplan-Meier-Analyse mit Logrank-Test deutliche, jedoch nicht signifikante Unterschiede im durchschnittlichen MFS in Monaten. Der Mittelwert des MFS von Patienten mit derart eingeteiltem niedrigen MACC1-Spiegel beträgt 60,23 Monate, wobei Patienten mit hoher MACC1-Expression durchschnittlich nur 56,96 Monate metastasenfrem leben.

Die mit der Cox Regression ermittelte Hazard-Ratio bezüglich des MFS betrug für Patienten mit hohem MACC1-Spiegeln des Primärtumors gegenüber solchen mit niedrigem MACC1 2,235 ($p=0,131$; 95% CI: 0,786 – 6,351).

3.1.2.3 Prognostischer Wert von MACC1 für das gesamte Überleben

Die Analysen für das Gesamtüberleben der Patienten haben weder für die gesamte Kohorte noch für Subgruppen signifikante Unterschiede zwischen niedriger und hoher MACC1-Expression im Primärtumor ergeben. Jedoch gibt es auch hier Tendenzen.

Bei Betrachtung der gesamten Kohorte zeigt sich der Trend, dass durch qRT-PCR-Messung eingeteilte Patienten mit niedrig-MACC1-exprimierenden Primärtumoren deutlich länger leben als die mit hohem MACC1-Level (ROC-basiert-ermittelter Grenzwert $20-\Delta CT=10,85$), wobei die Irrtumswahrscheinlichkeit im Log Rank Test 0,183 beträgt (siehe Abb. 17).

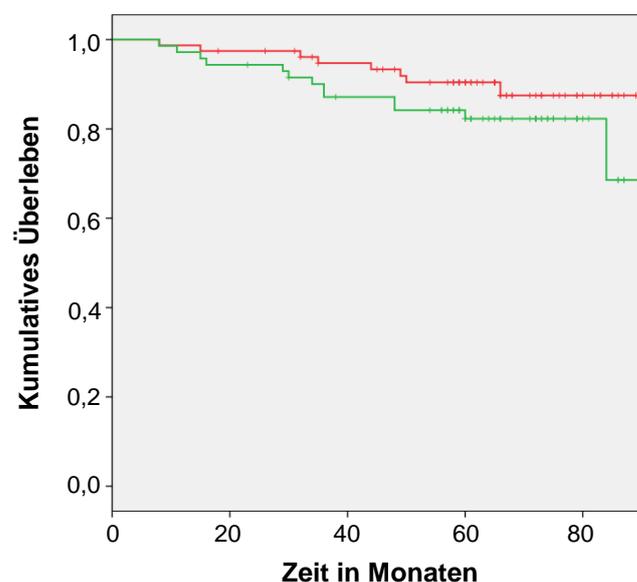


Abbildung 17: Überleben der gesamten Kohorte. Vergleich des Gesamtüberlebens bei mittels qRT-PCR bestimmten hohen (grüne Kurve) und niedrigen (rote Kurve) MACC1-Leveln (*Cutoff* $20-\Delta CT=10,85$) des Primärtumors: Patienten mit niedriger MACC1-Expression leben durchschnittlich länger als Patienten mit hoher MACC1-Expression. Log Rank Test: $p=0,183$.

Die Hazard Ratio von 1,803 ($p=0,190$; 95% CI: 0,747 – 4,350) lässt allerdings auch auf eine tendenziell schlechtere Prognose der Hoch-MACC1-Träger bezüglich des Gesamtüberlebens schließen.

3.1.2.4 Ausgewählte Subgruppenanalysen

Zum anderen wurden die T2-Stadium-Patienten anhand der qRT-PCR-Werte in „Niedriges MACC1“ und „Hohes MACC1“ unterteilt, wobei der ROC-basiert-ermittelte Cutoff von $20-\Delta CT=11,95$ zu einem signifikant ($p=0,001$ im Log-Rank-Test) besseren Überleben der Patienten mit niedrig-MACC1-exprimierenden Tumoren führt (siehe Abb. 18). Das entsprechende durchschnittliche MFS beträgt für die derart eingeteilten

niedrig-MACC1-exprimierenden Mammakarzinome 61,25 Monate, während die mit hohem MACC1-Level nur ein mittleres MFS von 49,90 Monaten aufweisen.

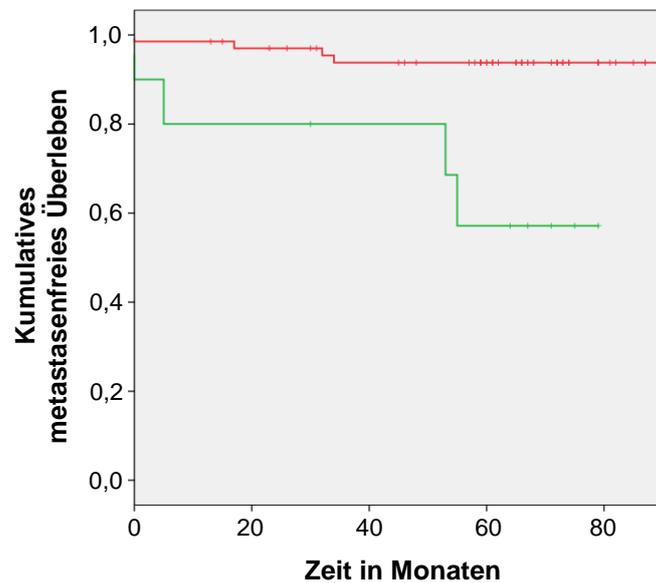


Abbildung 18: Metastasenfrees Überleben bei T2-Stadium. Vergleich des metastasenfrees Überlebens bei mittels qRT-PCR bestimmten hohen (grüne Kurve) und niedrigen (rote Kurve) MACC1-Leveln (*Cutoff* $20-\Delta CT=11,95$) des Primärtumors ausschließlich für Tumore im Stadium T2: Patienten mit niedriger MACC1-Expression leben länger metastasenfrees als Patienten mit hoher MACC1-Expression. Log Rank Test: $p=0,001$.

Außerdem erbrachte die Analyse ausschließlich der Patienten mit duktalem Mammakarzinomen interessante Ergebnisse. So zeigte sich bei ihnen für die durch qRT-PCR-Werte gebildeten Gruppen „niedriges MACC1“ und „hohes MACC1“ mit dem ROC-basiert-ermittelten Grenzwert von $20-\Delta CT=11,75$ ebenfalls, dass Patienten mit niedriger MACC1-Expression im Primärtumor ein signifikant besseres metastasenfrees Überleben aufwiesen als Patienten mit derart bestimmten hohen MACC1-Leveln (siehe Abb. 19). Die zugehörige Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt gemäß Log Rank Test 0,039. Für diese Einteilung beträgt das durchschnittliche MFS für niedrig-MACC1-exprimierende Mammakarzinome 60,10 Monate, während es bei hohem MACC1 im Primärtumor bei nur durchschnittlich 52,94 Monaten liegt.

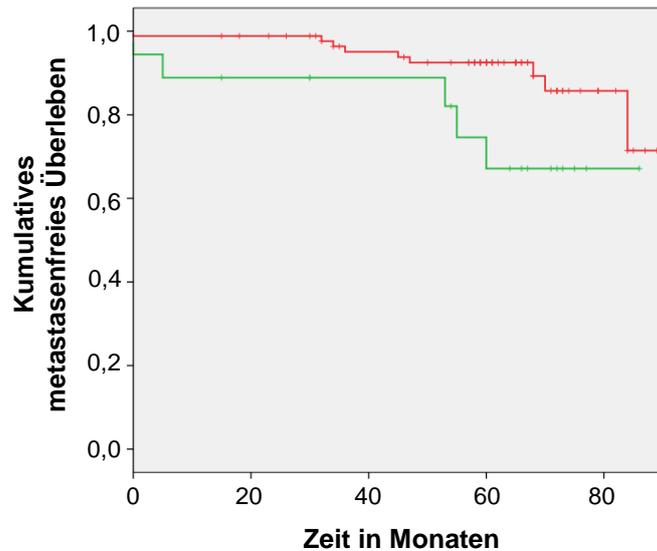


Abbildung 19: Metastasenfreies Überleben bei duktalem Mammakarzinomen. Vergleich des metastasenfrenen Überlebens bei mittels qRT-PCR bestimmten hohen (grüne Kurve) und niedrigen (rote Kurve) MACC1-Leveln (*Cutoff* $20-\Delta CT=11,75$) des Primärtumors ausschließlich für duktales Mammakarzinome: Patienten mit niedriger MACC1-Expression leben länger metastasenfrei als Patienten mit hoher MACC1-Expression. Log Rank Test: $p=0,039$.

Exemplarisch sei an dieser Stelle auch die Untergruppe der Patienten unter 65 Jahren beleuchtet. Hier ergab sich für die mittels Werten aus der qRT-PCR gebildeten Gruppen „niedriges MACC1“ und „hohes MACC1“ mit Cutoff bei $20-\Delta CT=10,95$ ein deutlicher Unterschied im Überleben. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,102 (Log Rank Test) wiesen die Patienten mit niedriger MACC1-Expression im Primärtumor ein besseres Gesamtüberleben in Monaten auf als die mit hohem MACC1-Level (siehe Abb. 20).

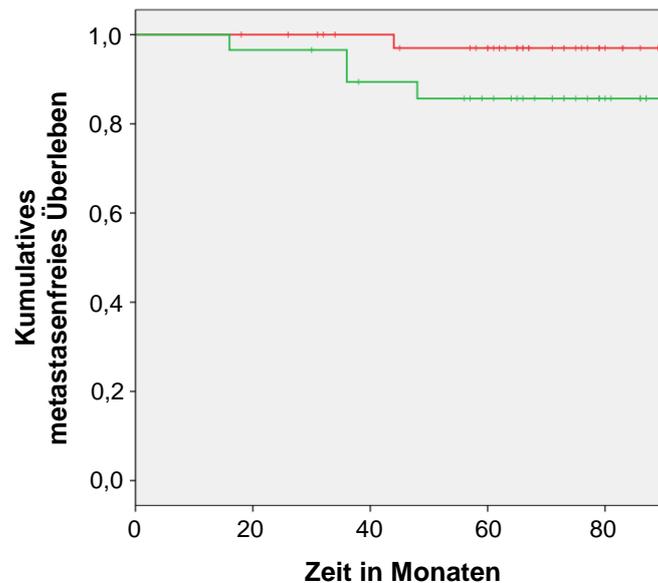


Abbildung 20: Gesamtüberleben der Patienten unter 65 Jahren. Vergleich des metastasenfrenen Überlebens bei mittels qRT-PCR bestimmten hohen (grüne Kurve) und niedrigen (rote Kurve) MACC1-Leveln (Cutoff $20-\Delta\text{CT}=10,95$) des Primärtumors ausschließlich für Patienten unter 65 Jahren: Patienten mit niedriger MACC1-Expression leben länger als Patienten mit hoher MACC1-Expression. Log Rank Test: $p=0,102$.

3.2 Ergebnisse der In-vitro-Versuche

3.2.1 Endogene MACC1-Expression von Mammakarzinom-Zelllinien

Zu Beginn wurden 13 Mammakarzinom-Zelllinien kultiviert mit dem Ziel ihre endogene MACC1-Expression mittels qRT-PCR zu bestimmen. Zu diesen Zelllinien zählen MDA-MB-231, MDA-MB-361, MDA-MB-435, MDA-N, MCF-7, KPL-4, MDA-N, MT1, MT3, T47-D, MaTu, SKBR-3, ZR-75-1 und HBL-100.

Die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 weisen niedrige endogene MACC1-Spiegel auf (siehe Abb. 21). Außerdem zeichnen sie sich durch hohe Proliferationsraten und einen unterschiedlichen Hormonrezeptorstatus aus. In Vorversuchen zeigte sich, dass sich das Migrationsverhalten von MDA-MB-231 und MCF-7 im xCELLigence, einem Instrument für Impedanz-basierte und markierungsfreie Echtzeit-Messungen des Zellverhaltens, untersuchen lässt. Deshalb wählten wir diese beiden Zelllinien für die weiteren Versuche aus.

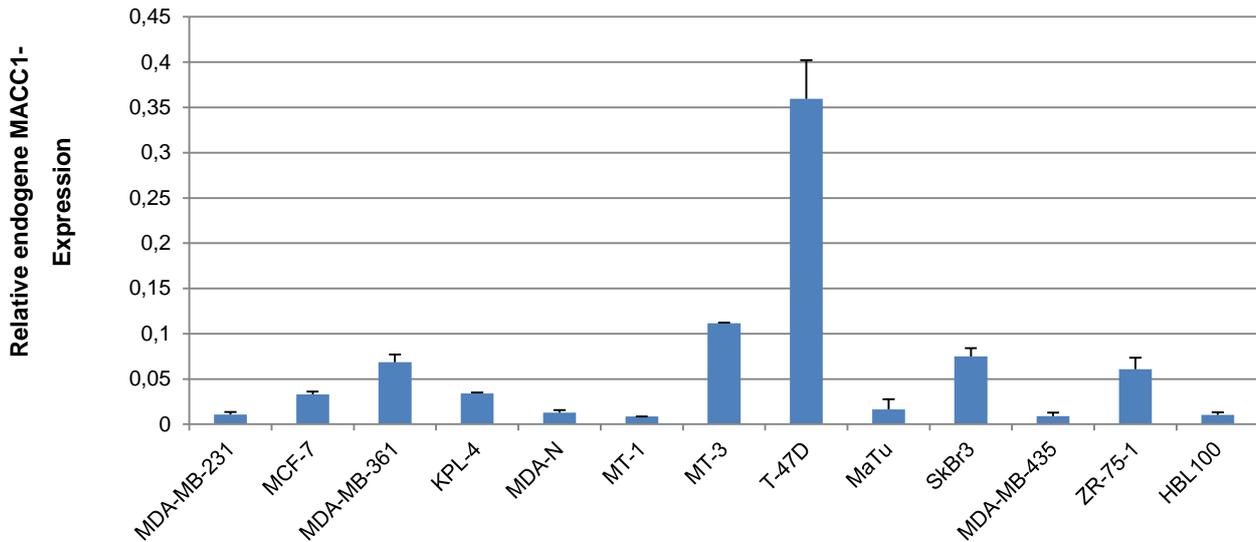


Abbildung 21: Endogene MACC1-Level der 13 getesteten Mammakarzinom-Zelllinien: Mittels qRT-PCR wurde die MACC1-Konzentration der RNA aus den jeweiligen Zellpellets bestimmt. Die Normalisierungsberechnung erfolgte mit Hilfe des Housekeeping Gene Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH).

3.2.2 MACC1-Expression nach Transfektion bzw. Transduktion und dessen Einfluss auf das Migrationsverhalten

In den ausgewählten Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 sollte die MACC1-Expression gesteigert werden. Für die ektope Überexpression von MACC1 wurden die Zellen mit einem MACC1-tragenden Plasmid transient transfiziert und andererseits Zellen mit Lentiviren, die MACC1-GFP beinhalten, transduziert. Als Kontrolle erfolgten analog die Transfektion mit einem Leervektor und die Transduktion mit GFP allein. Die MACC1-mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR quantifiziert, während der Nachweis der MACC1-Proteinexpression mittels Western Blot erfolgte. Das Migrationsverhalten der Zellen wurde in kontinuierlicher Echtzeit-Messung mit dem xCELLigence, einem Gerät zur Impedanz-basierten Zellanalytik, durchgeführt. Die Migrationsergebnisse von Testläufen mit reinem Zellnährmedium wurden jeweils von den Kurven subtrahiert. Aus den Daten der Impedanz-basierten Zellanalytik lassen sich die Flächen unterhalb der Graphen, sogenannte Areas Under Curve (AUC), berechnen, welche ein aussagekräftiges Maß für das Migrationspotenzial der untersuchten Zellen darstellen und im Folgenden ebenfalls abgebildet werden.

3.2.2.1 Die transiente Transfektion mit MACC1 erhöht das Migrationsverhalten von MCF-7

In Abb. 22 ist die Quantifizierung von MACC1 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR-Läufen dargestellt für die MCF-7 Zellen, von denen die einen Zellen zur Kontrolle mit Leervektor und die anderen Zellen mit MACC1-Vektor transient transfiziert wurden. Die durchschnittliche MACC1-Expression der mit MACC1-Vektor transfizierten Zellen beträgt das 4,13-fache der zu Kontrollzwecken mit Leervektor transfizierten MCF-7 Zellen, welches eine erfolgreiche ektope Überexpression veranschaulicht.

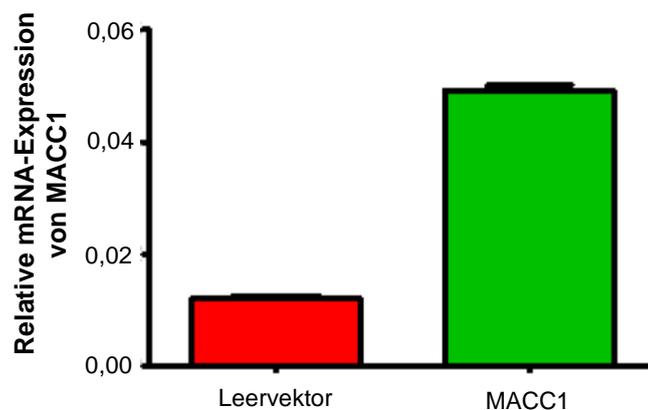


Abbildung 22: MCF-7 transient transfiziert. Messung der MACC1-mRNA-Expression der transfizierten MCF-7-Zellen mittels qRT-PCR: Dargestellt sind Mittelwerte ($n=2$) und die zugehörigen Standardabweichungen. Die Normalisierungsberechnungen erfolgten mit dem Housekeeping Gene Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

Das in der Impedanz-basierten Zellanalytik untersuchte Migrationsverhalten der mit MACC1-Vektor oder Leervektor transfizierten Zellen ist nachfolgend als Kurve dargestellt. Der grüne Graph entspricht den Zellen, die durch Transfektion mit MACC1-Vektor eine erhöhte MACC1-Expression aufwiesen, während der rote Graph der Kontrollgruppe ohne MACC1-Steigerung entspricht (siehe Abb. 23). Für die MACC1-transfizierten MCF-7 lässt sich eine deutlich gesteigerte Migration im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Überexpression nachweisen. Die daraus errechneten AUC-Werte zeigen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,0132$ eine signifikant höhere Migrationsleistung der MACC1-hochregulierten MCF-7 Zellen (siehe Abb. 24).

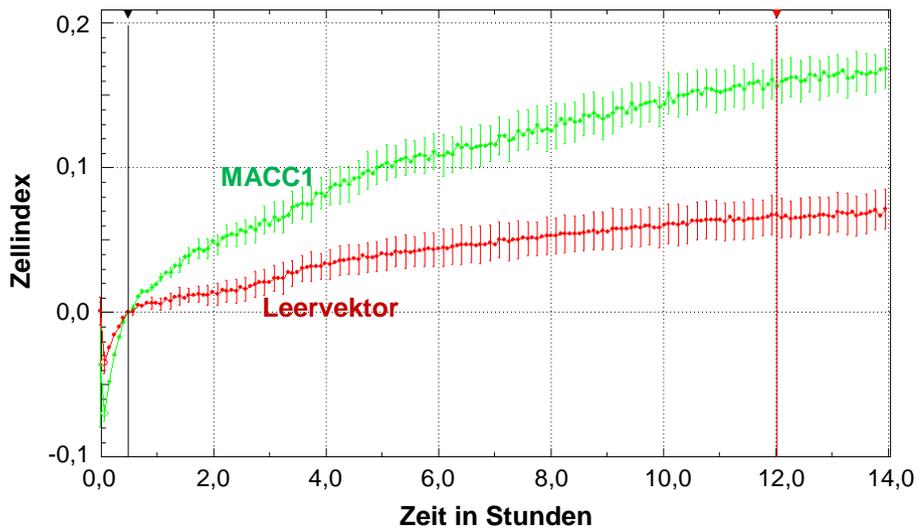


Abbildung 23: Exemplarischer Echtzeit-Migrationsassay der mit MACC1 transfizierten MCF-7-Zellen: Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus 3 Werten und die zugehörigen Standardabweichungen. Zum Zeitpunkt von 30 Minuten wurden die Kurven normalisiert. Zudem wurde jeweils die Kurve des Mediums RPMI subtrahiert.

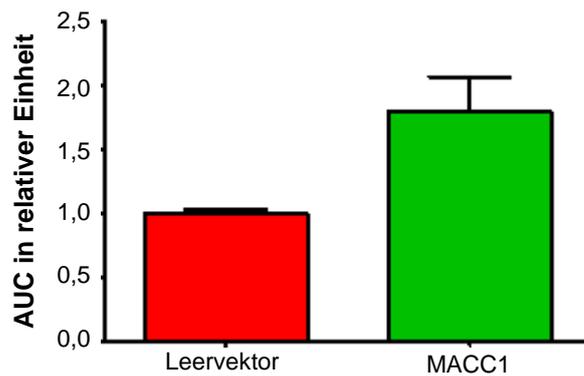


Abbildung 24: MCF-7 transient transfiziert. Berechnete Flächen unterhalb der oben dargestellten Migrationskurven der mit MACC1 transfizierten MCF-7-Zellen zwischen 30 Minuten und 12 Stunden; n=2; p=0,0132

3.2.2.2 Der Einfluss lentiviraler Transduktion mit MACC1 auf das Migrationsverhalten von MCF-7

In Abb. 25 ist die Quantifizierung von MACC1 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR-Läufen dargestellt für die MCF-7 Zellen, von denen einige mit GFP und andere mit MACC1-GFP lentiviral transduziert wurden. Die durchschnittliche MACC1-Expression der mit MACC1-GFP transduzierten Zellen beträgt das 37,37-fache der zu Kontrollzwecken mit GFP allein transduzierten MCF-7 Zellen. Auch im Western Blot der entsprechenden Zellen kann eine erhöhte Expression des Gens MACC1 nachgewiesen werden, die kräftige Bande auf Höhe von 134 kDa in der Spalte für MACC1-GFP-

transduzierte MCF-7 entspricht einer großen Menge des Fusionsproteins MACC1-GFP (siehe Abb. 26).

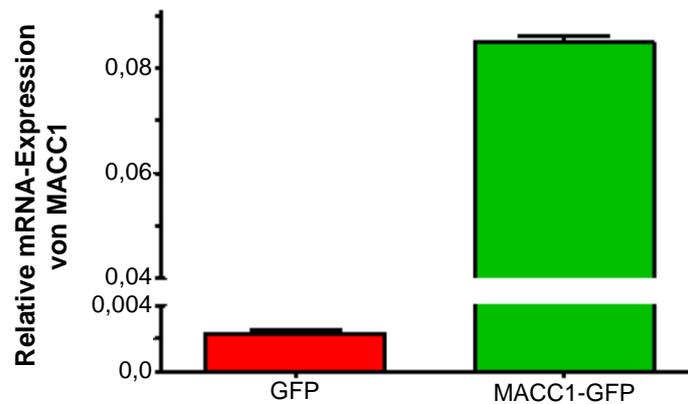


Abbildung 25: MCF-7 lentiviral transduziert. Messung der MACC1-mRNA-Expression der transfizierten MCF-7-Zellen mittels qRT-PCR: Dargestellt sind Mittelwerte (n=2) und die zugehörigen Standardabweichungen. Die Normalisierungsberechnungen erfolgten mit dem Housekeeping Gene Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (GFP=Green Fluorescent Protein/Kontrolle, MACC1-GFP=MACC1 mit GFP gekoppelt)



Abbildung 26: Zur Bestimmung der Expression von MACC1 auf Proteinebene der mit MACC1 transduzierten MCF-7-Zellen dienen Western-Blots. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) eingesetzt. (GFP= nach Transduktion mit ausschließlich Green Fluorescent Protein/Kontrolle, MACC1-GFP= nach Transduktion mittels MACC1 mit GFP gekoppelt)

Das in der Impedanz-basierten Zellanalytik untersuchte Migrationsverhalten der mit MACC1-GFP oder GFP transduzierten Zellen ist nachfolgend als Kurven dargestellt. Der grüne Graph entspricht den Zellen, die durch Transduktion mit MACC1-GFP mit einer MACC1-Erhöhung auf mRNA- und Proteinebene reagierten, während der rote Graph der Kontrollgruppe ohne MACC1-Steigerung entspricht. Für die MACC1-GFP transduzierten MCF-7 lässt sich eine leicht vermehrte Migration im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Überexpression nachweisen (siehe Abb. 27). Die daraus errechneten AUC-Werte zeigen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,1056$ eine höhere Migrationsleistung der mit MACC1-GFP transduzierten MCF-7 Zellen (siehe Abb. 28).

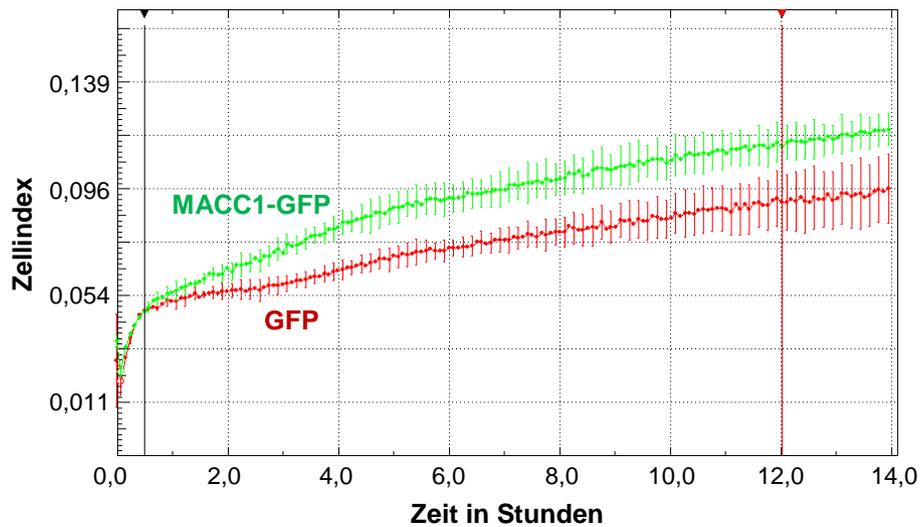


Abbildung 27: Exemplarischer Echtzeit-Migrationsassay der mit MACC1 lentiviral transduzierten MCF-7-Zellen: Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus 3 Werten und die zugehörigen Standardabweichungen. Zum Zeitpunkt von 30 Minuten wurden die Kurven normalisiert. Zudem wurde jeweils die Kurve des Mediums RPMI subtrahiert. (GFP=Green Fluorescent Protein/Kontrolle, MACC1-GFP=MACC1 mit GFP gekoppelt)

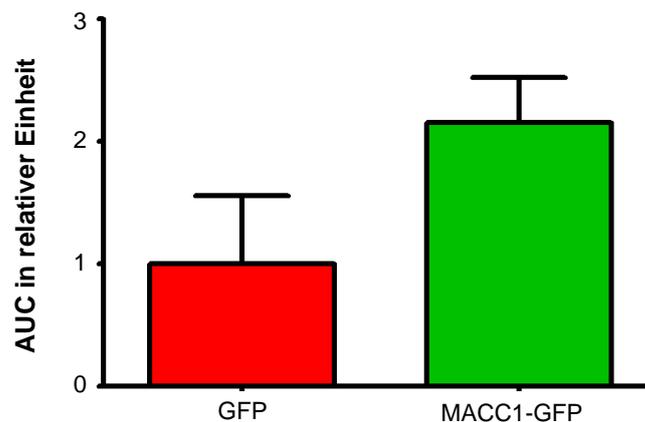


Abbildung 28: MCF-7 lentiviral transduziert. Berechnete Flächen unterhalb der oben dargestellten Migrationskurven der mit MACC1 lentiviral transduzierten MCF-7-Zellen zwischen 30 Minuten und 12 Stunden (GFP=Green Fluorescent Protein/Kontrolle, MACC1-GFP=MACC1 mit GFP gekoppelt); n=2; p=0,1056

3.2.2.3 Der Einfluss von transienter Transfektion mit MACC1 auf das Migrationsverhalten von MDA-MB-231

In Abb. 29 ist die Quantifizierung von MACC1 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR-Läufen dargestellt für die MDA-MB-231 Zellen, von denen einige mit Leervektor und andere mit MACC1-Vektor transient transfiziert wurden. Die durchschnittliche MACC1-Expression der mit MACC1-Vektor transfizierten Zellen beträgt das 383,52-fache der zu Kontrollzwecken mit Leervektor transfizierten MDA-MB-231 Zellen, welches einen

Transfektionserfolg veranschaulicht. Auch im Western Blot der entsprechenden Zellen ist die gesteigerte Expression des Gens MACC1 in Form der Bande bei 99 kDa, was der Größe des Fusionsproteins MACC1-V5-Histag entspricht, nachweisbar (siehe Abb. 30).

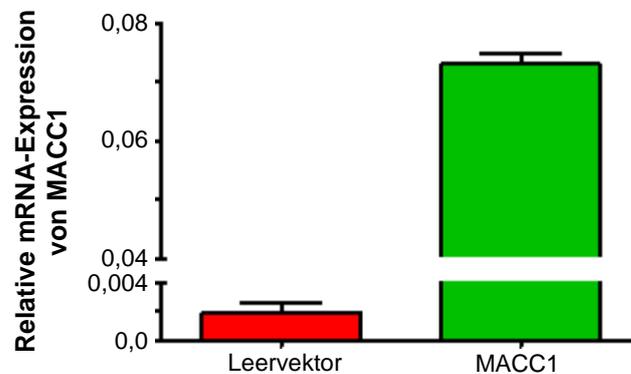


Abbildung 29: MDA-MB-231 transient transfiziert. Messung der MACC1-mRNA-Expression der transfizierten MDA-MB-231-Zellen mittels qRT-PCR: Dargestellt sind Mittelwerte (n=2) und die zugehörigen Standardabweichungen. Die Normalisierungsberechnungen erfolgten mit dem Housekeeping Gene Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)

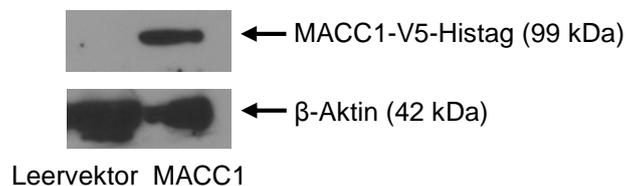


Abbildung 30: Zur Bestimmung der Expression von MACC1 auf Proteinebene der mit MACC1 transfizierten MDA-MB-231-Zellen dienten Western-Blots. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Protein Beta-Aktin eingesetzt.

Das in der Impedanz-basierten Zellanalytik untersuchte Migrationsverhalten der mit MACC1-Vektor oder Leervektor transfizierten MDA-MB-231 Zellen ist nachfolgend als Kurven dargestellt, wobei der grüne Graph den Zellen entspricht, die durch Transfektion mit MACC1-Vektor mit einer MACC1-Erhöhung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene reagierten, während der rote Graph der Kontrollgruppe ohne MACC1-Steigerung entspricht. Für die MACC1-transfizierten MDA-MB-231 lässt sich eine leicht vermehrte Migration im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Überexpression nachweisen (siehe Abb. 31). Die daraus errechneten AUC-Werte zeigen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,3311$ eine höhere Migrationsleistung der MACC1-exprimierenden MDA-MB-231 Zellen (siehe Abb. 32).

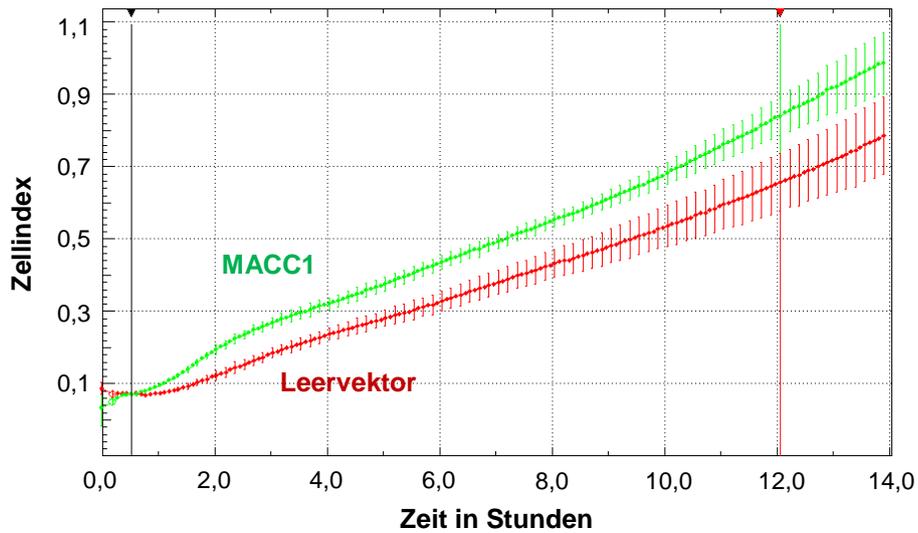


Abbildung 31: Exemplarischer Echtzeit-Migrationsassay der mit MACC1 transfizierten MDA-MB-231-Zellen: Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus 3 Werten und die zugehörigen Standardabweichungen. Zum Zeitpunkt von 30 Minuten wurden die Kurven normalisiert. Zudem wurde jeweils die Kurve des Mediums DMEM subtrahiert.

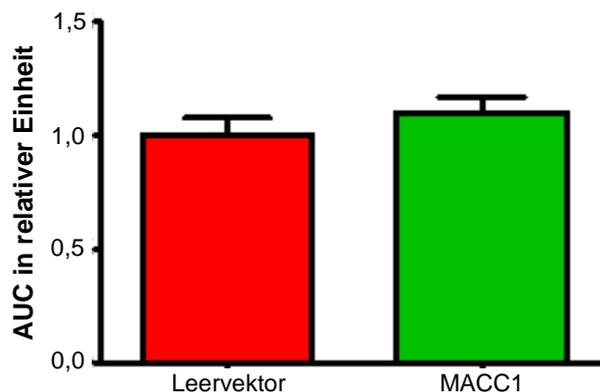


Abbildung 32: MDA-MB-231 transient transfiziert. Berechnete Flächen unterhalb der oben dargestellten Migrationskurven der mit MACC1 transfizierten MDA-MB-231-Zellen zwischen 30 Minuten und 12 Stunden; n=2; p=0,3311

3.2.2.4 Lentivirale Transduktion mit MACC1 erhöht das Migrationsverhalten von MDA-MB-231

In Abb. 37 ist die Quantifizierung von MACC1 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR-Läufen dargestellt für die MDA-MB-231 Zellen, von denen einige mit GFP und andere mit MACC1-GFP lentiviral transduziert wurden. Die durchschnittliche MACC1-Expression der mit MACC1-GFP transduzierten Zellen beträgt das 5277,03-fache der zu Kontrollzwecken mit GFP transduzierten MDA-MB-231 Zellen (Abb. 33). Auch im Western Blot der entsprechenden Zellen ist eine stark gesteigerte Expression des Gens MACC1 in Form der kräftigen Bande bei 134 kDa, was der Größe von MACC1GFP

entspricht, für die MACC1-GFP-transduzierten MDA-MB-231 nachweisbar (siehe Abb. 34).

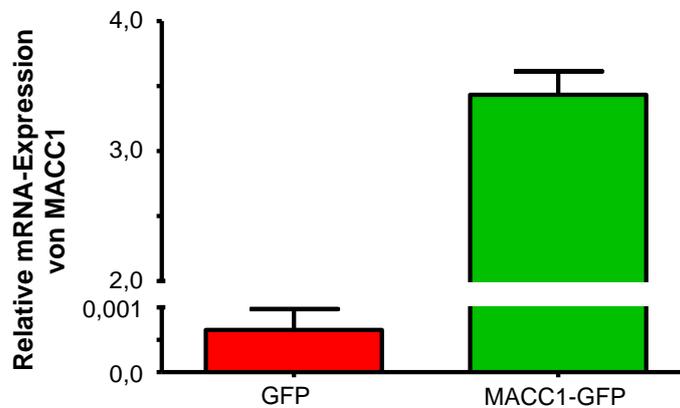


Abbildung 33: MDA-MB-231 lentiviral transduziert. Messung der MACC1-mRNA-Expression der transfizierten MDA-MB-231-Zellen mittels qRT-PCR: Dargestellt sind Mittelwerte (n=2) und die zugehörigen Standardabweichungen. Die Normalisierungsberechnungen erfolgten mit dem Housekeeping Gene Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) (GFP=Green Fluorescent Protein/Kontrolle, MACC1-GFP=MACC1 mit GFP gekoppelt)



Abbildung 34: Zur Bestimmung der Expression von MACC1 auf Proteinebene der mit MACC1 transduzierten MDA-MB-231-Zellen wurden Western-Blots durchgeführt. Als Ladekontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) eingesetzt. (GFP= nach Transduktion mit ausschließlich Green Fluorescent Protein/Kontrolle, MACC1-GFP= nach Transduktion mittels MACC1 mit GFP gekoppelt)

Das in der Impedanz-basierten Zellanalytik untersuchte Migrationsverhalten der mit MACC1-Vektor oder Leervektor transduzierten MDA-MB-231 Zellen ist nachfolgend als Kurven dargestellt, wobei der grüne Graph den Zellen entspricht, die durch Transfektion mit MACC1-Vektor mit einer MACC1-Erhöhung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene reagierten, während der rote Graph der Kontrollgruppe ohne MACC1-Steigerung entspricht. Für die MACC1-transduzierten MDA-MB-231 lässt sich eine vermehrte Migration im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Überexpression nachweisen (siehe Abb. 35). Die daraus errechneten AUC-Werte zeigen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,0480$ eine höhere Migrationsleistung der MACC1-exprimierenden MDA-MB-231 Zellen (siehe Abb. 36).

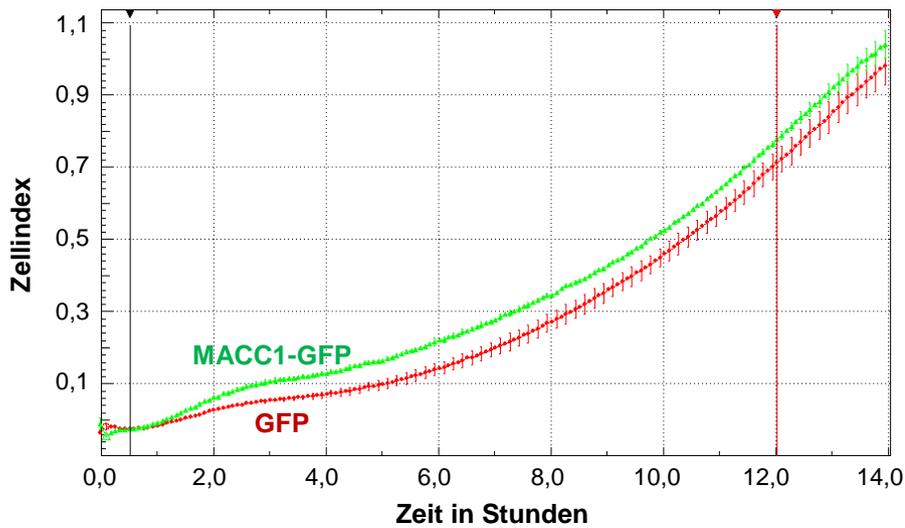


Abbildung 35: Exemplarischer Echtzeit-Migrationsassay der mit MACC1 lentiviral transduzierten MDA-MB-231-Zellen: Dargestellt sind die Mittelwertkurven aus 3 Werten und die zugehörigen Standardabweichungen. Zum Zeitpunkt von 30 Minuten wurden die Kurven normalisiert. Zudem wurde jeweils die Kurve des Mediums DMEM subtrahiert.

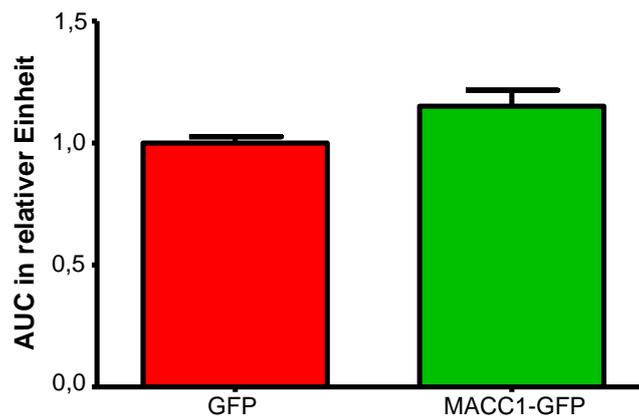


Abbildung 36: MDA-MB-231 lentiviral transduziert. Berechnete Flächen unterhalb der oben dargestellten Migrationskurven der mit MACC1 lentiviral transduzierten MDA-MB-231-Zellen zwischen 30 Minuten und 12 Stunden (GFP=Green Fluorescent Protein/Kontrolle, MACC1-GFP=MACC1 mit GFP gekoppelt); n=2; p=0,0480

4 Diskussion

Das Mammakarzinom ist sowohl in Deutschland als auch weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Die aktuellen Therapiemöglichkeiten umfassen die chirurgische Resektion, die Strahlen- und Chemotherapie sowie endokrine Therapien. Die Gruppe der Mammakarzinome ist jedoch sehr heterogen und individuellere Therapiekonzepte wären wünschenswert. Im Krankheitsverlauf des Mammakarzinoms entwickeln 20-40% der Patientinnen Metastasen, was eine deutliche Verschlechterung der Prognose mit sich bringt.⁸⁰ Deshalb sind die molekularen Prozesse, welche für die Metastasenentstehung verantwortlich sind, von großem Interesse.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des Metastasierungsgens MACC1 für das Mammakarzinom untersucht. Für verschiedene Tumorentitäten, allen voran das Kolonkarzinom, wurde eine metastasierungsfördernde Wirkung von MACC1 festgestellt und eine Korrelation zwischen hoher MACC1-Expression im Primärtumor und einer schlechteren Prognose bezüglich metastasenfreiem Überleben und Gesamtüberleben ermittelt.

Mittels Immunhistochemie und qRT-PCR wurde die MACC1-Expression von 170 primären Mammakarzinomen quantifiziert und mit verschiedenen klinischen Parametern sowie dem metastasenfreien Überleben und dem Gesamtüberleben auf Korrelationen überprüft. Zudem wurde mittels In-vitro-Experimenten der Einfluss von MACC1 auf das Migrationsverhalten der Mammakarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 untersucht.

4.1 Der prognostische Wert von MACC1

Bei Mammakarzinompatienten spielen Analysen der Genexpression mittels PCR und Microarrays in der Routinediagnostik bisher keine Rolle, da sie als prognostische Marker oder als Indikator für Therapieempfehlungen derzeit noch nicht genügend validiert sind.^{207,208}

Die für die klinische Studie ausgewählte Kohorte ist dahingehend repräsentativ für die Gesamtheit aller Mammakarzinome, dass die Verteilungen von histologischen Typen, Hormonrezeptor-Status und HER2-Status der ungefähren Verteilung aller

Mammakarzinome in Deutschland entspricht. Die Patientenkohorte entstammt dem qualitativ hochwertigen sogenannten METAcancer-Kollektiv, einem EU-geförderten Forschungsprojekt zur Suche nach Biomarkern für das Mammakarzinom durch Untersuchung des Metaboloms. Für das METAcancer-Projekt wurden zur Erstellung metabolischer Profile die analytischen Methoden Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS), Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) und die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) eingesetzt. Zusätzliche zentrale Methoden des Projektes bestanden im Proteinnachweis in TMAs mittels IHC und RNA-Nachweis in FFPE-Gewebe mittels qRT-PCR.¹⁹⁸ Es zeigten sich zahlreiche metabolische Auffälligkeiten in Tumorzellen, welche in physiologischen Geweben nicht gefunden wurden. Beispielsweise stellte sich heraus, dass die Phospholipidsynthese der Membranen mit der Progression des Mammakarzinoms zusammenhängt. Zwischen 467 detektierten Metaboliten konnten 19 Signalwege identifiziert werden.¹⁹⁸ Die gesamtheitliche Betrachtung der Stoffwechselforgänge in Tumorzellen hat großes Potenzial die Entdeckung neuer Biomarker und Therapieziele zu ermöglichen.

Die vollautomatisierte RNA-Extraktion mittels Roboter, welche auch bei der RNA-Gewinnung aus FFPE der METAcancer-Proben zum Einsatz kam, stellte sich im direkten Vergleich mit halb-automatisierter und manueller RNA-Extraktion als Methode mit der besten Reproduzierbarkeit und dem geringsten Zeitaufwand heraus.²⁰⁹

Die Expression des Metastasierungsgens MACC1 in immunhistochemischen Analysen ergab ein signifikant geringeres Risiko Metastasen zu entwickeln bei den Patienten, deren Primärtumoren niedrige MACC1-Spiegel aufwiesen. Dies bestätigte sich ebenfalls in verschiedenen Subgruppenanalysen. Somit kann vermutet werden, dass MACC1 als prognostischer Marker für das MFS verschiedener Mammakarzinome angewendet werden kann.

Im Rahmen dieser Studie zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse für den Stellenwert von MACC1 für das Gesamtüberleben von Mammakarzinompatienten. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass im Todesfall die Todesursache unberücksichtigt blieb, da eine Assoziation zum Mammakarzinom nie sicher auszuschließen ist und die Todesursache nicht in allen Fällen zu ermitteln war. Bei der vorliegenden sehr geringen Anzahl von Todesfällen kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass die aus anderen Gründen verstorbenen Patienten in den Gruppen „hohes MACC1“ und „niedriges MACC1“ gleichverteilt sind. Mithilfe einer größeren Kohorte mit entsprechend

höheren Fallzahlen tödlicher Ausgänge könnte überprüft werden, wie valide MACC1 das Gesamtüberleben prognostizieren kann.

Zu Beginn dieser Dissertation gab es keinerlei Studien zur Bedeutung von MACC1 für das Mammakarzinom. Zwischenzeitlich wurden allerdings zwei Studien veröffentlicht, welche die Bedeutung von MACC1 in Mammakarzinomen untersuchen:

Huang et al. untersuchten erst kürzlich die MACC1-Expression in Mammakarzinomen und deren Korrelation mit klinischen sowie prognostischen Parametern.¹⁷⁴ Nachweis und Quantifizierung der MACC1-Expression erfolgten mittels IHC und Western Blot, also ausschließlich mit Methoden, welche die Expression auf Proteinebene nachweisen. In unserer Studie hingegen wurde die MACC1-Expression sowohl auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR als auch auf Proteinebene mittels IHC detektiert. Erstaunlicherweise wird in der Studie von Huang et al. ein signifikanter Zusammenhang von MACC1 mit dem T-Stadium und dem Nodalstatus beschrieben, während in unserer Studie die MACC1-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene mit keinem der beiden korreliert. Sowohl in dem Paper von Huang et al. als auch in unserer Studie stellte sich die MACC1-Expression als signifikanter prognostischer Marker für das metastasenfremde Überleben heraus, wobei für diese Fragestellung die Kohorten beider Studien nur Patienten berücksichtigten, bei denen zum Zeitpunkt der Diagnose keine Fernmetastasen bekannt waren. In der Veröffentlichung von Huang et al. weisen die Patienten mit niedrigeren MACC1-Spiegeln im Primärtumor zudem signifikant bessere Gesamtüberlebensraten auf als die mit hohem MACC1 im Primärtumor. Dieser Trend zeigte sich in unserer Untersuchung auch, jedoch ergaben sich keine signifikanten Testergebnisse diesbezüglich. Huang et al. führten im Gegensatz zu uns keinerlei In-vitro-Versuche zum Einfluss von MACC1 auf das Verhalten von Mammakarzinomzellen durch.

Muendlein et al. untersuchten die klinische Relevanz verschiedener MACC1-SNPs ausschließlich für HER2-positive Mammakarzinome. Zur Genotypisierung nutzen sie ein Real-Time-PCR-System, welches dem aus unseren Versuchen ähnelt. Eine Methode zum Nachweis von MACC1 auf Proteinebene kam bei Muendlein et al. nicht zum Einsatz. Entscheidend für die Einteilung der Patienten waren nachgewiesene SNPs im Bereich von MACC1, jedoch erfolgte keine Quantifizierung im Sinne einer Zuordnung zu hohen oder niedrigen MACC1-Leveln wie in unserer Studie. Insbesondere für den SNP rs1990172, welche im Bereich des Introns 2 von MACC1 liegt, wiesen Muendlein et al. einen signifikanten prognostischen Wert für das Gesamtüberleben der

Mammakarzinompatienten nach. Zudem schlussfolgerten sie, dass der SNP rs975263 aufgrund seiner Ähnlichkeit mit rs1990172 ebenfalls über eine prognostische Aussagekraft für die Prognose von Mammakarzinomen verfügt.²¹⁰ Ferner beschrieben Muendlein et al. gemäß ihrer In-silico-Analysen einen möglicherweise protektiven Effekt von rs3735615 bezüglich des Überlebens der Mammakarzinompatienten, da er eine Proteinstrukturstörung verursachen sowie einen Funktionsverlust von MACC1 induzieren könnte.²¹⁰ Daraus könnte eine herabgesetzte Met-Transkriptionsrate resultieren, was zu einer geringeren Metastasierungsrate führen würde.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation zeigte sich der prognostische Wert von MACC1 für das MFS sowohl bei HER2-positiven als auch bei HER2-negativen Mammakarzinomen, jedoch empfiehlt sich die Validierung dieses Sachverhaltes mit einer größeren Kohorte. Insbesondere die HER2-negativen Patienten können nicht von den effektiven HER2-Inhibitoren profitieren und sind deshalb umso mehr auf zusätzliche Therapiemöglichkeiten angewiesen, wobei sich MACC1 als mögliches Therapieziel erweisen könnte. Muendlein et al. publizierten ebenfalls keine funktionellen In-vitro-Versuche zum Effekt von MACC1 in Mammakarzinomzellen.²¹⁰

Bezüglich der MACC1-Quantifizierung aus den Mammakarzinomgeweben fielen bei der Auswertung und Einteilung der Werte aus IHC und qRT-PCR in die Gruppen „low MACC1“ und „high MACC1“ in einigen Fällen Unterschiede der Gruppenzuordnung zwischen den beiden Messmethoden auf. Für eine unterschiedlich hohe Gesamtmenge eines Gens bzw. Proteins auf RNA- und Proteinebene in demselben Tumorgewebe sind mehrere Erklärungsansätze in Erwägung zu ziehen: Es können ko- oder posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Hydroxylierung, Methylierung oder Acetylierung erfolgt sein, welche die Proteinstabilität beeinflussen können, woraus möglicherweise variierende Proteinmengen resultieren.²¹¹ Es sind bereits mehrere miRNAs bekannt, die MACC1 posttranskriptional regulieren: Migliore et al. zeigten, dass die Herabregulation der miRNA miR-1 mit einer Steigerung der MACC1-Expression einhergeht und zu einer Met-Überexpression führt.¹⁶² Für kolorektale Karzinome weist die miRNA miR-143 sogar einen umgekehrten Zusammenhang mit der MACC1-Expression auf und ist in der Lage, Zellinvasion und -migration zu reduzieren.¹⁶³

Zudem könnte während der Translation ein Ungleichgewicht an verfügbaren Ribosomen, transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA) und Aminosäuren aufgetreten sein. Ferner ist bekannt, dass zeitweise Verzögerungen der Translation einer fertiggestellten

mRNA auftreten können, sodass diese in einigen Fällen im Zytoplasma noch vor der Translation abgebaut wird.²¹³ Zusätzlich ist zu bedenken, dass Proteine über stark variierende Halbwertszeiten und Degradationsmechanismen verfügen.²¹⁴ Bei den FFPE-Proben entstanden möglicherweise durch Formalinfixation, während des Extraktionsprozesses oder auch durch jahrelange Tiefkühlung geringe Abweichungen der Qualität des Ausgangsmaterials. Jedoch weisen formalinfixierte Gewebe im Vergleich zu anderen Fixationen, beispielsweise mittels Azeton oder „RNAlater“ der Firma SIGMA, nach Extraktion die deutlich besterhaltene RNA auf.²¹⁵ Als möglicher Störfaktor der Immunhistochemie sind Artefakte durch Staining zu bedenken, was in einigen Fällen zu einem höheren IRS führen könnte. Die Auswertung der IHC ist stark abhängig von der Beurteilung durch den Pathologen. Die qRT-PCR hingegen läuft standardisiert ab, jedoch können auch hier in der Vorbereitung verschiedene Einflussfaktoren, wie beispielsweise manuelle Pipettierabweichungen, von Bedeutung sein.

Wir setzten zur Auswertung der qRT-PCR-Werte Housekeeping-Gene, welche auch Referenzgene genannt werden, ein, um effektiv unterschiedliche cDNA-Konzentrationen auszugleichen. Auch in den MIQE-Richtlinien wird der Einsatz von Referenzgenen als anerkannt, üblich und empfehlenswert beschrieben.²¹⁶ Für die IHC ist keine vergleichbare Möglichkeit zur Normalisierung bekannt.

Zudem erlaubt die IHC genauere Aussagen über die Quantität des exprimierten und aktuell vorliegenden Proteins MACC1, während die mittels qRT-PCR nachgewiesene mRNA einen ungefähren Anhalt gibt, wieviel des Proteins letztendlich gebildet werden könnte, ohne die Translationseinflüsse berücksichtigen zu können.

Mithilfe der ROC-Methode ließ sich jeweils der Trennwert mit dem besten Verhältnis aus Sensitivität und Spezifität ermitteln.²¹⁷ Durch die ROC-Kurven-basierte Ermittlung der Cutoffs haben sich Gruppen unterschiedlich großer Anzahl ergeben. Da für die qRT-PCR-Werte für unterschiedliche Fragestellungen leicht abweichende Cutoffs berechnet wurden, wären erneute Versuche mit größerer Kohorte zur Präzisierung eines effektiven Cutoffs ratsam.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sowohl die qRT-PCR als auch die IHC bestimmten Einflussfaktoren unterliegen. Für einen klinischen Einsatz von MACC1 als prognostischen Marker beim Mammakarzinom würde sich die immunhistochemische Bestimmung jedoch eindeutig besser eignen, da sie einerseits in der vorliegenden Studie aussagekräftigere Prognosen bezüglich des MFS zuließ und andererseits besser

in die Routinediagnostik integriert werden könnte. So könnte eine immunhistochemische Untersuchung der MACC1-Expression von Mammakarzinomgewebe parallel zu den Hormonrezeptor- und HER2- Nachweisen, welche im aktuellen Klinikalltag routinediagnostisch per IHC durchgeführt werden, erfolgen.^{218,219}

Neben der Prognoseverbesserung für Mammakarzinompatienten steht auch die Verbesserung der Lebensqualität im Fokus. So erhalten Mammakarzinompatienten oftmals starke Chemotherapeutika, welche Nebenwirkungen wie z. B. Übelkeit und Erbrechen, Erschöpfung, Haarausfall, kognitive Störungen, Organschäden und Blutbildveränderungen wie Anämien hervorrufen, obwohl keine Metastasierung erfolgt ist bzw. erfolgt wäre. Ebenso führt die häufig bei Mammakarzinomen eingesetzte Strahlentherapie zu unerwünschten Wirkungen wie Schäden an Schleimhaut und Knochenmark sowie Spätfolgen wie beispielsweise Organ- und Bindegewebsfibrosierung, Strahlennekrosen und Xerostomie. Zudem besitzen sowohl die Chemo- als auch die Strahlentherapie selbst karzinogenes Potential.^{220,221}

Derzeit mangelt es an zuverlässigen Biomarkern und Prognosefaktoren, die eine Identifizierung von Patienten mit niedrigem Risiko zulässt, welche dann von einer weniger intensiven Therapie profitieren könnten. Analog könnten als Hochrisiko-Patienten identifizierte Betroffene gegebenenfalls von einer zusätzlichen/intensiveren Therapie durch bessere Überlebensraten profitieren.

4.2 Migrationsfördernde Wirkung von MACC1

Um eine MACC1-Überexpression in Mammakarzinomzellen zu induzieren, wurden sowohl transiente Transfektionen als auch lentivirale Gentransfers durchgeführt.

Dafür wurden die Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 mit niedrigen endogenen MACC1-Expressionsleveln ausgewählt, durch die sie als gut für die Generierung einer Überexpression geeignet erschienen. Es handelt sich um zwei unterschiedlich charakterisierte Zelllinien: Die Zelllinie MCF-7 ist Östrogen- und Progesteronrezeptor-positiv und HER2-negativ, während es sich bei MDA-MB-231 um eine triple-negative Zelllinie handelt.²⁰¹

Die erfolgreiche Transfektion bzw. Transduktion wurde jeweils mittels qRT-PCR und Western Blot untersucht. Dann wurden die Migrationsverhalten der jeweils überexprimierenden Zellen und der Kontrollgruppe mittels Impedanz-basierter Zellanalytik verglichen.

Für die transient mit MACC1 transfizierten MCF-7 war in der qRT-PCR eine vierfache Erhöhung der MACC1-Expression im Vergleich zur mit Leervektor transfizierten Kontrollgruppe nachweisbar. Die AUC-Berechnung aus den Migrationskurven dieser beiden Zellgruppen ergab eine signifikant höhere Migration der transient MACC1-transfizierten MCF-7 Zellen gegenüber den MCF-7 Zellen ohne Überexpression.

Die erfolgreiche lentivirale Transduktion zeigte sich sowohl im Western Blot als auch in der qRT-PCR, in der sie die 37-fache Menge an MACC1-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies. In der Impedanz-basierten Zellanalytik stellte sich eine erhöhte Migrationsrate der MACC1-GFP-transduzierten MCF-7 Zellen dar, der mit einem Stichprobenumfang von zwei unabhängigen Experimenten jedoch keine Signifikanz erreichen konnte.

Im Rahmen der transienten Transfektion der Zelllinie MDA-MB-231 mit MACC1 ergab sich nach der qRT-PCR sogar eine 383-fache MACC1 mRNA-Menge der MACC1-transfizierten Zellen im Vergleich zu der mit Leervektor transfizierten Kontrollgruppe. Diese nachweislich MACC1-überexprimierenden MDA-MB-231 Zellen zeigten in der Impedanz-basierten Zellanalytik den Trend einer leicht vermehrten Migration.

Die lentiviral mit MACC1-GFP transduzierten MDA-MB-231-Zellen verfügten erstaunlicherweise über die 5277-fache MACC1-mRNA-Menge der Kontrollgruppe, welche lediglich mit GFP transduziert wurde. Das Migrationsverhalten der MACC1-GFP überexprimierenden MDA-MB-231 lag signifikant höher als das der Kontrollgruppe.

Hierbei fällt auf, dass die Überexpressionsnachweise mittels qRT-PCR innerhalb einer Zelllinie bei lentiviraler Transduktion deutlich höhere Werte ergaben als bei der transienten Transduktion. Außerdem zeigte die Zelllinie MDA-MB-231 sowohl bei der Transfektion als auch bei der Transduktion um ein Vielfaches höhere Werte als die MCF-7 Zellen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die transient MACC1-transfizierte Zelllinie MCF 7 mit der vergleichsweise niedrigen Überexpressionsrate vom Faktor 4,13 auf mRNA-Ebene in der Impedanz-basierten Zellanalytik den deutlichsten Migrationsanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe aufwies.

Da in allen vier Konstellationen der in vitro Versuche die Zellen mit induzierter MACC1-Überexpression eine gesteigerte Migration zeigten, liegt eine migrationsfördernde

Wirkung von MACC1 in Mammakarzinomzellen nahe. Sowohl in der exemplarischen Hormonrezeptor positiven als auch in der Hormonrezeptor negativen Zelllinie zeigte sich dieser Effekt. Aus Studien zur Rolle von MACC1 im Kolonkarzinom ist bekannt, dass Met ein bedeutendes Transkriptionsziel von MACC1 ist.¹³⁹ Der HGF/Met-Signalweg reguliert das Zellwachstum.¹⁴⁴ Auch in Mammakarzinomen wurde eine erhöhte HGF-Expression im Tumorstroma durch Ma et al. festgestellt. Casbas-Hernandez et al. beschreiben sogar eine mögliche Beteiligung des HGF/Met-Signalweges an der Umwandlung benigner Läsionen zu In-situ-Karzinomen der Mamma.⁴¹ Vermutlich wird die migrationsfördernde Wirkung von MACC1 in den Mammakarzinomzellen auch durch den HGF/Met-Signalweg mitgetragen.

Dieser migrationsfördernde Effekt bei Mammakarzinomen ist ein weiterer wichtiger Punkt, MACC1 in der Zukunft als mögliches Therapieziel zu untersuchen.

Um den migrationsfördernden Effekt auf die Gesamtheit der Mammakarzinome schlussfolgern zu können, bedarf es Versuchen mit weiteren Mammakarzinomzelllinien, insbesondere auch mit HER2-positiven Zelllinien und weiteren Untergruppen. Für In-vitro-Versuche wären zum Beispiel die gut erprobten und praktikablen HER2-exprimierenden Mammakarzinomzelllinien SK-BR-3 und BT-474 sehr gut geeignet.²²²

Zudem könnten die bereits durchgeführten In-vitro-Versuche mit größerem Stichprobenumfang wiederholt werden, um den durch MACC1 induzierten Effekt besser validieren zu können.

Außerdem ist die Planung weiterer funktioneller Assays, beispielsweise mittels Impedanz-basierter Zellanalytik, mit Mammakarzinomzellen zu empfehlen. So ist für die metastasierungsfördernde Wirkung von MACC1 insbesondere noch das Invasionsverhalten der MACC1-überexprimierenden Zellen von Interesse.²²³ Derartige weiterführende Versuche zum Invasionsverhalten könnten ebenfalls gut mit den von uns bereits für die Migrationsassays eingesetzten Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 durchgeführt werden.²²⁴ Ein sogenannter „Wound Healing Assay“ könnte zusätzliche Erkenntnisse zur Migration und Proliferation erbringen. In Kolonkarzinom-Zelllinien gelang bereits der Nachweis, dass MACC1 die Migration, Invasion, Proliferation und Kolonieformation fördert.¹³⁹

4.3 Ausblick

Andere Faktoren, die mit MACC1 interagieren bzw. in Verbindung stehen, sind z.B. Met und sein Ligand HGF. Ihre Tumorgenese- und metastasenfördernde Wirkung beim Mammakarzinom wurde bereits in Studien mehrerer Autoren beschrieben.^{41,225,226} Es wurden bereits Phase-III-Studien zur Inhibition der Ligandenbindung und der Rezeptoraktivierung von HGF und Met durchgeführt mit dem Ziel neue Therapiemöglichkeiten für verschiedene humane Karzinome zu schaffen.^{227,228} Da MACC1 die Transkription von Met reguliert, wäre die Planung komplexerer Versuche sinnvoll, in denen die Interaktion von MACC1, Met und HGF im Mammakarzinom und mögliche Einflussmöglichkeiten untersucht werden. Zudem sind Wechselwirkungen zwischen MACC1 und weiteren Genen und Signalwegen interessant.

Die Interaktion von MACC1 mit dem Akt/ β -Catenin-Signalweg und Met wies unter anderem bei Osteosarkomen und Nasopharynxkarzinomen einen deutlichen Zusammenhang auf und beeinflusste die Apoptoserate stark.^{194,195} Da der Akt/ β -Catenin-Signalweg auch an der Pathogenese von Mammakarzinomen beteiligt zu sein scheint, wären analoge Untersuchungen mit Mammakarzinomzellen interessant.²²⁹

Juneja et al. gelang es, die Sequenz des Promoters, welcher MACC1 transkriptional reguliert, für kolorektale Karzinomzellen zu ermitteln.¹⁶¹ Im Bereich dieses Promoters befinden sich Sequenzmotive mit Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1, Sp1 und C/EBP und Mutationen dieser Bindungsstellen führten zu einer deutlich herabgesetzten Funktion des MACC1-Promoters.¹⁶¹ Die Regulation des MACC1-Promoters im Mammakarzinom und mögliche resultierende Effekte auf die Transkription von MACC1 wurden bisher noch nicht untersucht. Auch zur posttranskriptionellen Modifikation von MACC1 im Mammakarzinom, beispielsweise durch miRNA, gibt es derzeit noch keine Untersuchungen. Wie bereits im Voraus beschrieben, ist für Kolonkarzinome eine Interaktion sowohl von miR-1 als auch von miR-143 mit MACC1 nachgewiesen.^{162,163}

Es könnten weitere strukturelle Ansatzpunkte gesucht werden, deren Fehlen oder Fehlerhaftigkeit zu einer Funktionsstörung von MACC1 führen, analog zu den bereits durchgeführten Untersuchungen bei fehlender SH3-Domäne mit weniger Met-Transkription und herabgesetzter Migration und Proliferation.¹³⁹

Auch die Beeinflussung von Apoptosevorgängen durch MACC1, welche aufgrund der Verbindung der SH3-Domäne von MACC1 und dem prolinreichen Motiv von CD178 (FasL) beschrieben wird, ist ein interessanter Ansatzpunkt weiterer Forschung für MACC1 im Allgemeinen und auch speziell im Mammakarzinom.¹⁵⁵

MACC1 wurde bereits als Aktivator und Zielgen der MAPK, welche für die HGF-induzierte Metastasierung unerlässlich ist, zugleich beschrieben.^{139,150} Gong et al. beschreiben, dass eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs in Mammakarzinomzellen die Proliferation und Migration fördert.²³⁰ Zur Untersuchung der Interaktion von MACC1 mit dem MAPK-Signalweg im Mammakarzinom könnten zusätzliche In-vitro-Versuche mit Mammakarzinomzellen geplant werden.

Nach der Durchführung weiterer In-vitro-Versuche zur funktionellen Rolle von MACC1 im Mammakarzinom sind auch In-vivo-Experimente denkbar, bei denen überprüft werden könnte, ob in Mäuse implantierte Mammakarzinomzellen mit exogen generierter MACC1-Überexpression eine erhöhte Tumorprogression und vermehrte Metastasenbildung aufweisen und ob diesem Effekten beispielsweise mit sh-RNA entgegengewirkt werden kann, wie es bereits für Kolonkarzinomzellen gezeigt wurde.^{139,167}

Analog zu den Versuchen von Gao et al., die mithilfe von shRNA MACC1 in HCC-Zellen herabregulierten, könnte man auch bei Mammakarzinomzellen untersuchen, ob eine derart generierte MACC1-Senkung die Migration und Invasion mindert und ob ebenfalls die Expression der Gene Met, MMP2 und MMP9 abnimmt, was die Vermutung bekräftigen würde, dass MACC1 diese Gene reguliert.¹⁷⁸ Es wurden bereits mehrfach MMP-Überexpressionen in Mammakarzinomgewebe, eine durch MMPs induzierte Metastasierung und Invasion von Mammakarzinomzellen sowie die durch MMPs hervorgerufene epithelial-mesenchymale Transition beim Mammakarzinom beschrieben.²³¹ In Lebermetastasen zeigte sich bereits ein Zusammenhang von hohen MACC1-Spiegeln mit starker epithelial-mesenchymaler Transition.¹⁶⁹ Auch im Magenkarzinom fiel eine Korrelation zwischen der Menge an MACC1-mRNA und Markern der epithelial-mesenchymalen Transition auf.¹⁸³

Da bereits ein prognostischer Wert von MACC1 auch bei Lebermetastasen-therapierten Kolonkarzinompatienten nachgewiesen wurde, ist eine ähnliche klinische Studie ebenfalls für die Prognose der Rezidivwahrscheinlichkeit nach Therapie von Metastasen bei Mammakarzinomen sinnvoll.¹⁶⁸

Des Weiteren könnte in einer klinischen Studie überprüft werden, ob MACC1 beim Mammakarzinom einen derart prognostischen Wert für den Therapieerfolg von Radiochemotherapien hat, wie es sich beim Rektumkarzinom herausstellte.¹⁷⁰

Interessant wäre auch die Planung einer Studie zur Rolle von MACC1 in prämaligen Mammaläsionen und präinvasiven malignen Mammaläsionen, denn für Kolonadenome scheint MACC1 ein aussagekräftiger Biomarker zur Einteilung in hoch- und geringgradig dysplastische Adenome zu sein.¹⁷³

Außerdem könnte man entsprechend der Studie zu MACC1 im Pankreaskarzinom auch beim Mammakarzinom untersuchen, ob eine in vitro durch siRNA generierte Inhibierung von MACC1 einen Rückgang von Zellproliferation und -migration sowie eine höhere Sensitivität für Chemotherapeutika mit sich bringt.¹⁸⁵

Seit 2004 wird das Mammographie-Screening für 50- bis 69-jährige Frauen flächendeckend in Deutschland etabliert.²³² Eine Verbesserung der bildgebenden Diagnostik und sekundären Präventionsstrategien dahingehend, dass Mammatumoren spätestens bei einem Durchmesser von 2,7 mm detektiert werden würden, würde laut Coumans et al. eine Reduktion des Risikos der Fernmetastasenbildung auf 1% ermöglichen.²³³ Denkbar wäre eine zur Mammographie zusätzliche Blutserum-Untersuchung auf MACC1 und andere Marker, um dadurch gegebenenfalls die Detektionsrate kleiner Mammakarzinome in Frühstadien zu verbessern. Vorab sollte quantifiziert werden, wieviel MACC1 Mammakarzinome in Frühstadien oder auch Vorstufen wie DCIS exprimieren und ob dies im Serum nachgewiesen werden kann. Für kolorektale Karzinome wurde bereits ein Test entwickelt den MACC1-Spiegel im Blutserum zu messen, welcher aussagekräftig für die Prognose und das Metastasierungsverhalten ist.¹⁴² Auch für das Pankreaskarzinom entwickelten Stein et al. bereits einen vergleichbaren Blutserum-Test.²³⁴ Weitere Vorteile eines zuverlässigen Tests für MACC1 im Serum könnten sowohl die Prognosestellung ohne aufwendige Tests mit Tumormaterial als auch die Verlaufskontrollen mittels Serum-MACC1 sein, z.B. als sensitivitätserhöhende Ergänzung zu den klinisch bereits eingesetzten Tumormarkern.

Das Metastasierungsgen MACC1 ist sowohl als künftiger prognostischer Marker für Mammakarzinome als auch als vielversprechendes neues molekularbiologisches Therapieziel der Zukunft von großem Interesse.

Weiterführende molekularbiologische Untersuchungen von MACC1 bezüglich des tumorprogressiven Verhaltens und Pathomechanismus in den verschiedenen

Mammakarzinomtypen, insbesondere mit unterschiedlichem Hormonrezeptorstatus und HER2-Status, sind von großem Interesse, da sich die grundlegenden Pathomechanismen in diesen Typen unterscheiden.^{61,63,66,68,73} Mit daraus gewonnenen Erkenntnissen könnte man gegebenenfalls die im Klinikalltag etablierte Diagnostik und Therapie erweitern. MACC1 hat insbesondere großes Potential zur Identifizierung von Hochrisikopatienten für die Entwicklung von Metastasen im Krankheitsverlauf. Zusätzlich bietet MACC1 als mögliches direktes Therapieziel der Zukunft eine vielversprechende Perspektive. Es könnte möglich werden, umfassende und gezielte Therapiemechanismen zu entwickeln, mit denen die Reduktion oder der Verzicht auf Chemotherapie und Radiatio realisierbar wird. Da die Expression zuverlässig mit der IHC untersucht werden kann, wäre der Einzug in die Routinediagnostik von Mammakarzinomen gut durchführbar.

5 Literaturverzeichnis

1. WHO | Breast cancer: prevention and control. (2013). at <http://www.who.int/cancer/detection/breastcancer/en/index2.html>
2. Robert-Koch-Institut. *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin.* (2010).
3. Coleman, M. P. *et al.* Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* **9**, 730–56 (2008).
4. Lanitis, S. *et al.* Diagnosis and management of male breast cancer. *World J. Surg.* **32**, 2471–6 (2008).
5. Johansen Taber, K. A., Morisy, L. R., Osbahr, A. J. & Dickinson, B. D. Male breast cancer: Risk factors, diagnosis, and management (Review). *Oncol. Rep.* **24**, 1115–1120 (2010).
6. Gathani, T. *et al.* Ethnic differences in breast cancer incidence in England are due to differences in known risk factors for the disease: prospective study. *Br. J. Cancer* (2013). doi:10.1038/bjc.2013.632
7. Chen, Y., Thompson, W., Semenciw, R. & Mao, Y. Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **8**, 855–61 (1999).
8. Adaniel, C. & Kirchhoff, T. Introduction to epidemiology of breast and ovarian cancers. *Ann. Oncol.* **24 Suppl 8**, viii61–viii62 (2013).
9. Stratton, M. R. & Rahman, N. The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nat. Genet.* **40**, 17–22 (2008).
10. Couto, E., Banks, E., Reeves, G., Pirie, K. & Beral, V. Family history and breast cancer tumour characteristics in screened women. *Int. J. Cancer* **123**, 2950–4 (2008).
11. Lacey, J. V *et al.* Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* **9**, 84 (2009).
12. Dunn, B. K., Wickerham, D. L. & Ford, L. G. Prevention of hormone-related cancers: breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 357–67 (2005).
13. Ewertz, M. *et al.* Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int. J. Cancer* **46**, 597–603 (1990).
14. Gadeyne, S., Deboosere, P., Vandenheede, H. & Neels, K. Does birth history account for educational differences in breast cancer mortality? A comparison of

- premenopausal and postmenopausal women in Belgium. *Int. J. Cancer* **131**, 2878–85 (2012).
15. González-Jiménez, E., García, P. A., Aguilar, M. J., Padilla, C. A. & Alvarez, J. Breastfeeding and the prevention of breast cancer: a retrospective review of clinical histories. *J. Clin. Nurs.* (2013). doi:10.1111/jocn.12368
 16. Bjerkaas, E. *et al.* Smoking duration before first childbirth: an emerging risk factor for breast cancer? Results from 302,865 Norwegian women. *Cancer Causes Control* **24**, 1347–56 (2013).
 17. Di Cello, F. *et al.* Cigarette smoke induces epithelial to mesenchymal transition and increases the metastatic ability of breast cancer cells. *Mol. Cancer* **12**, 90 (2013).
 18. Jaiswal, A. S. *et al.* Adenomatous polyposis coli-mediated accumulation of abasic DNA lesions lead to cigarette smoke condensate-induced neoplastic transformation of normal breast epithelial cells. *Neoplasia* **15**, 454–60 (2013).
 19. Poli, A. *et al.* Moderate alcohol use and health: a consensus document. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **23**, 487–504 (2013).
 20. Forsyth, C. B., Tang, Y., Shaikh, M., Zhang, L. & Keshavarzian, A. Alcohol stimulates activation of Snail, epidermal growth factor receptor signaling, and biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in colon and breast cancer cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **34**, 19–31 (2010).
 21. Grønbaek, M. The positive and negative health effects of alcohol- and the public health implications. *J. Intern. Med.* **265**, 407–20 (2009).
 22. Pasanisi, P. *et al.* Nutritional advice to breast cancer survivors. *Support. Care Cancer* **18 Suppl 2**, S29–33 (2010).
 23. Pasanisi, P., Bruno, E., Manoukian, S. & Berrino, F. A randomized controlled trial of diet and physical activity in BRCA mutation carriers. *Fam. Cancer* (2013). doi:10.1007/s10689-013-9691-2
 24. Irwin, M. L. *et al.* Randomized controlled trial of aerobic exercise on insulin and insulin-like growth factors in breast cancer survivors: the Yale Exercise and Survivorship study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 306–13 (2009).
 25. Ronckers, C. M., Erdmann, C. A. & Land, C. E. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. *Breast Cancer Res.* **7**, 21–32 (2005).
 26. Darbre, P. D. *et al.* Concentrations of parabens in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* **24**, 5–13
 27. Harvey, P. W. & Everett, D. J. Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in human breast tumours. *J. Appl. Toxicol.* **24**, 1–4

28. Flower, C. Observations on the paper by Darbre et al. (2204). *J. Appl. Toxicol.* **24**, 304–5; author reply 305–6; discussion 307–10
29. Golden, R. & Gandy, J. Comment on the publication by Darbre et al. (2004). *J. Appl. Toxicol.* **24**, 297–9; author reply 299–301; discussion 307–10
30. Darbre, P. D. & Harvey, P. W. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.* **28**, 561–78 (2008).
31. Kirchhof, M. G. & de Gannes, G. C. The health controversies of parabens. *Skin Therapy Lett.* **18**, 5–7 (2013).
32. Jacobi, C. E., de Bock, G. H., Siegerink, B. & van Asperen, C. J. Differences and similarities in breast cancer risk assessment models in clinical practice: which model to choose? *Breast Cancer Res. Treat.* **115**, 381–90 (2009).
33. Prado, A., Andrades, P. & Parada, F. Recent developments in the ability to predict and modify breast cancer risk. *J. Plast. Reconstr. Aesthetic Surg.* **63**, 1581–1587 (2010).
34. Hu, Z., Li, X., Feng, M., Chu, J. & Xie, W. [Models for risk assessment and prediction in breast cancer]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* **30**, 1073–7 (2009).
35. Beckmann, M. W., Niederacher, D., Schnürch, H. G., Gusterson, B. A. & Bender, H. G. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J. Mol. Med. (Berl)*. **75**, 429–39 (1997).
36. Burstein, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1652–4 (2005).
37. Dutertre, M. *et al.* Estrogen regulation and physiopathologic significance of alternative promoters in breast cancer. *Cancer Res.* **70**, 3760–70 (2010).
38. Linjawi, A., Kontogiannea, M., Halwani, F., Edwardes, M. & Meterissian, S. Prognostic significance of p53, bcl-2, and Bax expression in early breast cancer. *J. Am. Coll. Surg.* **198**, 83–90 (2004).
39. González-Sarmiento, R. & Pérez-Losada, J. Breast cancer, a stem cell disease. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **3**, 55–65 (2008).
40. Cariati, M. & Purushotham, A. D. Stem cells and breast cancer. *Histopathology* **52**, 99–107 (2008).
41. Casbas-Hernandez, P. *et al.* Role of HGF in epithelial-stromal cell interactions during progression from benign breast disease to ductal carcinoma in situ. *Breast Cancer Res.* **15**, R82 (2013).

42. Teulière, J. *et al.* Targeted activation of beta-catenin signaling in basal mammary epithelial cells affects mammary development and leads to hyperplasia. *Development* **132**, 267–77 (2005).
43. Ozbun, M. A. & Butel, J. S. Tumor suppressor p53 mutations and breast cancer: a critical analysis. *Adv. Cancer Res.* **66**, 71–141 (1995).
44. Schoppa, D. W. & Brown, E. J. Chk'ing p53-deficient breast cancers. *J. Clin. Invest.* **122**, 1202–5 (2012).
45. Masciari, S. *et al.* Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 1125–30 (2012).
46. Lane, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15–6 (1992).
47. Huang, B. *et al.* RUNX3 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting estrogen receptor α . *Oncogene* **31**, 527–34 (2012).
48. Chimge, N.-O. & Frenkel, B. The RUNX family in breast cancer: relationships with estrogen signaling. *Oncogene* **32**, 2121–30 (2013).
49. Xu, J., Chen, Y. & Olopade, O. I. MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* **1**, 629–40 (2010).
50. Corzo, C. *et al.* The MYC oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **165**, 151–6 (2006).
51. Peer, P. G., van Dijck, J. A., Hendriks, J. H., Holland, R. & Verbeek, A. L. Age-dependent growth rate of primary breast cancer. *Cancer* **71**, 3547–51 (1993).
52. Lee, A. H. S. *Why is carcinoma of the breast more frequent in the upper outer quadrant? A case series based on needle core biopsy diagnoses.* *The Breast* **14**, 151–152 (2005).
53. Sohn, V. Y., Arthurs, Z. M., Sebesta, J. A. & Brown, T. A. Primary tumor location impacts breast cancer survival. *Am. J. Surg.* **195**, 641–4 (2008).
54. Hazrah, P., Dhir, M., Gupta, S. D., Deo, V. & Parshad, R. Prognostic significance of location of the primary tumor in operable breast cancers. *Indian J. Cancer* **46**, 139–45
55. Arpino, G. Premalignant and In Situ Breast Disease: Biology and Clinical Implications. *Ann. Intern. Med.* **143**, 446 (2005).
56. Pinder, S. E. & Ellis, I. O. The diagnosis and management of pre-invasive breast disease: ductal carcinoma in situ (DCIS) and atypical ductal hyperplasia (ADH)--current definitions and classification. *Breast Cancer Res.* **5**, 254–7 (2003).

57. Mastracci, T. L., Boulos, F. I., Andrulis, I. L. & Lam, W. L. Genomics and premalignant breast lesions: clues to the development and progression of lobular breast cancer. *Breast Cancer Res.* **9**, 215 (2007).
58. Pai, K., Baliga, P. & Shrestha, B. L. E-cadherin expression: a diagnostic utility for differentiating breast carcinomas with ductal and lobular morphologies. *J. Clin. Diagn. Res.* **7**, 840–4 (2013).
59. Lakhani, S.R., Ellis, I.O., Schnitt, S.J., Tan, P.H., van de Vijver, M. J. *WHO Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition.* 240 (UNO, 2012).
60. Dawson, S. J., Provenzano, E. & Caldas, C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur. J. Cancer* **45 Suppl 1**, 27–40 (2009).
61. Levin, E. R. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol. Endocrinol.* **19**, 1951–9 (2005).
62. Giulianelli, S. *et al.* [The role of estrogen receptor alpha in breast cancer cell proliferation mediated by progestins]. *Medicina (B. Aires).* **72**, 315–20 (2012).
63. Lange, C. A. *et al.* Progesterone receptor action: translating studies in breast cancer models to clinical insights. *Adv. Exp. Med. Biol.* **630**, 94–111 (2008).
64. Lydon, J. P. & Edwards, D. P. Finally! A model for progesterone receptor action in normal human breast. *Endocrinology* **150**, 2988–90 (2009).
65. King, C. R., Kraus, M. H. & Aaronson, S. A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* **229**, 974–6 (1985).
66. Zidan, J. *et al.* Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites and its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br. J. Cancer* **93**, 552–6 (2005).
67. Pauletti, G., Godolphin, W., Press, M. F. & Slamon, D. J. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* **13**, 63–72 (1996).
68. Cuadros, M., Cano, C., López, F. J., López-Castro, R. & Concha, A. Expression profiling of breast tumors based on human epidermal growth factor receptor 2 status defines migration-related genes. *Pathobiology* **80**, 32–40 (2013).
69. Hudis, C. A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* **357**, 39–51 (2007).
70. Olayioye, M. A. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* **3**, 385–9 (2001).
71. Irvin, W. J. & Carey, L. A. What is triple-negative breast cancer? *Eur. J. Cancer* **44**, 2799–2805 (2008).

72. Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A. & Caggiano, V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* **109**, 1721–8 (2007).
73. Brouckaert, O., Wildiers, H., Floris, G. & Neven, P. Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *Int. J. Womens. Health* **4**, 511–20 (2012).
74. Kassam, F. *et al.* Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. *Clin. Breast Cancer* **9**, 29–33 (2009).
75. Fidler, I. J. & Kripke, M. L. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* **197**, 893–5 (1977).
76. Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. & Golub, T. R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat. Genet.* **33**, 49–54 (2003).
77. Polyak, K. Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* **117**, 3155–63 (2007).
78. Meredith, J. E., Fazeli, B. & Schwartz, M. A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* **4**, 953–61 (1993).
79. Hölzel, D., Eckel, R., Emeny, R. T. & Engel, J. Distant metastases do not metastasize. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 737–50 (2010).
80. Edwards, M. J., Gamel, J. W. & Feuer, E. J. Improvement in the prognosis of breast cancer from 1965 to 1984. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1030–5 (1998).
81. Ran, S., Volk, L., Hall, K. & Flister, M. J. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology* **17**, 229–51 (2010).
82. Alitalo, K. & Carmeliet, P. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* **1**, 219–27 (2002).
83. Nathanson, S. D. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* **98**, 413–23 (2003).
84. Veronesi, U. *et al.* Distribution of axillary node metastases by level of invasion. An analysis of 539 cases. *Cancer* **59**, 682–7 (1987).
85. Manders, K. *et al.* Clinical management of women with metastatic breast cancer: a descriptive study according to age group. *BMC Cancer* **6**, 179 (2006).
86. Ferrara, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 795–803 (2002).

87. Hall, K. & Ran, S. Regulation of tumor angiogenesis by the local environment. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **15**, 195–212 (2010).
88. Belperio, J. A. *et al.* CXC chemokines in angiogenesis. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 1–8 (2000).
89. Strieter, R. M. *et al.* The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **270**, 27348–57 (1995).
90. Kelly, T. *et al.* Expression of heparanase by primary breast tumors promotes bone resorption in the absence of detectable bone metastases. *Cancer Res.* **65**, 5778–84 (2005).
91. Bendre, M., Gaddy, D., Nicholas, R. W. & Suva, L. J. Breast cancer metastasis to bone: it is not all about PTHrP. *Clin. Orthop. Relat. Res.* S39–45 (2003). doi:10.1097/01.blo.0000093844.72468.f4
92. Tabariès, S. *et al.* Claudin-2 promotes breast cancer liver metastasis by facilitating tumor cell interactions with hepatocytes. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2979–91 (2012).
93. Albert, U.-S. *et al.* Guideline for the Early Detection of Breast Cancer in Germany 2008. Recommendations from the short version. *Chirurg.* **79**, 589–94 (2008).
94. D'Orsi, C. J. & Kopans, D. B. Mammography interpretation: the BI-RADS method. *Am. Fam. Physician* **55**, 1548–50, 1552 (1997).
95. Nothacker, M. *et al.* Early detection of breast cancer: benefits and risks of supplemental breast ultrasound in asymptomatic women with mammographically dense breast tissue. A systematic review. *BMC Cancer* **9**, 335 (2009).
96. Kreienberg, R. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. **3**, 1–396 (2012).
97. Elston, C. W. & Ellis, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **19**, 403–10 (1991).
98. Ivshina, A. V *et al.* Genetic reclassification of histologic grade delineates new clinical subtypes of breast cancer. *Cancer Res.* **66**, 10292–301 (2006).
99. Uehiro, N. *et al.* Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. *Breast Cancer* (2013). doi:10.1007/s12282-013-0453-7
100. Webber, C. *et al.* Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review. *Int. J. Cancer* **135**, 371–8 (2014).

101. Houssami, N. *et al.* Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur. J. Cancer* **46**, 3219–32 (2010).
102. Veronesi, U. *et al.* Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1227–32 (2002).
103. Jakesz, R. & Frey, M. Mammakarzinom (Operative Behandlungskonzepte). *Springer-Verlag* **1. Auflage**, (2007).
104. Voogd, A. C. *et al.* Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J. Clin. Oncol.* **19**, 1688–97 (2001).
105. Fisher, B. & Anderson, S. Conservative surgery for the management of invasive and noninvasive carcinoma of the breast: NSABP trials. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *World J. Surg.* **18**, 63–9
106. Kuehn, T. *et al.* A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer* **103**, 451–61 (2005).
107. Lyman, G. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **23**, 7703–20 (2005).
108. Krag, D. N. *et al.* Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **11**, 927–33 (2010).
109. Darby, S. *et al.* Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**, 1707–16 (2011).
110. Clarke, M. *et al.* Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **366**, 2087–106 (2005).
111. Floyd, S. R. & Taghian, A. G. Post-mastectomy radiation in large node-negative breast tumors: does size really matter? *Radiother. Oncol.* **91**, 33–7 (2009).
112. Kunkler, I. Adjuvant chest wall radiotherapy for breast cancer: black, white and shades of grey. *Eur. J. Surg. Oncol.* **36**, 331–4 (2010).
113. McCammon, R., Finlayson, C., Schwer, A. & Rabinovitch, R. Impact of postmastectomy radiotherapy in T3N0 invasive carcinoma of the breast: a

- Surveillance, Epidemiology, and End Results database analysis. *Cancer* **113**, 683–9 (2008).
114. Rowell, N. P. Radiotherapy to the chest wall following mastectomy for node-negative breast cancer: a systematic review. *Radiother. Oncol.* **91**, 23–32 (2009).
 115. Russell, N. S. *et al.* Postmastectomy radiotherapy: will the selective use of postmastectomy radiotherapy study end the debate? *J. Clin. Oncol.* **27**, 996–7; author reply 997–8 (2009).
 116. Kaufmann, M., Morrow, M., von Minckwitz, G. & Harris, J. R. Locoregional treatment of primary breast cancer: consensus recommendations from an International Expert Panel. *Cancer* **116**, 1184–91 (2010).
 117. Kaufmann, M. *et al.* International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2600–8 (2003).
 118. Davies, C. *et al.* Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* **378**, 771–84 (2011).
 119. Fisher, B. *et al.* Tamoxifen and chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**, 1673–82 (1997).
 120. Burstein, H. J. *et al.* American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3784–96 (2010).
 121. Rody, A. *et al.* Gene expression profiles of breast cancer obtained from core cut biopsies before neoadjuvant docetaxel, adriamycin, and cyclophosphamide chemotherapy correlate with routine prognostic markers and could be used to identify predictive signatures. *Zentralbl. Gynakol.* **128**, 76–81 (2006).
 122. Kaufmann, M. *et al.* Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update. *J. Clin. Oncol.* **24**, 1940–9 (2006).
 123. Liedtke, C. *et al.* Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **26**, 1275–81 (2008).
 124. Ferguson, T., Wilcken, N., Vagg, R., Ghersi, D. & Nowak, A. K. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane database Syst. Rev.* CD004421 (2007). doi:10.1002/14651858.CD004421.pub2
 125. Citron, M. L. *et al.* Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1431–9 (2003).

126. Bria, E. *et al.* Benefit of taxanes as adjuvant chemotherapy for early breast cancer: pooled analysis of 15,500 patients. *Cancer* **106**, 2337–44 (2006).
127. Clavarezza, M., Del Mastro, L. & Venturini, M. Taxane-containing chemotherapy in the treatment of early breast cancer patients. *Ann. Oncol.* **17 Suppl 7**, vii22–6 (2006).
128. Estévez, L. G. *et al.* Evidence-based use of taxanes in the adjuvant setting of breast cancer. A review of randomized phase III trials. *Cancer Treat. Rev.* **33**, 474–83 (2007).
129. Viani, G. A., Afonso, S. L., Stefano, E. J., De Fendi, L. I. & Soares, F. V. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* **7**, 153 (2007).
130. Hiller, D. J. & Chu, Q. D. Current Status of Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibitors as Novel Therapeutic Agents for Triple-Negative Breast Cancer. *Int. J. Breast Cancer* **2012**, 829315 (2012).
131. Anders, C. K. *et al.* Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition: “targeted” therapy for triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16**, 4702–10 (2010).
132. Lim, B., Cream, L. V & Harvey, H. A. Update on clinical trials: genetic targets in breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **779**, 35–54 (2013).
133. Vogl, T. J., Farshid, P., Naguib, N. N. N. & Zangos, S. Thermal ablation therapies in patients with breast cancer liver metastases: a review. *Eur. Radiol.* **23**, 797–804 (2013).
134. Rojas, M. P. *et al.* Follow-up strategies for women treated for early breast cancer. *Cochrane database Syst. Rev.* CD001768 (2005). doi:10.1002/14651858.CD001768.pub2
135. Grunfeld, E., Dhesy-Thind, S. & Levine, M. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: follow-up after treatment for breast cancer (summary of the 2005 update). *CMAJ* **172**, 1319–20 (2005).
136. Khatcheressian, J. L. *et al.* American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J. Clin. Oncol.* **24**, 5091–7 (2006).
137. Von Minckwitz, G. *et al.* Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res. Treat.* **125**, 145–56 (2011).
138. Lucci, A. *et al.* Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study. *Lancet Oncol.* **13**, 688–95 (2012).
139. Stein, U. *et al.* MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat. Med.* **15**, 59–67 (2009).

140. Stein, U., Dahlmann, M. & Walther, W. MACC1 - more than metastasis? Facts and predictions about a novel gene. *J. Mol. Med. (Berl)*. **88**, 11–8 (2010).
141. Yang, J., Mani, S. A. & Weinberg, R. A. Exploring a new twist on tumor metastasis. *Cancer Res.* **66**, 4549–52 (2006).
142. Stein, U. *et al.* Circulating MACC1 transcripts in colorectal cancer patient plasma predict metastasis and prognosis. *PLoS One* **7**, e49249 (2012).
143. Boardman, L. a. Overexpression of MACC1 leads to downstream activation of HGF/MET and potentiates metastasis and recurrence of colorectal cancer. *Genome Med.* **1**, 36 (2009).
144. Naldini, L. *et al.* Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-MET. *Oncogene* **6**, 501–4 (1991).
145. Davis, I. J. *et al.* Identification of the receptor tyrosine kinase c-Met and its ligand, hepatocyte growth factor, as therapeutic targets in clear cell sarcoma. *Cancer Res.* **70**, 639–45 (2010).
146. Ma, J. *et al.* Somatic mutation and functional polymorphism of a novel regulatory element in the HGF gene promoter causes its aberrant expression in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* **119**, 478–91 (2009).
147. Zhang, Y.-W., Su, Y., Volpert, O. V & Vande Woude, G. F. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 12718–23 (2003).
148. Bellusci, S. *et al.* Creation of an hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity. *Oncogene* **9**, 1091–9 (1994).
149. Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J. H. & Vande Woude, G. F. Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 4731–5 (1994).
150. Arlt, F. & Stein, U. Colon cancer metastasis: MACC1 and Met as metastatic pacemakers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2356–9 (2009).
151. Stein, U., Smith, J., Walther, W. & Arlt, F. MACC1 controls Met. 2467–2469 (2009).
152. Schmid, F. *et al.* S100P, a target gene of MACC1, contributes to colorectal cancer metastasis. -- Schmid *et al.* : --. *Cancer Res.* **73 (1008)**, 416
153. Schmid, F. *et al.* SPON2, a Newly Identified Transcriptional Target Gene of MACC1, is Associated with Colorectal Cancer Metastasis. *Eur. J. Cancer* **48**, 63–64 (2012).

154. Kokoszyńska, K., Kryński, J., Rychlewski, L. & Wyrwicz, L. S. Unexpected domain composition of MACC1 links MET signaling and apoptosis. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 317–23 (2009).
155. Voss, M., Lettau, M. & Janssen, O. Identification of SH3 domain interaction partners of human FasL (CD178) by phage display screening. *BMC Immunol.* **10**, 53 (2009).
156. Seger, R. & Krebs, E. G. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* **9**, 726–35 (1995).
157. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* **22**, 153–83 (2001).
158. Greenblatt, M. B., Shim, J.-H. & Glimcher, L. H. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **29**, 63–79 (2013).
159. Su, Y. *et al.* JNK/P38 mitogen-activated protein kinase used for hepatocyte growth factor-induced proliferation, differentiation, and migration in human dental papilla cells. *J. Endod.* **38**, 1207–13 (2012).
160. Karihaloo, A., O'Rourke, D. A., Nickel, C., Spokes, K. & Cantley, L. G. Differential MAPK pathways utilized for HGF- and EGF-dependent renal epithelial morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 9166–73 (2001).
161. Juneja, M., Ilm, K., Schlag, P. M. & Stein, U. Promoter identification and transcriptional regulation of the metastasis gene MACC1 in colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **7**, 929–943 (2013).
162. Migliore, C. *et al.* MiR-1 downregulation cooperates with MACC1 in promoting MET overexpression in human colon cancer. *Clin. Cancer Res.* **18**, 737–47 (2012).
163. Zhang, Y. *et al.* MicroRNA-143 targets MACC1 to inhibit cell invasion and migration in colorectal cancer. *Mol. Cancer* **11**, 23 (2012).
164. Choi, D.-S. *et al.* Quantitative proteomics of extracellular vesicles derived from human primary and metastatic colorectal cancer cells. *J. Extracell. vesicles* **1**, (2012).
165. Wiśniewski, J. R., Ostasiewicz, P. & Mann, M. High recovery FASP applied to the proteomic analysis of microdissected formalin fixed paraffin embedded cancer tissues retrieves known colon cancer markers. *J. Proteome Res.* **10**, 3040–9 (2011).
166. Greening, D. W. *et al.* Colon tumour secretome: Insights into endogenous proteolytic cleavage events in the colon tumour microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, 2396–2407 (2013).

167. ZHANG, Y. & WANG, Z. The influence of MACC1 on liver metastasis from colon cancer cells. *TUMOR* **31**, 513–516
168. Isella, C. *et al.* MACC1 mRNA levels predict cancer recurrence after resection of colorectal cancer liver metastases. *Ann. Surg.* **257**, 1089–95 (2013).
169. Reece-Smith, A., Argent, R., Onion, D. & Watson, S. The role of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in the establishment of colorectal liver metastases. A potential source of prognostic biomarkers. *Eur. J. Cancer Suppl.* **8**, 152 (2010).
170. KAWAMURA, M. *et al.* Correlation of MACC1 and MET Expression in Rectal Cancer after Neoadjuvant Chemoradiotherapy. *Anticancer Res* **32**, 1527–1531 (2012).
171. Lang, A. H. *et al.* A common variant of the MACC1 gene is significantly associated with overall survival in colorectal cancer patients. *BMC Cancer* **12**, 20 (2012).
172. Schmid, F., Burock, S., Klockmeier, K., Schlag, P. M. & Stein, U. SNPs in the coding region of the metastasis-inducing gene MACC1 and clinical outcome in colorectal cancer. *Mol. Cancer* **11**, 49 (2012).
173. Ashktorab, H. *et al.* Abstract: Expression of MACC1, a metastasis-related protein, associated with the progression of colorectal cancer. *Proc. 102nd Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res.* **71**, Abstract nr 3871 (2011).
174. Huang, Y. *et al.* Overexpression of MACC1 and Its significance in human Breast Cancer Progression. *Cell Biosci.* **3**, 16 (2013).
175. Shirahata, A. *et al.* MACC 1 as a marker for vascular invasive hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* **31**, 777–80 (2011).
176. Qiu, J. *et al.* Identification of MACC1 as a novel prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *J. Transl. Med.* **9**, 166 (2011).
177. Qu, J.-H. *et al.* Overexpression of metastasis-associated in colon cancer 1 predicts a poor outcome of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* **18**, 2995–3003 (2012).
178. Gao, J., Ding, F., Liu, Q. & Yao, Y. Knockdown of MACC1 expression suppressed hepatocellular carcinoma cell migration and invasion and inhibited expression of MMP2 and MMP9. *Mol. Cell. Biochem.* **376**, 21–32 (2013).
179. Xie, C. *et al.* MACC1 as a prognostic biomarker for early-stage and AFP-normal hepatocellular carcinoma. *PLoS One* **8**, e64235 (2013).
180. Yang, Y.-P. *et al.* High intratumoral metastasis-associated in colon cancer-1 expression predicts poor outcomes of cryoablation therapy for advanced hepatocellular carcinoma. *J. Transl. Med.* **11**, 41 (2013).

181. Subrungruanga, I. *et al.* Gene expression profiling of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **14**, 557–63 (2013).
182. Shirahata, A. *et al.* MACC 1 as a marker for peritoneal-disseminated gastric carcinoma. *Anticancer Res.* **30**, 3441–4 (2010).
183. Wang, L. *et al.* Metastasis-associated in colon cancer-1 upregulation predicts a poor prognosis of gastric cancer, and promotes tumor cell proliferation and invasion. *Int. J. Cancer* **133**, 1419–30 (2013).
184. Ge, S.-H. *et al.* Over-expression of Metastasis-associated in Colon Cancer-1 (MACC1) Associates with Better Prognosis of Gastric Cancer Patients. *Chin. J. Cancer Res.* **23**, 153–9 (2011).
185. Wang, G. *et al.* MACC1: A potential molecule associated with pancreatic cancer metastasis and chemoresistance. *Oncol. Lett.* **4**, 783–791 (2012).
186. Stein, U. MACC1 - a novel target for solid cancers. Expert opinion on therapeutic targets. *Inf. Healthc.* **17**, 1039–1052 (2013).
187. Shimokawa, H. *et al.* Overexpression of MACC1 mRNA in lung adenocarcinoma is associated with postoperative recurrence. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **141**, 895–898 (2011).
188. Chundong, G. *et al.* Molecular diagnosis of MACC1 status in lung adenocarcinoma by immunohistochemical analysis. *Anticancer Res.* **31**, 1141–5 (2011).
189. Hu, X., Fu, X., Wen, S., Zou, X. & Liu, Y. Prognostic value of MACC1 and c-met expressions in non-small cell lung cancer. *Chinese J. lung cancer* **15**, 399–403 (2012).
190. Zhang, R. *et al.* Effects of metastasis-associated in colon cancer 1 inhibition by small hairpin RNA on ovarian carcinoma OVCAR-3 cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **30**, 83 (2011).
191. Huang, H. *et al.* Expression of MACC1 in epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *TUMOR* **31**, 522–526 (2011).
192. Hagemann, C. *et al.* Impact of MACC1 on human malignant glioma progression and patients' unfavorable prognosis. *Neuro. Oncol.* **15**, 1696–709 (2013).
193. Yang, T.-H., Kon, M., Hung, J.-H. & Delisi, C. Combinations of newly confirmed Glioma-Associated loci link regions on chromosomes 1 and 9 to increased disease risk. *BMC Med. Genomics* **4**, 63 (2011).
194. Zhang, K. *et al.* MACC1 is involved in the regulation of proliferation, colony formation, invasion ability, cell cycle distribution, apoptosis and tumorigenicity by altering Akt signaling pathway in human osteosarcoma. *Tumour Biol.* (2013). doi:10.1007/s13277-013-1335-5

195. Meng, F. *et al.* MACC1 down-regulation inhibits proliferation and tumorigenicity of nasopharyngeal carcinoma cells through Akt/ β -catenin signaling pathway. *PLoS One* **8**, e60821 (2013).
196. Shang, C., Zhang, H. & Song, Y.-S. Regulation between MACC1 and c-MET in proliferative process of renal carcinoma. *China J. Cancer Prev. Treat.* 1065–1067 (2011). at http://caod.oriprobe.com/articles/27309811/Regulation_between_MACC1_and_c_Met_in_proliferative_process_of_renal_c.htm
197. Zhu, M. *et al.* Overexpression of Metastasis-Associated in Colon Cancer-1 Associated with Poor Prognosis in Patients with Esophageal Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* (2013). doi:10.1007/s12253-013-9638-9
198. Denkert, C. *et al.* Metabolomics of human breast cancer: new approaches for tumor typing and biomarker discovery. *Genome Med.* **4**, 37 (2012).
199. Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409–16 (1973).
200. Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. & Reeves, W. J. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* **53**, 661–74 (1974).
201. Gründker, C. *et al.* Gonadotropin-releasing hormone type II antagonist induces apoptosis in MCF-7 and triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res.* **12**, R49 (2010).
202. David H. Lovett¹, Sunfa Cheng^{1, 3}, Leslie Cape¹, Allan S. Pollock^{1, 3}, and P. R. M. YB-1 alters MT1-MMP trafficking and stimulated MCF-7 breast tumor invasion and metastasis. (2011). doi:10.1016/j.bbrc.2010.06.104.YB-1
203. Yin, Y., Sanders, A. J. & Jiang, W. G. The Impact of Angio-associated Migratory Cell Protein (AAMP) on Breast Cancer Cells In Vitro and Its Clinical Significance. *Anticancer Res.* **33**, 1499–509 (2013).
204. Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–7 (1996).
205. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology. (N. Y.)* **10**, 413–7 (1992).
206. Xiao, C., Lachance, B., Sunahara, G. & Luong, J. H. T. An in-depth analysis of electric cell-substrate impedance sensing to study the attachment and spreading of mammalian cells. *Anal. Chem.* **74**, 1333–9 (2002).
207. Marchionni, L. *et al.* Systematic review: gene expression profiling assays in early-stage breast cancer. *Ann. Intern. Med.* **148**, 358–69 (2008).

208. Paik, S. *et al.* Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 3726–34 (2006).
209. Bohmann, K. *et al.* RNA extraction from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a comparison of manual, semiautomated, and fully automated purification methods. *Clin. Chem.* **55**, 1719–27 (2009).
210. Muendlein, A. *et al.* Significant survival impact of MACC1 polymorphisms in HER2 positive breast cancer patients. *Eur. J. Cancer* **50**, 2134–41 (2014).
211. Mowen, K. A. & David, M. Unconventional post-translational modifications in immunological signaling. *Nat. Immunol.* **15**, 512–20 (2014).
212. Wilson, R. C. & Doudna, J. A. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 217–39 (2013).
213. Morgens, D. W. The protein invasion: a broad review on the origin of the translational system. *J. Mol. Evol.* **77**, 185–96 (2013).
214. Dice, J. F. Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. *FASEB J.* **1**, 349–57 (1987).
215. Páska, C. *et al.* Effect of formalin, acetone, and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue. *Diagn. Mol. Pathol.* **13**, 234–40 (2004).
216. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–22 (2009).
217. Obuchowski, N. A., Lieber, M. L. & Wians, F. H. ROC curves in clinical chemistry: uses, misuses, and possible solutions. *Clin. Chem.* **50**, 1118–25 (2004).
218. Hammond, M. E. H. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2784–95 (2010).
219. Fitzgibbons, P. L., Murphy, D. a, Hammond, M. E. H., Allred, D. C. & Valenstein, P. N. Recommendations for validating estrogen and progesterone receptor immunohistochemistry assays. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **134**, 930–935 (2010).
220. Yildiz, D. & Zeynep, S. Medical Radiation Exposure and Human Carcinogenesis- Genetic and Epigenetic Mechanisms. *Biomed. Environ. Sci.* **27**, 718–728 (2014).
221. Morton, L. M. *et al.* Evolving risk of therapy-related acute myeloid leukemia following cancer chemotherapy among adults in the United States, 1975-2008. *Blood* **121**, 2996–3004 (2013).

222. Faltus, T. *et al.* Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia* **6**, 786–95
223. Eccles, S. A., Box, C. & Court, W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnol. Annu. Rev.* **11**, 391–421 (2005).
224. Limame, R. *et al.* Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays. *PLoS One* **7**, e46536 (2012).
225. Ponzio, M. G. *et al.* Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12903–8 (2009).
226. Raghav, K. P. *et al.* cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2269–77 (2012).
227. Cecchi, F., Rabe, D. C. & Bottaro, D. P. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **16**, 553–72 (2012).
228. Blumenschein, G. R., Mills, G. B. & Gonzalez-Angulo, A. M. Targeting the hepatocyte growth factor-cMET axis in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* **30**, 3287–96 (2012).
229. Qin, J. *et al.* A diterpenoid compound, excisanin A, inhibits the invasive behavior of breast cancer cells by modulating the integrin β 1/FAK/PI3K/AKT/ β -catenin signaling. *Life Sci.* **93**, 655–63 (2013).
230. Gong, Y. *et al.* Phosphorylation of myofibrillogenesis regulator-1 activates the MAPK signaling pathway and induces proliferation and migration in human breast cancer MCF7 cells. *FEBS Lett.* **588**, 2903–10 (2014).
231. Radisky, E. S. & Radisky, D. C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 201–12 (2010).
232. Albert, U. S. *et al.* [The population-based mammography screening programme in Germany: uptake and first experiences of women in 10 federal states]. *Gesundheitswesen* **74**, 61–70 (2012).
233. Coumans, F. A., Siesling, S. & Terstappen, L. W. Detection of cancer before distant metastasis. *BMC Cancer* **13**, 283 (2013).
234. Stein, U. Circulating MACC1 transcripts are elevated in pancreatic cancer patient blood and correlate to locally advanced disease. *Cancer Research* **73** (1008): 5106 at
<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/content/meeting_abstract/73/8_MeetingAbstracts/5106>

6 Abkürzungsverzeichnis

5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
Akt	Protein kinase B
AP1	Activating protein 1
AP2 α	Activator protein 2 alpha
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
AUC	Area under curve
Bcl-2	B-cell lymphoma
BET	Brusterhaltende Therapie
BIRADS	Breast Imaging Reporting and Data System
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
BRIP1	Fanconi anemia group J protein
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
CDH1	E-cadherin
cDNA	Complementary RNA
CHK2	Checkpoint kinase 2
CI	Konfidenzintervall
DAB	Diaminobenzidin
DCIS	Duktales carcinoma in situ
DD	Death domain
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
E-cadherin	Epithelial cadherin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
EH	Epsin homology
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FasL	Fas ligand
FBS	Fetales Kälberserum (fetal bovine serum)
FFPE	Formalin-fixed and paraffin-embedded
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
Fwd	Forward
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GFP	Green Fluorescence Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HGF	Hepatocyte growth factor
HRP	Meerrettich-Peroxidase
ICC	Cholangiokarzinom
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IHC	Immunhistochemie
IL-8	Interleukin-8
IRS	Immunreaktiver Score
LCIS	Lobuläres carcinoma in situ
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
MACC1	Metastasis-associated in colon cancer 1
MAP	Mitogen-activated protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MFS	Metastasis-free survival
MiRNA	MicroRNA
MMP2	Matrix-Metalloprotease 2
MMP9	Matrix-Metalloprotease 9
MRM	Modifizierte radikale Mastektomie
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
NPC	Nasopharynxkarzinom

NSCLC	Non-small cell lung cancer
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PT53	Gen von P53
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
QRT-PCR	Quantitative Real-Time- Polymerase Chain Reaction
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RAS	Rat sarcoma
RCT	Radiochemotherapie
Rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver operating characteristic
RPL37A	Ribosomal protein L37a
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
S100P	S100 calcium binding protein P
shRNA	Short hairpin RNA
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
Sp1	Specificity protein 1
SPON2	Spondin2
STK11	Serin Threonin Kinase 11
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline + Tween®20
TMA	Tissue microarray
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor-C
VEGF-D	Vascular endothelial growth factor-D
VEGFR	Rezeptor für VEGF
VSV-G	Vesicular-Stomatitis-Virus
Wnt-1	wingless-type MMTV integration site family, member 1

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Maria Haustein, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „MACC1 als prognostischer Biomarker für das Mammakarzinom“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Kongressbeitrag

M. Haustein, B. V. Sinn, P. Herrmann, C. Denkert, U. Stein:

The prognostic role of the metastasis gene MACC1 in breast cancer

Poster-Vortrag auf der 24th European Student Conference 2013, Berlin

Danksagung

Zuerst möchte mich ganz besonders bei Frau Prof. Ulrike Stein für die Anvertraung des Themas und die außerordentliche Unterstützung bedanken. Auch der gesamten Forschungsgruppe „AG Stein“ möchte ich für die Einarbeitung, Hilfsbereitschaft und Ratschläge danken. Besonders hervorzuheben sind hier Pia Herrmann, welche mich stets geduldig und mit großem Einsatz in die verschiedenen Labortechniken eingeführt hat. Bei Janice Smith bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung der Western Blots. Zudem richte ich ein ganz großes Dankeschön an Katharina Ilm, die mir ebenfalls bei den Western Blots eine große Hilfe war, mir aber auch oft mit Ratschlägen, konstruktiver Kritik und motivierenden Worten zur Seite stand. Bei Dr. Mathias Dahmann möchte ich mich für die Denkanstöße, die Unterstützung bei der Durchführung des FACS-Sortings und die zahlreichen technischen Ratschläge bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Carsten Denkert aus dem Institut für Pathologie der Charité für die Bereitstellung der TMAs und Tumor-DNA für den klinischen Teil der Arbeit und seine konstruktive Kritik bedanken. Die Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Denkert waren ausnahmslos hilfsbereit zur Stelle. Insbesondere Dr. Bruno Sinn war maßgeblich an der Planung der Arbeit beteiligt, beurteilte gewissenhaft die immunhistochemisch gefärbten TMAs und teilte sein Wissen zu Labortechniken, Studienorganisation und Auswertung gerne mit mir, vielen Dank. Mein Dank gilt zudem Petra Wachs und Ines Koch für die freundliche und geduldige Einarbeitung in die Labortechniken und Unterstützung beim Suchen von Fehlerquellen. Ein besonderer Dank geht an Judith Lindner, da sie sich gänzlich uneigennützig dem Thema meiner Arbeit annahm und mir wertvolle Ratschläge zur Studienplanung und –organisation sowie zur Optimierung von Techniken gab.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen der Abteilung für Studienkoordination des Brustzentrums Köpenick, die mir Zugang zu Ihrem Archiv gewährten, was mir bei der Erfassung und Aktualisierung vieler klinischer Daten ermöglicht hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Freund Gunnar, die mich immer unterstützt und motiviert haben, bedanken. Meine Eltern haben

immer an mich geglaubt. Sie haben mir das Medizinstudium und die anschließende Zeit als Promotionsstudentin ermöglicht und mich weitreichend unterstützt. Gunnar hat mir, wann immer es nötig war, den Rücken frei gehalten. Außerdem war er mir bei zahlreichen Software-Problemen eine riesengroße Hilfe und hat mich in jeder freien Minute ermutigt diese Arbeit voranzubringen. Dankeschön.