

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie  
und Zentrallabor**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. Ulrich Walter**

**Genetische Untersuchungen zur Amplifikation des Gens  
LASP-1 sowie statistische Auswertung der Auswirkungen  
der Proteinlokalisierung auf das Langzeitüberleben**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der

**Medizinischen Fakultät**

der

**Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

vorgelegt von

**Jochen Frietsch**

aus Kirchheim

Würzburg, 26. November 2010

**Referent:** Frau **Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt-Dörje**  
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor

**Koreferent:** Herr **Prof. Dr. med. Johannes Dietl**  
Universitäts-Frauenklinik

**Dekan:** Herr **Prof. Dr. med. Matthias Frosch**  
Institut für Hygiene und Mikrobiologie

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25. Januar 2011

**Der Promovend ist Arzt**

# Prolog

---

Unabdingbare Voraussetzung für den Gewinn neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse ist die logische, konsequente, stringente und methodische sowie unvoreingenommene Anwendung des menschlichen Verstandes. Erheblich an Bedeutung gewinnen die frisch erworbenen Ansichten und Kenntnisse aber erst durch eine verantwortungsvolle Einbindung in einen ethischen Kontext.

Sogar die Wissenschaft wird aber heute auch immer deutlicher durch steigenden Kostendruck und konkurrierendes Wirtschaftsdenken beeinflusst. Diese Bewegung hat letztlich nicht vor der Medizin Halt gemacht und wurde durch die Einführung der diagnosebezogenen Fallgruppen, der sogenannten DRGs auch dem letzten bewusst.

Ein Kriterium für die Qualität, nicht nur der Arzt-Patienten-Beziehung, sondern auch des wissenschaftlichen und darüber hinaus jeglichen menschlichen Handelns, ist heute damit mehr und mehr die Übernahme einer ethischen Verantwortung. Damit verbunden ist unweigerlich selbstkritisches und autarkes Denken sowie Aufrichtigkeit im Umgang mit den Mitmenschen.

Ein Verständnis für ethische Verantwortung sollte folglich einen unentbehrlichen Teil der Forschung, schließlich des gesamten menschlichen Handelns darstellen. Dies wurde bereits 1939 von Max Planck, einem bedeutenden deutschen Wissenschaftler und Physiker in einer Beschreibung wissenschaftlicher Arbeit ersucht und beweist heute erneut seine Aktualität und Relevanz.

Max Planck 1939 über wissenschaftliche Arbeit:

*„Wenn in der heutigen Zeit ein jeder, der sein Vaterland liebt, die Verpflichtung fühlt, alle seine Kräfte für die Behauptung der Stellung unseres Volkes in der*

---

*Welt einzusetzen, so erhebt sich auch für den Gelehrten die grundsätzliche Frage nach dem Wert und nach dem Sinn seiner wissenschaftlichen Arbeit.*

*Daß die Wissenschaft in letzter Linie dem **Leben** dient, wird gegenwärtig wohl kaum von jemandem bestritten werden. Aber eine andere Frage ist die nach der Richtung des **Weges**, auf dem sie ihr Ziel erreichen kann. Und hier kann man sehr wohl die gewissermaßen entgegengesetzte Behauptung aufstellen und vertreten, daß die Aufgabe der Wissenschaft **nicht** in der Nutzanwendung liegt, sondern in der Gewinnung **reiner** Erkenntnis. Und diese Behauptung läßt sich schlagend begründen durch den Hinweis auf große, lebenswichtige wissenschaftliche Leistungen, wie die Erfindung des Augenspiegels oder die Herstellung der drahtlosen Wellen oder die Entdeckung der Röntgenstrahlen: alles Leistungen, welche ohne jede Rücksicht auf Nutzanwendung **nur** im Interesse der **reinen** Forschung zustandegekommen sind.*

*Ich glaube, daß zwischen diesen beiden Auffassungen gar kein wirklicher Gegensatz besteht, denn die Erkenntnis ist eben das sicherste Mittel, um einen bestimmten Zweck zu erreichen. Nur darf man in der wissenschaftlichen Forschung nicht immer den **Zweck** voranstellen und im Hinblick auf ihn nach den Mitteln suchen, die zu seiner Erreichung führen; sondern man muß stets von dem **Gegebenen** ausgehen, sodann neues Material sammeln und nach allen Richtungen durcharbeiten, um es unter einen einheitlichen Gesichtspunkt zu bringen. Dann führt die Erweiterung der Kenntnisse häufig auch zu praktisch wertvollen Resultaten, und zwar oft in einer ganz unvorhergesehenen Richtung, wie die angeführten speziellen Beispiele zeigen.*

*Freilich läßt sich der Erfolg sehr häufig nicht voraussehen, denn nicht jede Erkenntnis ist gleich wertvoll. Vielmehr ist der Wert einer Erkenntnis wesentlich davon abhängig, ob ihr eine allgemeine Bedeutung innewohnt. Wenn man genau ermittelt hat, wie viele Körner irgend ein Sandhaufen enthält, so ist das eine ungeheure Leistung; aber man kann mit dieser Zahl nichts weiter anfangen, weil sie nur eine ganz spezielle Bedeutung besitzt. Um bedeutungsvolle Zusammenhänge aufzufinden, muss man in einer passenden **Richtung** suchen, und es gehört der*

---

*Blick des gottbegnadeten (d. h. ethisch verantwortlichen) Forschers dazu, um die Probleme zu erkennen, durch deren Lösung ein neues, fruchtbares Gebiet erschlossen werden kann."*

Aus **Max Planck über wissenschaftliche Arbeiten**; F. Herneck, Humboldt-Universität Berlin, *Die Naturwissenschaften*. 1976, **63**(11):530.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	
2.1.1	Kulturzellen	9
2.1.2	Lösungen, Medien und Seren für die Zellkultur	9
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien und Puffer	9
2.1.4	Antikörper	
2.1.4.1	Primärantikörper	11
2.1.4.2	Sekundärantikörper	11
2.1.5	Primer und Sonden	12
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	12
2.1.7	Geräte und Software	13
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	
2.2.1	Übersicht der verwendeten Methoden	14
2.2.2	BT-20, Zellkulturbedingungen	14
2.2.3	Gewebeproben und personenbezogene Daten	16
2.2.4	Immunhisto- und Histochemie	17
2.2.5	Histopathologische Befundung der LASP-1-Expression	20
2.2.6	Histopathologische Befundung der PDEF-Expression	22
2.2.7	Statistische Analysen und Berechnungen	23
2.2.8	Laser Mikrodisektion	23
2.2.9	Gewebeverdau mit Proteinase K	26
2.2.10	Gewebeaufreinigung	27
2.2.11	Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	28
2.2.12	Polymerase-Ketten-Reaktion	29
2.2.13	Oligonukleotidprimer	30
2.2.14	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	31
2.2.15	Quantitative Real-Time-PCR	33
2.2.16	Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden	38
2.2.17	Quantifizierung der Ergebnisse der qRT-PCR	39
2.2.18	Patientenstudie	41
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Design der LASP- und GAPDH-Primer	42

---

3.2	MicroSpin Tissue DNA Kit zeigt bessere Ergebnisse als peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	43
3.3	Einfache „in cap“-Preparation ist dem MicroSpin Tissue DNA Kit überlegen	44
3.4	Optimierung des Proteinase K-Verdau	45
3.5	PCR und Gelelektrophorese der lasermikrodissektierten Gewebeproben	46
3.6	Erstellung fluoreszenzmarkierter Sonden	47
3.7	Quantitative Real-Time-PCR	48
3.8	Übersicht der Ergebnisse aus PCR und qRT-PCR	51
3.9	Die nukleäre Lokalisation von LASP-1 ist mit einem kürzerem Langzeitüberleben verknüpft	51
3.10	Postulierter Zusammenhang zwischen PDEF und LASP-1 nicht übertragbar	54
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	Immunhisto- und Histochemie	57
4.2	Laser Mikrodisektion	58
4.3	Fluoreszenzmarkierte Hydrolysierungsoligonukleotide	59
4.4	Die HE-Färbung reduziert den Gehalt extrahierbarer DNA und hemmt PCR und Proteinase K	61
4.5	Die Überexpression von LASP-1 ist nicht auf Genamplifikation zurückzuführen	62
4.6	Die Nukleäre LASP-1-Lokalisation reduziert das Langzeitüberleben	63
4.7	PDEF-Expression als Ausdruck der Metastasierungsinitiation	65
4.8	Patientenstudie	66
4.9	LASP-1 wird transkriptionell durch p53 reguliert	67
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	69
<b>6.</b>	<b>Appendix</b>	
6.1	Anschreiben an die Einwohnermeldeämter	71
6.2	Rohdaten der Patientenstudie	72
6.3	Rohdaten der Genetischen Untersuchung zur Amplifikation von LASP-1 in Kontroll-Brustgewebe	77
6.4	Rohdaten der Genetischen Untersuchung zur Amplifikation von LASP-1 in Tumorgewebe	79
6.5	Verwendete Protokolle	87
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	91

---

<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>99</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>11.</b>	<b>Publikationen</b>	
<b>12.</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>13.</b>	<b>Curriculum vitae</b>	
<b>14.</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	

---



# 1 Einleitung

Brustkrebs ist gegenwärtig die häufigste bösartige Neubildung der Frau weltweit mit einer Inzidenz von 1.301.867 Betroffenen pro Jahr, und belegt mit jährlich 464.854 verstorbenen Frauen den ersten Platz der Krebstodesursachen. Obwohl weltweit die Inzidenz während der letzten 25 Jahre stetig anstieg, sind die Mortalitätsraten konstant und in manchen Ländern sogar regressiv verlaufen. In der westlichen Welt beträgt der Anteil an der Krebsmortalität 15 % (USA: 40.480 ♀, lediglich 2.030 ♂). Brustkrebs allein soll für 26 % (USA: 182.460 ♀, 480 ♂) aller Krebsneuerkrankungen unter Frauen in der westlichen Welt verantwortlich sein. 89 % der betroffenen Amerikanerinnen, 76,1 % der betroffenen Europäerinnen und nur 32 % der Betroffenen in Teilen Afrikas werden fünf Jahre überleben. Das Lebenszeitrisiko an Brustkrebs zu erkranken beträgt für Frauen westlicher Industrienationen 12,28 %, das heißt, dass etwa jede neunte Frau im Laufe ihres Lebens damit konfrontiert werden wird. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in Deutschland bei 62 Jahren. Mit einer Inzidenz von unter 1/100.000 und einem mittleren Erkrankungsalter zwischen 60 und 70 Jahren tritt Brustkrebs beim Mann hingegen nur sehr selten auf [24, 26, 41, 47, 50, 69].

Bei den Risikofaktoren sind allgemeine sowie determinierende zu unterscheiden. Als **allgemeine** Risikofaktoren werden beispielsweise Körpergröße, Körpergewicht und eine westliche Lebensweise betrachtet. Eine erste Schwangerschaft vor dem 20. Lebensjahr kann das Risiko, verglichen zu Schwangerschaften über dem 30. Lebensjahr, um 60 % senken an Brustkrebs zu erkranken. Eine frühe Menarche und ein später Eintritt in die Menopause scheinen das Risiko zu erhöhen [45, 80]. Der Einfluss der Ernährung wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. So soll ein hoher Anteil von Obst und Gemüse zwar positive Effekte auf arterielle Hypertension, Übergewicht und KHK haben, eine protektive Wirkung auf die Entwicklung von Brustkrebs konnte jedoch nicht gezeigt werden. Ebenso besteht kein Zusammenhang zwischen dem Faser- und Fettgehalt – ob tierisch oder pflanzlich, gesättigt oder ungesättigt – der Nah-

rung und Brustkrebs. Ein ausgewogenes Verhältnis von  $\Omega$ -3- und  $\Omega$ -6-ungesättigten Fettsäuren soll sich jedoch positiv auswirken. Der Konsum roten und weißen Fleisches erscheint ebenso unbedeutend wie eine strikte vegetarische Diät. Grillen und starkes Braten ließ sich aber als Risikofaktor dennoch nicht eindeutig ausschließen. Viel bedeutsamer sei aber der Einfluss lebenslang praktizierter Ernährungsgewohnheiten. Vor allem während Kindheit und Pubertät ist das Gewebe der Brust nicht nur hoch empfindlich für Karzinogene sondern auch für Salutogene. Folglich verhält sich eine Änderung der Ernährungsgewohnheiten im Erwachsenenalter hinsichtlich einer Veränderung des Brustkrebsrisikos womöglich auswirkunglos. Der Genuss von Alkohol führt, gemäß vieler Studien, zu einem gesteigerten Brustkrebs-Risiko, das aber gegen positive, kardioprotektive „Nebenwirkungen“ des Alkohols abgewogen werden kann [36]. Übergewicht soll das Brustkrebsrisiko ausschließlich postmenopausaler Frauen, je nach BMI, mehr oder minder stark erhöhen [80]. Das Brustkrebsrisiko wird hingegen günstig durch körperliche Aktivität, einen niedrigeren sozio-ökonomischen Status, geringerem Nikotingenuss und einer gesünderen Lebensweise beeinflusst [25, 61]. Insgesamt sollte somit generell eine gesunde Lebensweise mit einem gesundem Körpergewicht sowie einem Verzicht auf viele Genussgifte auch hinsichtlich der Brustkrebsmortalität empfohlen werden.

Zu den **determinierenden** Risikofaktoren werden Strahlenexposition, Hormonsubstitution und genetische Prädisposition gezählt. Durch die Auswertung zahlreicher epidemiologischer Studien mit therapeutisch oder diagnostisch bestrahlten Patienten, gelang es einen Zusammenhang zwischen Röntgenstrahlung und der Entstehung von Brustkrebs nachzuweisen [72]. Bei der postmenopausalen Hormonsubstitution wirken sich vor allem Östrogen-Progesteron-Kombinationspräparate auf die Tumorgenese aus. Hierbei kommt es zu einem Anstieg des relativen Risikos auf 1,33, das sich nach Absetzen der Therapie jedoch innerhalb von fünf Jahren wieder normalisieren soll. Für Östrogen- oder Progesteron-Monopräparate konnte kein Effekt gezeigt werden [13, 66]. Orale Kontrazeptiva scheinen Brustkrebs nicht zu initiieren, wohl aber das Wachstum präexistenter Tumoren zu bedingen. Für Frauen zwischen 20 und 29 Jahren konnte eine leichte Erhöhung der Inzidenz gezeigt werden, was bei Frauen über

35 Jahren nicht nachzuweisen war. Insgesamt ist das Lebenszeitrisiko für die Entwicklung von Brustkrebs aber nicht erhöht [7, 46].

Außerdem sind **genetische** Alterationen und Dysregulationen für die Karzinogenese verantwortlich und zentraler Bestandteil der Krebsforschung. LI S ET AL. zeigten 2000, dass mehr als 30 % des Genoms solider Tumoren aneuploide Karyotypen mit komplexen Chromosomenveränderungen aufweisen. Zusätzlich kann die Anzahl genomischer Mutationen pro Tumor bis zu  $10^3 - 10^5$  betragen [8, 53, 58, 59]. Hereditäre Brustkrebserkrankungen werden für etwa 5 - 10 % aller Brustkrebsfälle verantwortlich gemacht. Eine Mutation, in den Genen BRCA1 oder BRCA2 kann in annähernd 50 % der familiär gehäuft auftretenden Mammakarzinome nachgewiesen werden. Das Lebenszeitrisiko für heterozygote Mutationsträgerinnen an Brustkrebs zu erkranken beträgt annähernd 40 - 80 %, die Penetranz fast 80 %, weil der notwendige Verlust des zweiten Allels in der Regel zumeist erst zufällig im Erwachsenenalter auftritt. Diese Mutationen werden autosomal-dominant an die Hälfte der Nachkommen vererbt. BRCA1 ist zusammen mit anderen Proteinen an der DNA-Reparatur durch homologe Rekombination beteiligt und damit für die Integrität des Genoms verantwortlich. BRCA2 initiiert gemeinsam mit RAD51 die homologe Rekombination nach Doppelstrangbrüchen und ist somit ebenso an der DNA-Reparatur beteiligt [20, 76].

Trotz bedeutender Verbesserungen, sowohl der diagnostischen als auch der therapeutischen Methoden in der Behandlung von Krebspatienten, ist Metastasierung die Haupttodesursache der Krebserkrankten. Insgesamt sind über 90 % aller Krebstodesfälle darauf zurückzuführen [35]. Maligne Erkrankungen in metastasierten Stadien gelten generell als unheilbar mit einem medianen Überleben von lediglich ein paar wenigen Jahren. So konnte zum Beispiel durch die Einführung der endokrinen Therapie und der Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin®) das Behandlungsergebnis metastasierter Brustkrebses zwar verbessert, die substanzielle Eigenheit dieser fortgeschrittenen Erkrankung aber nicht grundlegend geändert werden. Die Behandlung einer metastasierten Erkrankung bleibt palliativ [30, 57, 68, 95].

Die Eigenschaften, die eine Neoplasie erwirbt, um erfolgreich wachsen und an entfernte Körperregionen metastasieren zu können, setzt eine Reihe bestimmter Mechanismen in Gang, welche die Formierung von Sekundärtumoren, das heißt von Metastasen, zur Folge haben. Diese sind ihrerseits wiederum für klinische Komplikationen und Mortalität verantwortlich [57].

Die Beweglichkeit von Krebszellen setzt im Detail ein funktionsfähiges Integrin-Zusammenspiel, das heißt die Bildung von Fokalkontakten, die Aktomyosin-abhängige Kontraktilität und die Rekrutierung von Oberflächenproteasen zu Extrazellulärmatrix-Kontakten für lokalisierte Proteolyse voraus [23]. Krebsmetastasen selbst, benötigen eine Abfolge komplexer Interaktionen zwischen Tumorzellen und dem sie umgebenden Mikroumfeld, die seine biologische Effektivität beeinflussen und die Anhaftung von Tumorzellen an entfernte Organe vermitteln [22].

Vielleicht könnten neue, effektivere therapeutische Behandlungsmodalitäten etabliert werden, wenn alle Gene und Signalwege aufgeklärt würden, die für die Entstehung von Metastasen verantwortlich sind. Vielversprechende Ziele für neue therapeutisch wirksame Substanzen sind in Tumorzellen überexprimierte Gene [60].

Der Protagonist meiner Dissertationsarbeit, **LASP-1**, dessen Charakteristika im Folgenden erläutert werden sollen, wird genau diesen Anforderung gerecht. Ursprünglich wurde das Gen des LIM- und SH3-Domänen Proteins LASP-1 mit Hilfe einer cDNA-Datenbank axillärer Lymphknoten-Metastasen von Brustkrebs beschrieben. Ihm scheint eine bedeutende Rolle in der Tumorentwicklung und speziell bei der Metastasierung von Brustkrebs zuzukommen. Das zugehörige Gen befindet sich in der Chromosomenregion 17q11 - q21.3, dem Bereich, der auch das c-erbB-2- und BRCA1-Onkogen enthält und in 20 - 30 % aller Mammakarzinome mutiert ist [85, 86].

Das humane LASP-1-Gen kodiert für ein aus 261 Aminosäuren aufgebautes Membran-assoziiertes Protein, das aus einer N-terminalen LIM-Domäne, gefolgt von zwei Aktin-Bindungsstellen, einer Linker-Region und einer C-terminalen SH3-Domäne

(src homology 3) besteht. Die Aktin-Bindungsstellen im Kern des LASP-1-Proteins vermitteln die Interaktion zwischen LASP-1 und Aktin in Zellausläufern [5, 10, 44, 64, 77]. Über die Bindung der C-terminalen SH3-Domäne an Prolin-reiche Sequenzen, vermittelt LASP-1 besonders mit Zyxin, Palladin, lipoma preferred partner (LPP) oder vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP), Protein-Protein-Interaktionen. Mutationsanalysen mit LASP-1 führten zur Schlussfolgerung, dass die SH3-Domäne für Pseudopodien-Fortsätze und die Invasion von Zellen unerlässlich sein muss [44, 51, 71, 81]. Ganz allgemein handelt es sich bei der LIM-Domäne um einen spezialisierten doppelten Zinkfinger, der mit verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts interagiert [1, 15, 31, 75, 85].

Obwohl vorausgegangene Arbeiten zeigen konnten, dass LASP-1 an vielen verschiedenen Orten des dynamischen Aktin-Zusammenspiels, wie Fokalkontakten, Adhäsionspunkten, Lamellipodien, Pseudopodien und an sogenannten „membrane-ruffles“ – Lamellipodien, die nicht durch Adhäsion der Zelle stabilisiert werden – lokalisiert, ist die exakte zelluläre Funktion von LASP-1 bis heute nur ungenügend beschrieben [10, 11, 12, 55, 85].

In allen benignen humanen Geweben wird LASP-1 mRNA auf einem basalen Niveau ubiquitär exprimiert. Eine erhöhte Expression von LASP-1 findet sich ferner im ZNS, in gestreiften Muskelzellen, in sekretorischem Gewebe wie den epithelialen Zellen der Niere, den duktalem Zellen des exokrinen Pankreas und den Parietalzellen des Magens [12, 52, 70]. Es wurde jedoch berichtet, dass der mRNA-Gehalt in metastasiertem humanen Brustkrebs erhöht ist, was eine Funktion im Migrationsprozess der Zellen vermuten lässt [85]. Die Überexpression der LASP-1 mRNA ist nicht mit dem Tumorstadium, dem c-erbB-2-, der Estrogen- oder Progesteronexpression verbunden, korreliert aber signifikant mit der Tumorstadium und nodaler Positivität. Interessanter Weise führt der Knockdown von LASP-1 mittels RNA-Interferenz in den metastasierenden Brustkrebszelllinien BT-20 und MCF-7, ebenso wie in der Eierstockkrebszelllinien SK-OV-3 zu einer starken Hemmung der Migration und der Proliferation mit einem Arrest in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus. Umgekehrt resultiert eine artifizielle Überexpression von

LASP-1 in nicht neoplastischen PtK2-Zellen in einer deutlichen Zunahme der Migration. Erstaunlicher Weise, ist das Protein LASP-1 nicht ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, sondern auch innerhalb des Zellkerns zu finden [31, 32, 33, 34].

Darüber hinaus ist eine veränderte LASP-1-Expression mit dem MLL-Gen der Akuten myeloischen Leukämie verbunden. In Hochrisiko-Patienten wird auf diese Weise durch Translokation ein LASP-1-MLL-Gen gebildet [83]. Ebenso wird LASP-1 als Antwort auf das Morphogen Sonic Hedgehog transkriptionell hochreguliert. Dieses Signalmolekül spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl humaner Krebsentitäten und die Störung seiner Signalkaskade ist mit einer Reihe von Entwicklungsstörungen verknüpft [40, 94]. Weiterhin ist LASP-1 Substrat der Abelson Tyrosin-Kinase. Nachhaltig soll diese Kinase an der Karzinogenese hämatopoetischer Tumoren, wie dem B-Zell-Lymphom beteiligt sein [42]. Daraus lässt sich schließen, dass LASP-1 funktionell an der Tumorgenese beteiligt ist [31].

In einem Bericht von TOMASETTO und Kollegen von 1995, wurde ein erhöhter Gehalt von LASP-1 mRNA in metastasiertem Brustkrebs (2 von 5 Proben, 40 %) und in Primärtumoren (5 von 61 Proben, 8 %) gefunden. Es wurde vermutet, dass die Überexpression von LASP-1 möglicher Weise am Migrationsprozess dieser Zellen beteiligt ist [85, 86]. In einer späteren Studie wurde sogar eine signifikant hochregulierte Expression des LASP-1 Proteins in über 55 % (46 von 83 Proben) der Brustkrebsproben gezeigt [32].

Nach einem Vergleich mit dem humanen Brustkrebs-Proto-Onkogen HER-2/neu, erschien es interessant zu ergründen, ob LASP-1 nur auf genomischer Ebene amplifiziert, nur auf Proteinebene hochreguliert oder sowohl amplifiziert als auch überexprimiert ist. Im Fall von HER-2/neu lässt sich nicht nur eine Genamplifikation sondern auch eine Proteinüberexpression zeigen. Die Amplifikation von HER-2/neu ist beispielsweise mit der Zeit zum Rezidiv, dem Gesamtüberleben, der mitotischen Aktivität und einem negativen Estrogen- und Progesteronstatus verbunden. Die Überexpression hingegen korreliert unter anderem mit dem Lymphknoten-Status, dem Tumorgrad von Brust-

krebs, dem Ansprechen auf eine zytotoxische Chemotherapie und dem gesamten Krankheits-Outcome [73]. Wenn es sich wirklich um eine transkriptionelle Hochregulierung des LASP-1 Proteins – verstanden als aktiver Prozess in der Tumorentstehung – nur in einer bestimmte Gruppe an Brustkrebsentitäten handeln sollte, was ist die Ursache dafür? Ist die Transkription oder die Translation beschleunigt, die Stabilität der mRNA oder der Turnover des Proteins verändert? Diese Fragen sollten in einer Studie geklärt werden.

Weiterhin lag mein Interesse in der Ergründung des Unterschiedes zwischen den Auswirkungen der nukleären und der zytosolischen LASP-1-Lokalisation auf das Überleben der Patienten. Dafür standen mir statistische Daten einer Patientenstudie über einen Beobachtungszeitraum von Januar 1985 bis Dezember 2007 zur Verfügung.

TURNER ET AL. identifizierten uPA, uPAR, LASP-1 und VASP als vermeintliche Zielgene von PDEF, dem prostate derived Ets factor. Die Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse, darunter Zellproliferation, Apoptose, Angiogenese, Transformation, Migration und Invasion beteiligt. Eine abnormale Expression der ETS-Transkriptionsfaktoren scheint mit einem Erkrankungsfortschreiten bei Leukämien und soliden Tumoren der Mamma, der Prostata, des Kolon, der Lunge, des Pankreas und der Schilddrüse assoziiert zu sein [89]. Veränderungen der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und der Lokalisation von Fokal-Kontakten, ausgelöst durch eine Expression von PDEF in verschiedenen invasiven Brustkrebszelllinien, führen zu einem Verlust der gerichteten morphologischen Polarität, was das metastatische Potential der Zellen verringert und damit Migration und Invasion verhindert. Außerdem beeinflusst die Expression von PDEF Fokalkontakte, Adhärenskontakte, Zelladhäsionsmoleküle und die Regulation des Aktin-Zytoskeletts [88]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown des PDEF-Proteins zu einer gesteigerten Expression von uPA und LASP-1 führt und in MCF-7-Zellen außerdem zu einem Anstieg der Zellmigration und zur Tumorentstehung in vivo [27, 89]. Analog dazu, führen hohe PDEF-Proteinspiegel zu entgegengesetzten Effekten. Die Autoren schlussfolgerten, dass Zellen, die PDEF exprimieren, nicht mehr in der Lage sind, die morphologische Po-

larität aufzubauen, die für eine effiziente gerichtete Zellmigration notwendig ist [89]. In der Dissertationsarbeit sollten daher die Zellkulturexperimente mit PDEF-gefärbten Schnittpräparaten, bei denen die LASP-Expression bekannt war, überprüft werden [27, 88, 89].

Diese intrigierenden Fragen bildeten die Grundlage für meine Dissertationsarbeit, in der ich anhand von DNA-Proben mikrodissektierter histologischer Schnittpräparate mittels PCR zeige, dass die Überexpression von LASP-1 in humanem Brustkrebs nicht auf Genamplifikation zurückzuführen ist. Es war mir nicht möglich den in Zellkulturexperimenten beobachteten Zusammenhang zwischen LASP-1 und PDEF mit histologischen Schnittpräparaten zu bestätigen. Die Auswertung der Patientendaten in Korrelation zur nukleären und zytoplasmatischen LASP-1 Verteilung ergab ein signifikant reduziertes Langzeitüberleben bei nukleärer LASP-1 Lokalisation.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Kulturzellen

humane Brustkrebszelllinie:	Hersteller:
BT-20	Line Services, Heidelberg, Deutschland

#### 2.1.2 Lösungen, Medien und Seren für die Zellkultur

Name:	Hersteller:
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAA, Linz, Österreich
Antibiotic/Antimycotic Solution (100 x) A5955	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution (1 x) T3924	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
RPMI 1640	PAA, Linz, Österreich

#### **Steriles 10 x PBS (phosphate buffered saline):**

80 g NaCl  
 2 g KCl  
 26,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
 2,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 auf pH 7,4 titrieren  
 auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen  
 autoklavieren

#### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Name:	Hersteller:
Agarose	BMA, BioWittaker Molecular Applications, Maine, USA
antibody diluent	DAKO, Hamburg, Deutschland
Antikörper Färbekit (LSAB2-Kit K0675)	DAKO, Hamburg, Deutschland
APES (3-Aminopropyltri-Ethoxysilan)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Beriglobin	Aventis-Behring GmbH, Marburg, Deutschland

<b>Name:</b>	<b>Hersteller:</b>
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DCS ChromoLine Puffer und Konzentrat	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol, 100 %	linikumseigene Apotheke
Ethanol, 96 %	linikumseigene Apotheke
Ethanol, 70 %	linikumseigene Apotheke
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNA-Größenmarker	100 bp, BioLabs, New England
Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mastermix PCR	Taq PCR Master Mix Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland
Mastermix qRT-PCR	iQ <sup>TM</sup> Supermix, iQ <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix, Bio-Rad, München, Deutschland
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Serva GmbH & Co., Heidelberg, Deutschland
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Wasserstoffperoxyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland

#### **5 x TBE (Tris-Borate-EDTA):**

54 g (0,45 M) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan  
 27,5 g (0,45 M) Borsäure  
 20 ml (0,5 M) EDTA  
 auf pH 8,0 titrieren  
 auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

#### **0,01 M Zitronensäure-Puffer:**

0,6 g (0,01 M) Zitronensäuremonohydrat  
 auf pH 6,0 titrieren  
 auf 300 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

**10 x PBS (phosphate buffered saline):**

80 g (1,37 M) NaCl  
 2 g (0,027 M) KCl  
 26,8 g (0,1 M) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
 2,4 g (0,018 M) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 auf pH 7,4 titrieren  
 auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen  
 autoklavieren

**Proteinase K Lyse-Puffer:**

1,6 g (50 mM) Tris HCl  
 0,744 g (1 mM) EDTA  
 0,5 % Tween 20  
 auf pH 8,0 titrieren  
 auf 200 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

**5 x DNA-Ladepuffer:**

20 g (20 %) (w/v) Polysucrose (Ficoll 400®)  
 1,86 g (50 mM) EDTA  
 0,05 g (0,05 %) (w/v) Bromphenolblau  
 0,05 g (0,05 %) (w/v) Xylencyanol  
 auf 100 ml mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

**2.1.4 Antikörper****2.1.4.1 Primärantikörper**

Bezeichnung und Hersteller:	Antigen:	Typ:	Verdünnung:
LASP-1; immunoGlobe, Himmelstadt, Deutschland	LASP-1	polyklonal; Kaninchen	1:1.000
Rabbit anti-PDEF; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland	PDEF	polyklonal; Kaninchen	1:200

**2.1.4.2 Sekundärantikörper**

Bezeichnung und Hersteller:	Markierung:
EnVision™ detection system Rabbit; DAKO, Hamburg, Deutschland	Meerrettich-Peroxidase (HRP)

### 2.1.5 Primer und Sonden

Primer:	Sequenz:	Hersteller:
LASP-1-Primer	Forward: 5'-TGT CTC CTG ACT GGT TGC GT-3' Reverse: 5'-TGA TCT GGT CCT GGG TCT TC-3'	Operon Biotechnologie GmbH, Köln, Deutschland
GAPDH-Primer	Forward: 5'-ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG-3' Reverse: 5'-TAC TCC TTG GAG GCC ATG TG-3'	Operon Biotechnologie GmbH, Köln, Deutschland
LASP-1-Sonde	5'-ACA CGC CCG AGC TCC AGA GA-3' 5'-6-FAM- und 3'-BHQ-1-markiert	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland
GAPDH-Sonde	5'-AAA AGT GCA GGG TCT GGC GC-3' 5'-Texas Red-X- und 3'-BHQ-2-markiert	Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

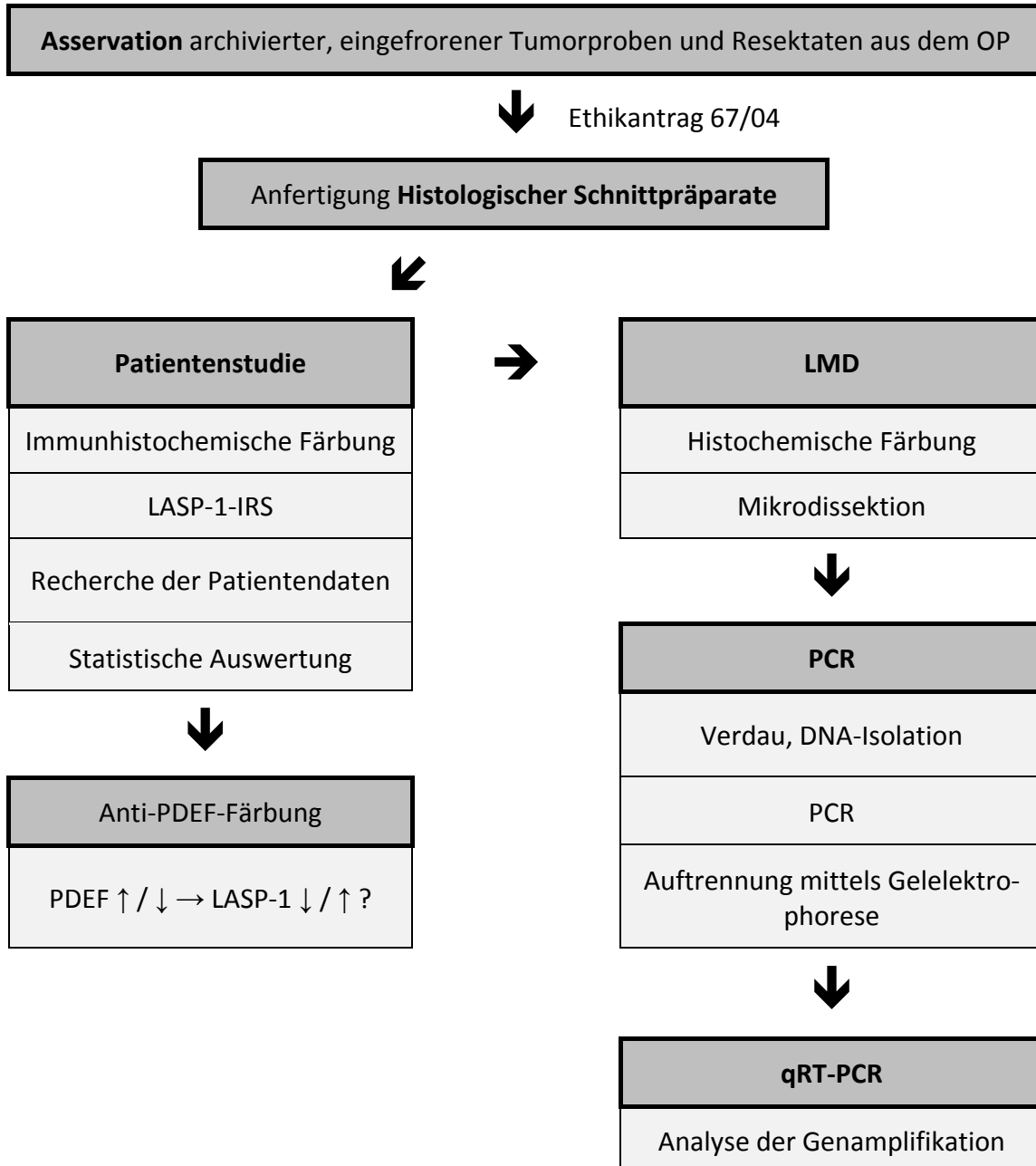
Art:	Bezeichnung, Hersteller bzw. Versandhaus:
24 mm Deckgläschen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
96-well Klebefolien	Bio-Rad, München, Deutschland
96-well Platten	Bio-Rad, München, Deutschland
Desinfektionsmittel	Teralind liquid, Schülke & Mayr, Norderstedt, Deutschland
DNA Extraktions-Kit	peqGOLD MicroSpin Tissue DNA Kit und peqGOLD Tissue DNA Mini Kit; peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Kryoröhrchen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Membrane Slides	PEN Membrane, Leica, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	Hartenstein, Würzburg, Deutschland; Menzel Gläser GmbH, Braunschweig, Deutschland
Parafilm M	American National Can, Greenwich CT, USA
Filter-Pipettenspitzen	Filter-Tips, Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenaufsätze	2, 10, 25 ml costar stripette, Corning, New York, USA 1,5 ml und 2 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland;
Reaktionsgefäße	0,5 ml; Hartenstein, Würzburg, Deutschland; 15 ml und 50 ml; Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sicherheitshandschuhe	SafeSKIN PFE, Kimberly-Clark, Zavantem, Belgien
Zellkulturflaschen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland

### 2.1.7 Geräte und Software

Gerät:	Bezeichnung und Hersteller:
Brutschrank	Model 3336, Labotect, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Noras, Würzburg, Deutschland; Agagel Standard, Biometra, Göttingen, Deutschland
Feinwaagen	Universal und Type 1801, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Geldokumentation	Gel Jet Imager, INTAS, Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Hood, sterilGard	The Baker Company, Stanford, Maine, USA
Kryotom	CM 1900, Leica, Bensheim, Deutschland
Linearschüttler	Duomax 1030, Heidolph, Düsseldorf, Deutschland
Magnetrührer	Variomag-U.S.A., Daytona Beach, USA
Mikroskope	Lichtmikroskop: Axiovert 25, ZEISS, Jena, Deutschland; Laser Mikrodisektion Mikroskop: Leica LMD 6000, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany
Mikrowelle	Samsung Classic Collection M8134, Samsung, Schwalbach, Deutschland
PCR	Thermocycler, Biometra, biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
pH-Meter	PHM 82 Standard pH Meter, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Photometer	Ultrospec 2000, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Pipette (elektrisch)	accu-jet pro, Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten (manuell)	2, 100, 1000 µl Eppendorf-Reference, Hamburg, Deutschland
qRT-PCR	iCycler Thermal Cycler, Bio-Rad
Reaktionsgefäßständer	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Software	Primer3: <a href="http://frodo.wi.mit.edu/">http://frodo.wi.mit.edu/</a> Ensemble: <a href="http://www.ensembl.org/">http://www.ensembl.org/</a> Graph Pad Prism 4.0a Microsoft® Windows™ XP und Vista Microsoft® Office 2003 und 2007
Spannungsgeräte	Electrophoresis Power Supply, EPS 601, GE Healthcare, Germany
Thermomixer	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Julabo MB, Seelbach, Deutschland
Zellzähler	Coulter counter Z2, Beckman, Fullerton CA, USA
Zentrifugen	Tischzentrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Rotanta/S und Rotixa/K, Hettich, Tuttlingen, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Übersicht der verwendeten Methoden



### 2.2.2 BT-20, Zellkulturbedingungen

Die aus humanem Brustkrebs stammenden BT-20-Zellen dienen uns als interne Kontrolle sowie als „Versuchsgewebe“. In T<sub>25</sub>-Zellkulturflaschen wurden die Zellen bis

zu einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml kultiviert. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium mit 10 % hitzeaktiviertem Kälberserum und 1 % einer antibiotischen Streptomycin/Ampicillin-Mischung, unter einer mit 5 % CO<sub>2</sub> gesättigten Atmosphäre bei 37°C herangezüchtet. Nach mikrobieller Verunreinigung wurden die Zellen mit den zugehörigen Kulturflaschen entfernt.

Zum **Splitten**, d. h. zum Separieren der adhärennten Zellen, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Zum Ablösen vom Schalenboden wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit einigen Millilitern Trypsin-EDTA versetzt. Die Behandlung mit Trypsin, einer Protease, bewirkt das Degradieren der Proteine, die den Zellverband aufrecht erhalten. Den abgelösten Zellen wurde dann das doppelte Volumen an Medium zugefügt. Nach Überführung in ein Reaktionsgefäß wurde für 4 Minuten bei 100 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Gemäß der erreichten Zellmenge wurde eine Verdünnung der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche zur weiteren Kultivierung passagiert.

Zum **Einfrieren** der Zellen wurde, wie beim Splitten, ebenfalls das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen zum Ablösen bei Raumtemperatur mit einigen Millilitern Trypsin-EDTA versetzt. Die nun losen Zellen wurden anschließend in 0,5 ml Medium resuspendiert. Dazu wurde dann 0,5 ml Medium bei -4°C mit 24 % DMSO hinzupipettiert. Das gesamte Gemisch wurde schließlich in einem Kryoröhrchen für 24 Stunden bei -80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff bis zur Wiederverwendung aufbewahrt.

Um die Zellen **aufzutauen**, wurde das Kryoröhrchen dem Stickstoff entnommen und direkt in ein Wasserbad bei 37°C zum Antauen gelegt. Die noch gefrorenen Zellen wurden in einem Stück in eine mit Medium befüllte Kulturflasche gegeben und in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Das DMSO und die abgestorbenen Zellen wurden nach dem Anwachsen der Zellen durch einen Mediumwechsel entfernt.

Um die BT-20-Zell-DNA in den Versuchen als Test- beziehungsweise Referenzgewebe verwenden zu können, mussten sie von den restlichen Zellbestandteilen getrennt

werden. Dafür wurde jeweils eine T<sub>25</sub>-Zellkulturflasche mit Hilfe des peqGOLD Tissue DNA Mini Kits aufbereitet (siehe auch Kapitel **2.2.10 Gewebeaufreinigung**).

### **2.2.3 Gewebeproben und personenbezogene Daten**

Nach Erteilung der Genehmigung des Ethikantrages 67/04 durch die Ethikkommission der Universität Würzburg wurde uns archiviertes, in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg für immunhistochemische und genetische Analysen bereitgestellt.

In Zusammenarbeit mit der Universitäts-Frauenklinik konnten so für die genetischen und statistischen Untersuchungen Tumorresektate von insgesamt 135 invasiv-duktalem Karzinomata, von 15 invasiv-duktalem mit low oder high grade duktalem Karzinomata in situ (DCIS), von zehn invasiv-tubulären Mammakarzinomata, von zwölf invasiven sowie von fünf intraduktalen Karzinomata über einen Zeitraum von Januar 1985 bis Dezember 2007 analysiert werden. Als Kontrollgewebe konnten insgesamt zehn Gewebeproben, darunter fibröse, fibro-adenomatöse, fibro-lipomatöse und fibrozystische Mastopathien sowie benignes Gewebe aus Brustgewebsreduktionen zwischen 1992 und 2007 gesichert werden.

Die Gewebeproben wurden dabei stets in Formalin fixiert, anschließend in Paraffinblöcken konserviert und bei - 80°C aufbewahrt.

Alle Tumorproben wurden nach WHO-Kriterien klassifiziert. Die Kriterien der NOTTINGHAM CITY HOSPITAL PATHOLOGISTS dienten zum Grading der invasiven Karzinomata und einiger DCIS, die gültigen TNM-Parameter zum Staging [14, 79]. Bei der Aufarbeitung der Gewebeproben wurden alle Diagnosen aus den archivierten, pathologischen Befunden durch Kontrolle eines Pathologen (Prof. Dr. med. Matthias Eck, Pathologisches Institut, Universität Würzburg) nochmals verifiziert.



Für alle im Rahmen der Dissertationsarbeit anfallenden Auswertungen und statistischen Aufarbeitungen wurden die zu jeder Gewebeprobe notwendigen Daten, wie die histologische Tumorentität, Staging und Grading, Geburtsdatum sowie Zeitpunkt der Operation aus den entsprechenden Patientenakten, den jeweiligen Berichten und pathologischen Befunden in den Archiven der Universitäts-Frauenklinik gesucht und dokumentiert (siehe **Appendix, 6.2 Rohdaten der Patientenstudie**). Außerdem wurden alle Patientinnen dahingehend überprüft, ob diese zum Ende des Beobachtungszeitraumes, Dezember 2007, noch lebten oder bereits verstorben waren. Dazu wurden die entsprechenden Einwohnermeldeämter mit einem Formular, das zusammen mit dem Tumorzentrum der Universitätsklinik Würzburg erstellt wurde, um Hilfe gebeten (siehe **Appendix, 6.1 Anschreiben an die Einwohnermeldeämter**).

Bei allen Arbeiten sowie dem Umgang mit personenspezifischem Datenmaterial wurde, ebenso wie bei den Formulierungen in den Anschreiben, stets und konsequent auf strenge Einhaltung des Datenschutzes sowie aller vorgegebenen ethischen Richtlinien geachtet.

#### **2.2.4 Immunhisto- und Histochemie**

Zusätzlich zu den HE-gefärbten Schnittpräparaten, die bei der pathologischen Begutachtung angefertigt wurden, wurde ein gegen LASP-1 gefärbter Schnitt für die Patientenstudie hergestellt. Des Weiteren wurde von einer Patientenuntergruppe zusätzlich ein HE-gefärbter Schnitt für die Laser Mikrodisektion (LMD) mit anschließender genetischer Analyse und von einer weiteren Patientensubgruppe ein Anti-PDEF-gefärbter Gewebeschnitt angefertigt.

Von allen Gewebeproben wurden mit dem Kryotom für die Immunhistochemie 2 µm-, beziehungsweise für die LMD 4 µm-dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden nach Überführung in ein 56°C warmes Wasserbad zum Glätten, im Fall der Immunhistochemie auf einen mit 3-Aminopropyltri-Ethoxysilan (APES) aufgebracht.

Gewebeschnitte, die im Anschluss der Mikrodissektion zugeführt werden sollten, wurden auf einen mit einer PEN-Membran beschichteten Objektträger überführt.

Nachdem die Schnitte für die anstehende Färbung über Nacht trockneten, wurden sie in einem mehrstufigen Prozess bei Raumtemperatur (RT) **entparaffiniert**. Dafür erfolgte in einem ersten Schritt die Inkubation in Xylol für zehn Minuten, daraufhin eine erneute Inkubation mit frischem Xylol für weitere zehn Minuten. Danach wurden die Gewebeproben durch Tauchen für jeweils eine Minute in 100 % Ethanol, erneut in 100 % Ethanol, in 96 % Ethanol, wiederholt in 96 % Ethanol, in 70 % Ethanol und in Aqua destillata **hydratisiert**.

Die Präparate, die immunhistochemisch **gegen LASP-1 gefärbt** werden sollten, wurden im Anschluss an die Hydratisierung zweimal, jeweils in frisch hergestellter 0,01 M Zitronensäure-Pufferlösung (siehe **2.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Puffer**) für fünf Minuten bei 800 Watt in der Mikrowelle gekocht. Nachdem die Gewebeschnitte 20 Minuten abkühlten, wurden sie gründlich in PBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Gewebeperoxidase wurden die Schnitte danach zehn Minuten 3 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in Methanol ausgesetzt. Erneut erfolgte ein gründlicher Waschschrift in PBS. Eine 15-minütige Inkubation in humanem Immunglobulin (Beriglobin) 1:10 in PBS bei Raumtemperatur sollte unspezifische Bindungskapazitäten blockieren. Wiederum wurden die Schnittpräparate in PBS gewaschen. Nun konnten die Gewebeschnitte mit dem polyklonalen LASP-1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 in DAKO antibody diluent bei 4°C über Nacht inkubiert werden. Abermals erfolgte eine Wäsche mit PBS. LASP-1 konnte nun unter Verwendung des HRP (Meerrettichperoxidase)-markierten EnVision™ Detektionssystems Rabbit (DAKO) für 30 Minuten bei Raumtemperatur und dem Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, DAKO) für fünf Minuten bei Raumtemperatur dargestellt werden. Dazwischen und danach mussten die Schnitte gründlich einem PBS-Waschvorgang unterzogen werden. Nun wurden die Präparate noch zur besseren Darstellbarkeit der Kerne für zwei Minuten mit Hämalaun gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte gründlich mit Leitungswasser und Aqua destillata gespült.

Ebenso wie die Anti-LASP-1-gefärbten Schnittpräparate, wurden die Gewebepräparate, die für die **Anti-PDEF-Färbung** bestimmt waren, zweimal in jeweils frisch hergestellter 0,01 M Zitronensäure-Pufferlösung für fünf Minuten bei 800 Watt in der Mikrowelle gekocht. In gleicher Weise wurden sie nach dem Abkühlen gründlich in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden diese Präparate zur Blockierung der endogenen Gewebeperoxidase zehn Minuten ebenfalls 3 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in Methanol getaucht. Danach wurde gründlich mit Aqua destillata und PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungskapazitäten zu blockieren, wurden die Schnitte 15 Minuten Beriglobin 1:50 in PBS bei RT ausgesetzt. Diesmal wurden die Schnitte nicht gewaschen, sondern lediglich der Überstand abgekippt. Zur nachfolgenden Färbung wurden die Schnittpräparate dann über Nacht in Rabbit Anti-PDEF-Antikörper 1:200 in DAKO antibody diluent bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Gewebeschnitte gründlich in PBS gewaschen. Nun wurden sie für je 15 Minuten ausreichend mit dem biotinylierten Brückenantikörper sowie nach erfolgtem Waschen mit Streptavidin-HRP in PBS des LSAB2-HRP-Kits von DAKO bedeckt. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS, wurden die Schnitte mit dem Chromogen DAB für fünf Minuten behandelt und nochmals mit PBS gewaschen.

Die Gewebepräparate, die im Anschluss **mikrodissektiert** werden sollten, wurden nach der Hydratisierung für 1,5 Minuten in Hämalaun getaucht. Danach wurde für je 2,5 Minuten zweimal mit frischem Leitungswasser sowie mit Aqua destillata gespült. Nun wurden die Schnitte für eine Minute in Eosin gestellt. Wiederholt wurde gründlich mit Leitungswasser, dann mit Aqua destillata gespült.

Schließlich wurden sowohl die immunhistochemisch, als auch die HE-gefärbten Schnittpräparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je eine Minute in 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol, und für zwei Minuten in 100 % Ethanol **entwässert**.

Letztlich wurden die HE-gefärbten Schnitte für die Mikrodissektion für etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Anti-LASP-1- und Anti-PDEF-

gefärbten Gewebeschnitte wurden über Xylol als Intermedium mit Vitro-Clud verschlossen.

### **2.2.5 Histopathologische Befundung der LASP-1-Expression**

Die histopathologische Befundung der LASP-1-Expression aller angefertigten LASP-1-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte im Anschluss gemäß GRUNEWALD ET AL. 2007 [32]. Die gesamte Schnittserie wurde teilweise von vier, namentlich Frau Prof. Dr. rer. hum. biol. Ulrike Kämmerer (Universitäts-Frauenklinik, Würzburg), Frau Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt-Dörje (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor, Universität Würzburg), Herrn Dr. med. Thomas Grünewald (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) und mir (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor, Universität Würzburg) und teilweise nur von zwei, Herrn Dr. med. Thomas Grünewald und mir, unabhängig von einander befundet.

Dabei wurden die von GRUNEWALD ET AL. geforderten 10 high-powerfields in 40 x Vergrößerung begutachtet. Den Schnitten wurde gemäß der Färbeintensität der Tumorzellen ein Punktwert, der sogenannte LASP-1-Score zugeordnet. Dabei wurde keiner visuell nachweisbaren LASP-1-Expression der Punktwert 0, bis zu sehr starker LASP-1-Expression, entsprechend der Punktwert 3 zugeordnet. Aus den beobachteten Färbeintensitäten der Tumorzellen eines Schnittes war dabei der Mittelwert zu bilden.

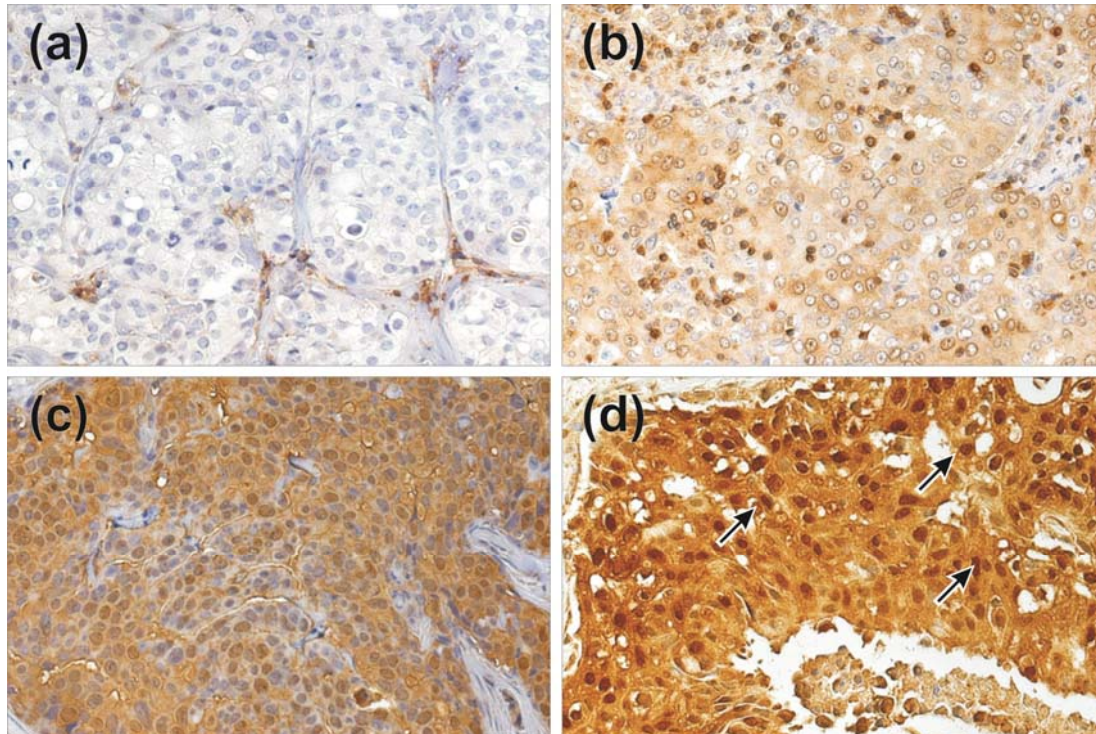
Auch wurde von allen Gutachtern versucht, die Zahl der tumorösen Zellen eines Gewebepreparates, die überhaupt ein Färbeverhalten für LASP-1 zeigten, in einer Prozentzahl zu quantifizieren. Je nach erreichtem Prozentwert, wurde den Gewebeschnitten ein weiterer Punktwert semiquantitativ zugeordnet. Schnitten, die etwa 0 bis 19 % LASP-1-positiv gefärbte Zellen enthielten, wurde – ungeachtet der Färbeintensität – der Punktwert 0 zugeordnet. Waren 20 bis 39 % gefärbt, wurde das Schnittpräparat mit dem Punktwert 1, bei 40 bis 59 % mit dem Punktwert 2, bei 60 bis 79 % mit dem

Punktwert 3 und bei 80 bis 100 % mit dem Punktwert 4 bewertet. Jedem histologischen Schnittpräparat wurde also ein Punktwert für seine Färbeintensität und ein Punktwert für den prozentualen Anteil der gefärbten Zellen zugeordnet.

Bei später festgestellten Divergenzen der Begutachter hinsichtlich der vergebenen Punktwerte, wurde das jeweilige Gewebepräparat von allen Untersuchern erneut bewertet und ein Konsens gefunden. Dies war jedoch nur in weniger als 7 % aller angefertigten Schnitte notwendig.

GRUNEWALD ET AL. multiplizierten die erreichten Punktwerte in Anlehnung an die Leitlinien für die Bewertung des Hormonrezeptor Immunreaktiven-Scores [2]. Das Ergebnis ist der LASP-1-Immunreaktive-Score (LASP-1-IRS), der von 0 bis maximal 12 variieren kann. Die Zahlenwerte 5, 7, 10 und 11 sind dabei rein rechnerisch aber nicht zu erzielen.

**Abb. 1: Histologie Anti-LASP-1-gefärbter Schnittpräparate**



LASP-1-Score (a) = 0; (b) = 1; (c) = 2; (d) = 3; (d) positive nukleäre LASP-1-Lokalisation, Kernfärbung hebt sich deutlich von Hintergrundfärbung ab, mehr als 10 % der Kerne zeigen positives Färbeverhalten; 20-fache Vergrößerung

GRUNEWALD ET AL. stuften die Schnitte mit Werten des LASP-1-IRS bis 5 als LASP-1-negativ, alle darüber als LASP-1-positiv ein. Negativ bedeutet in diesem Zusammenhang ein geringes Expressionsniveau, positiv hingegen spricht für eine hohe Expression von LASP-1. Der „cut off“-Wert 5 wurde hierbei als Ergebnis statistischer Überlegungen gewählt.

Daneben richtet sich der nukleäre Status eines Gewebeschnittes nach dem prozentualen Anteil an Zellkernen des Präparates, die ein spezifisches Färbeverhalten gegen LASP-1 zeigen. Dabei ist es unbedeutend wie intensiv die Kerne gefärbt sind, sie sollten sich dennoch deutlich von der Hintergrundfärbung abheben. Sind mehr als 10 % aller Kerne LASP-positiv gefärbt, so wurde der Gewebeschnitt als Nukleus-positiv bewertet. Auch bei dieser Beurteilung war aus der Anzahl der gefärbten Kerne auf dem gesamten Schnitt der Mittelwert zu bilden. Die Klassifikation der nukleären LASP-1-Färbung erfolgte analog der Stratifikation gegen den Proliferationsmarker Ki67 gefärbter Gewebeschnitte [84].

### **2.2.6 Histopathologische Befundung der PDEF-Expression**

TURNER ET AL. gelang es 2008 unter anderem LASP-1 als vermeintliches Zielgen von PDEF zu identifizieren. Sie konnten in vitro an MCF-7 Brustkrebszellen zeigen, dass ein Knockdown des PDEF-Proteins zu einer gesteigerten Expression von uPA und LASP-1 sowie zu einer Verringerung von VASP mRNA führt. Analog dazu zeigten MDA-MB Brustkrebszellen mit einem hohen PDEF-Proteinspiegel eine niedrige LASP-1 Expression [88].

Für histologische Präparate von Mammakarzinomata sollte dies theoretisch bedeuten, dass Gewebeproben, die viel LASP-1 exprimieren, also mit einem hohen LASP-1-IRS klassifiziert wurden, wenig PDEF exprimieren und vice versa. Um die Übertragbarkeit der Zellkulturexperimente auf Gewebeschnitte zu untersuchen, wurden zusätzlich histologische Präparate von zuvor als LASP-1-IRS 0 bis 2 sowie als LASP-1-IRS 9 bis 12

klassifizierten Patienten angefertigt und diese mit einem Antikörper gegen PDEF gefärbt.

### **2.2.7. Statistische Analysen und Berechnungen**

Die Assoziationen zwischen der nukleären oder zytosolischen LASP-1-Lokalisation wurden mittels multivariater und nicht-parametrischer Berechnungen ausgewertet. Dies gelang unter Zuhilfenahme des Fisher's exact (F)- und des Mann-Whitney (M)-Tests, basierend auf einer Computersoftware, Graph Pad Prism für Microsoft® Windows™ (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). P-Werte kleiner 0,05 wurden dabei als statistisch signifikant betrachtet.

### **2.2.8 Laser Mikrodissektion**

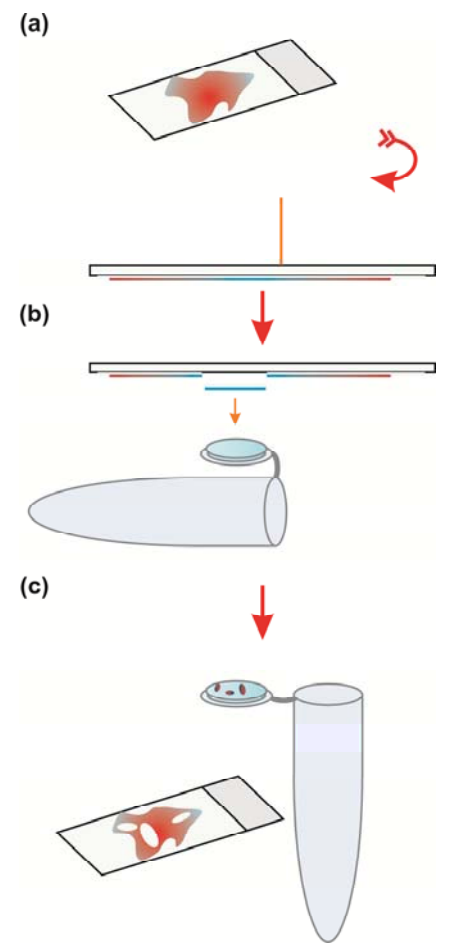
Histomorphologisch sind Tumore äußerst heterogene Gewebe. Proliferierende und nicht proliferierende Tumorzellen liegen zusammen im Verbund mit nicht tumorösen Stroma- und Entzündungszellen sowie nekrotischem Gewebe. TOMASSETTO ET AL. verwandten für ihre Untersuchungen das gesamte histologisch aufgearbeitete Gewebe von Operationsresektaten ohne Separation [85]. Zunehmende Mengen nicht-tumoröser und daher kontaminierender Zellen führen aber zu einer signifikanten Abnahme der Detektionsempfindlichkeit an Genkopien. Man kann sagen, dass nicht tumoröse Zellen die Tumor-DNA „verdünnen“. Zusätzlich enthalten nekrotisches Gewebe und inflammatorische Zellen degradierte DNA. Um hinreichend verlässliche Ergebnisse zu erhalten, ist es deshalb notwendig, mehr als 50 % Tumorzellen zu isolieren [43].

Die **Laser Mikrodissektion (LMD)** ist eine lasergestützte Mikrodissektionstechnik, mit der bestimmte Zellen oder ganze Areale eines Gewebeschnittes selektiv entnommen werden können, ohne dabei das umliegende Gewebe zu zerstören. Erstmals wurde diese Technik 1996 von EMMERT-BUCK ET AL. beschrieben und in Zusammenarbeit mit dem NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (Washington, USA) entwickelt [19].

Dabei sind prinzipiell zwei verschiedene Verfahren zu unterscheiden. Bei der **Laser Capture Microdissection (LCM)** „brennt“ ein Infrarot-Laser mit einer Temperatur von etwa 70°C die ausgewählten Zellen oder Gewebeareale in eine thermolabile Ethyl-Vinyl-Acetat (EVA)-Membran, die **über** das histologische Schnittpräparat gelegt wird. Wird die Folie abgehoben, so bleiben die „eingebrennten“ Zellen daran anhaften. Diese werden in einem weiteren Schritt dann abgelöst. Das umgebende Gewebe auf dem Schnitt bleibt davon unberührt. Die **Laser Microbeam**

**Microdissection (LMM)** hingegen nutzt einen Infrarot- oder UV-A-Laser um eine Polyethylennaphthalat (PEN)-Membran auf dem Objektträger (aber **unter** dem Gewebe) zu zerschneiden. Im Gegensatz zur LCM wird das ausgeschnittene Gewebe beim LMPC-System (Laser Microdissection and Pressure Catapulting) von Zeiss gegen die Gravitation in ein Reaktionsgefäß katapultiert oder fällt durch die Schwerkraft beim Leica-System in ein solches. Das sich auf den beschichteten Objektträgern befindliche Gewebe wird nicht mit Deckgläschen verschlossen. Nach ELLSWORTH ET AL. 2002 scheinen die beschichteten Objektträger von Leica klar den unbeschichteten überlegen zu sein. Es

**Abb. 2: Ablauf der LMD**



**(a)** Beschneiden des histologischen Schnittpräparates in umgekehrter Lage; **(b)** Ausschnitt fällt in Deckel des Reaktionsgefäßes; **(c)** Übersicht

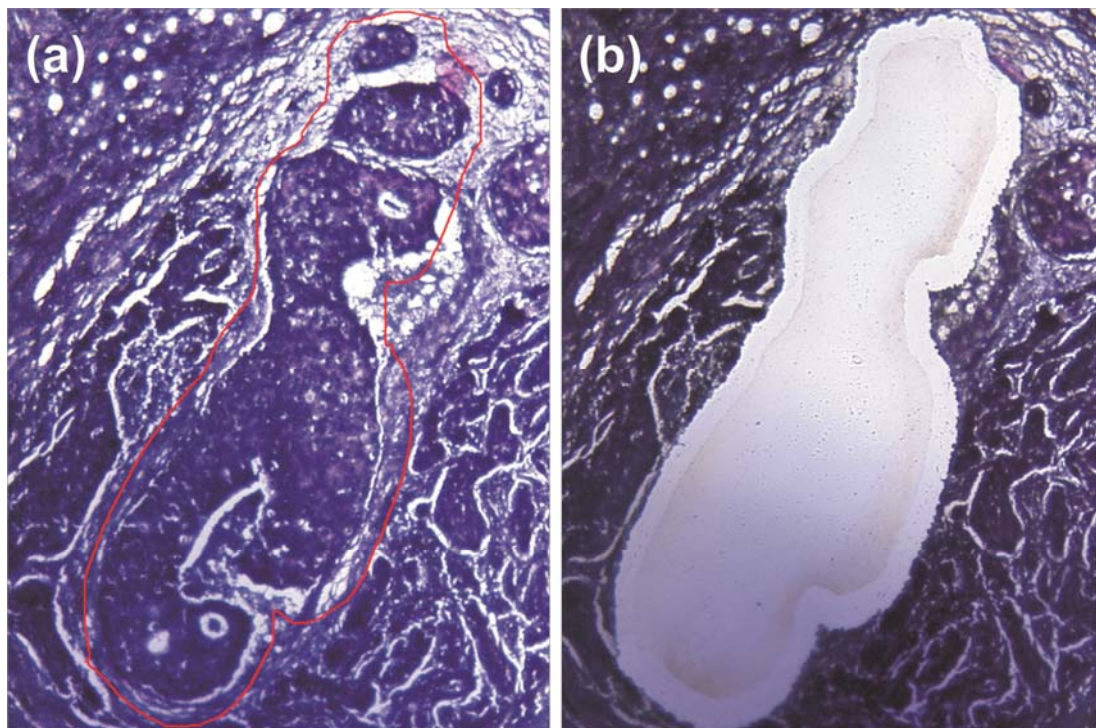


gelang ihnen mit Hilfe der beschichteten Objektträger, effizienter zu arbeiten und nahezu alle ausgewählten Zellen mit dem ersten Versuch auszuschneiden [18].

Die Möglichkeit, bei geringer Ausgangsmenge an Zellmaterial, spezifisch bestimmte Zellen in hoher „Reinheit“ zu asservieren und während des Dissektionsvorganges das Ursprungsgewebe nach histologischen Kriterien zu beurteilen, machte die Anwendung dieser Mikrodissektionstechnik für uns zur essentiellen Kondition.

Ich verwendete bei den Untersuchungen ein LMD-Gerät von Leica und folgte im Weiteren den Ausführungen von LEHMANN ET AL. 2001 [49]. Das Gerät besteht aus einem aufrechten Leica Untersuchungsmikroskop, einer Lasereinheit, einer analogen Hitachi 3 CCD-Kamera und einem Computer, zur Dokumentation und Steuerung der Dissektion. Für das Mikroskop sind Objektive von 1,25 x bis 150 x Vergrößerung erhältlich. Unter dem Objektisch des Mikroskops befindet sich eine Vorrichtung zum Einspannen der Reaktionsgefäße. Dies geschieht so, dass der Deckel des Reaktionsgefäßes horizon-

**Abb. 3: Laser Mikrodissektion**



**(a)** Auswahl des gewünschten Zellareals unter Zuhilfenahme der Computersoftware; **(b)** nach dem Dissektionsvorgang verbleibendes histologisches Schnittpräparat; 20-fache Vergrößerung

tal ausgerichtet unter dem Objektträger einrastet. Nachdem der Objektträger invertiert auf dem Objektstisch arretiert wurde, kann mittels einer Steuereinheit aus zwei Radschrauben für die zweidimensionale Positionierung des Präparates in einer horizontal gelegten Ebene, und unter Sichtkontrolle über den Computerbildschirm das Gewebeareal von Interesse eingestellt werden. Mit der Computermouse wird dann, visualisiert durch den Cursor, das Gewebe umrandet, das sogleich von einem gepulsten 355 nm Diodenlaser umfahren wird. Danach fällt das Gewebestück durch sein eigenes Gewicht in den darunter befindlichen Deckel des Reaktionsgefäßes. Die Computersoftware gestattet es dabei, die Pulsfrequenz und die Leistung des Lasers je nach Anforderung zu variieren und das beschnittene Gewebe auszumessen (siehe **Abbildungen 2 und 3**).

Beim Dissektionsvorgang wurde durch die Benutzung von Handschuhen auf die Minimierung möglicher Kontaminationen der Proben geachtet. Es wurde stets versucht ausreichend tumoröses Gewebe auszuschneiden. Bei einer Ausbeute unter 200.000 - 250.000  $\mu\text{m}^2$ , wurde der entsprechende Gewebeschnitt erneut angefertigt und mikrodisektiert.

### 2.2.9 Gewebeverdau mit Proteinase K

In den Reaktionsgefäßen, in die das ausgeschnittene Tumorgewebe fallen sollte, wurden 29  $\mu\text{l}$  eines Lysepuffers vorgelegt. Dieser Lysepuffer bestand aus 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, sowie 0,5 % Tween 20 und wurde auf pH 8,1 titriert (siehe **Appendix, 6.5 Verwendete Protokolle**). Tween 20 wurde anstatt SDS gewählt, da es PCR-kompatibel ist und den Verlust an DNA minimiert [49]. Nachdem hinreichend tumoröses Gewebe ausgeschnitten werden konnte, wurde dem Puffer 1  $\mu\text{l}$  Proteinase K [3 mU/ml Lösung] zugefügt, und das Reaktionsgefäß für circa 60 Stunden bei 37°C im Brutschrank in inverser Position inkubiert. Diese Werte für Temperatur und Inkubationsdauer konnten in verschiedenen Vorversuchen ermittelt werden und führten zu

den besten Ergebnissen. Im Anschluss daran wurden die Reaktionsgefäße für drei Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Durch 8-minütiges Erhitzen auf 95°C wurde dann die Proteinase K inaktiviert. Nach erneuerter Zentrifugation wurden die Proben im Eisfach bei - 20°C bis zu weiteren Untersuchungen aufbewahrt. Dort kann man sie über Monate aufbewahren [49]. Um Kontaminationen zu minimieren, wurde auch hier strengstens auf saubere Bedingungen und die Benutzung von Handschuhen geachtet.

### 2.2.10 Gewebeaufreinigung

Um die mittels Mikrodissektion und anschließendem Proteinase K-Verdau gewonnene DNA aufzureinigen, wurden von der peqlab Biotechnologie GmbH zwei DNA-Isolations-Kits, peqGOLD Tissue DNA Mini Kit und peqGOLD MicroSpin Tissue DNA Kit verwendet. Die Aufreinigung der DNA aus den Proben erfolgte, um interferierende oder gar inhibitorische Effekte restlicher Zellbestandteile oder Färbereagenzien zu minimieren. Das peqGOLD Tissue DNA Mini Kit erlaubt die Aufreinigung großer DNA Moleküle bis 60 kbp, maximal 30 µg genomischer DNA, was etwa 30 mg Gewebe oder  $1 \cdot 10^7$  Zellen entspricht. Mit dem peqGOLD MicroSpin Tissue DNA Kit lassen sich DNA-Fragmente bis 40 kbp, maximal 10 µg genomischer DNA oder 10 mg Gewebe, d.h. etwa  $5 \cdot 10^6$  Zellen reinigen. Die Aufreinigung der verwendeten Gewebe- und Zellproben erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Beide Kits enthalten spezielle Hi-Bind®-Säulen, auf die die Gewebeproben, nach Verdau mit einer eigenen Protease OB<sup>TM</sup>, geladen werden. Weiter sind gesonderte Puffer enthalten, die in bestimmter Abfolge durch die Säulen zentrifugiert werden. Ein Elutionspuffer erlaubt dann letztlich das Auslösen der in der Säule spezifisch gebundenen DNA.

Dadurch ist es möglich die mit dem Gewebeschnitt ausgeschnittene PEN-Membran, sowie im Schnitt enthaltene Färbebestandteile, Zellmembranreste und dergleichen abzutrennen.

### 2.2.11 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Nukleinsäuren haben, ebenso wie Aminosäuren, die Eigenschaft ultraviolettes Licht zu absorbieren. Das Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren liegt bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$ , bei Proteinen aufgrund der Reste aromatischer Aminosäuren bei  $280 \text{ nm}$ .

Für eine DNA-Probe in hoher Reinheit beträgt das Verhältnis der optischen Dichte bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  zu  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ,  $OD_{260}/OD_{280}$  etwa 1,8. Dabei sprechen niedrigere Werte des Quotienten für größere Verunreinigungen durch Proteine und umgekehrt.

Eine Probe wird dabei in einer bestimmten Verdünnung (10- bis 50-fach) in eine Küvette pipettiert, durch die Licht definierter Wellenlänge fällt. Beim Durchtritt durch die Probe wird ein bestimmtes Spektrum der Lichtstrahlen absorbiert. Aus dem Verhältnis von ein- und ausfallendem Licht lässt sich dann auf die DNA-Konzentration der Probe rückschließen. Die Konzentration berechnet sich dann gemäß folgender Formel:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorption}_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \quad (1)$$

Optische Messungen von Verdünnungsreihen reiner DNA bei bekannten Konzentrationen ergaben, dass eine  $OD_{260} = 1$  für doppelsträngige DNA einer Konzentration von etwa  $50 \mu\text{g/ml}$ , für einzelsträngige DNA von etwa  $40 \mu\text{g/ml}$  und bei Oligonukleotiden von etwa  $20 \mu\text{g/ml}$  entspricht [74].

Bei einem durchschnittlichen Zellvolumen von  $0,211 \text{ fm}^3$ , bei einem angenommenen Zelldurchmesser von  $7,5 \mu\text{m}$ , einer mikrodisektierten Gewebefläche von  $200.000 - 250.000 \mu\text{m}^2$  und einer Schichtdicke von  $4 \mu\text{m}$  gefrorenem Gewebe, was etwa  $8 \mu\text{m}$  aufgetaut entspricht, sowie einem durchschnittlichen DNA-Gewicht von  $6 \text{ pg}$  pro Zelle, ergibt sich für die pro mikrodisektierten Schnitt zu erwartende Menge an DNA mindestens:

$$\frac{\text{Fläche}_{\text{LMD}} \cdot \text{Dicke}_{\text{Schnitt}}}{\text{Volumen}_{\text{Zelle}}} \cdot m_{\text{Zell-DNA}} = m_{\text{DNA}} \quad (2)$$

$$\frac{2,0 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \cdot 8 \cdot 10^{-6} \text{ m}}{0,221 \cdot 10^{-15} \text{ m}^3} \cdot 6 \cdot 10^{-12} \text{ g} = \underline{\underline{43,5 \text{ ng}}}$$

Da die Gewebeprobe in 29  $\mu\text{l}$  Lysepuffer und 1  $\mu\text{l}$  Proteinase K lysiert wurde, ergibt sich eine etwaige zu erwartende DNA-Konzentration von  $43,5 \text{ ng}/30 \mu\text{l} = \underline{\underline{1,45 \text{ ng}/\mu\text{l}}}$ .

### 2.2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren, das aus sich wiederholenden Temperaturabfolgen besteht und zur Vervielfältigung von DNA dient. Durch diese Methode werden die ursprünglichen DNA-Matrizen, die sogenannten Templates, sequenzspezifisch amplifiziert. Nachdem die doppelsträngige Matrize in einem ersten Schritt durch hohe Temperaturen denaturiert, d. h. in zwei Einzelstränge getrennt wurde, erfolgt in einem zweiten Schritt das Annealing oder Anlagern der Oligonukleotidprimer an ihre komplementären Sequenzen auf der nun einzelsträngigen Matrize. Die Primer werden dabei so gewählt, dass sie den DNA-Bereich, der vervielfältigt werden soll, flankieren. Darauf folgt in einem dritten Schritt die Elongation, die Neusynthese der DNA in 5'  $\rightarrow$  3'-Richtung durch eine DNA-Polymerase. Diese Abfolge aus Erhitzen, Annealing und Elongation wird periodisch wiederholt. Mit jeder Schleife dieser Wiederholung verdoppelt sich theoretisch die ursprünglich vorhandene Template-Menge. Dieses Verfahren wurde anfangs der 1980er Jahre von KARY BANKS MULLIS entwickelt [63]. Die für das Denaturieren benötigte Zeit ist von der Länge des Templates abhängig. Je kürzer das Template, desto effizienter die Denaturierung und desto effizienter die Amplifikation. Ausgehend von einer Extensionsrate von 30 bis 70 Basen pro Sekunde, sind für die Elongation, je nach Polymerase und Templatelänge, durchschnittlich 15 Sekunden ausreichend [4].

Für die PCR wurde ein von Qiagen vorgefertigtes Mastermix verwendet, der laut Hersteller bereits Taq DNA Polymerase, PCR Puffer, 3 mM  $\text{MgCl}_2$  sowie 400  $\mu\text{M}$  jedes Desoxyribonukleosidtriphosphats enthält. Dabei wurde 1/25 Volumen der mikrodessektierten und lysierten Gewebeproben, je 1/25 Volumen eines 5  $\mu\text{M}$  1:1 forward und reverse Primergemisches, 5/25 Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  zusammen mit 17/25 Volumen Master-

mix pipettiert. Als Kontrolle wurde einen Negativansatz ohne DNA und eine Positivkontrolle mit 1/25 Volumen aufgereinigter BT-20-Kulturzellen-DNA gebraucht. Die Reaktionsansätze wurden auf ein Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert. Die PCR wurde durch einen Denaturierungsschritt bei 95°C für fünf Minuten eingeleitet. Darauf folgten 35 Wiederholungen einer Abfolge, bestehend aus je 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, Annealing bei 57°C und Elongation bei 72°C.

In Vorversuchen wurde durch Verwendung verschiedener Primerkonzentrationen anhand der in der anschließenden Gelelektrophorese detektierten Banden die optimale Primermenge bestimmt. Außerdem wurde mittels eines Temperaturgradienten die Annealingtemperatur optimiert.

Mit allen mikrodisektierten und lysierten Proben wurde zunächst eine PCR durchgeführt. Zur Analyse wurden alle PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.13 Oligonukleotidprimer

Um mittels der PCR einen bestimmten Bereich genomischer DNA zu vervielfältigen, wurden Oligonukleotidprimer benötigt. Diese Primer bestehen aus den komplementären Sequenzen zu den Basenfolgen, die den gewünschten, zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren.

Mit Hilfe des Genom-Browsers ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>) konnte die LASP-1-zugehörige Gensequenz ermittelt werden. Für die Erstellung der LASP-1-Primer wurden drei Exons, eines im Bereich der LIM-, eines im Bereich der SH3-Domäne und eines in der Mitte des Gens ausgewählt. Als internen Standard wählten wir das „housekeeping“ Gen GAPDH, für das bekannt ist, dass es in fester Anzahl an Genkopien vorliegt.

Generell ist zu beachten, dass die optimale Länge eines Primers zwischen 15 und 20 Basen und das Verhältnis Guanin/Cytosin zwischen 0,2 - 0,7 liegen sollte. Außerdem

sollten aufeinanderfolgen einzelner Nukleotide, besonders von Guanin- und Cytosinbasen, vermieden werden. Die Schmelztemperatur zweier zusammengehöriger Primer sollte sich um nicht mehr als 1 - 2°C unterscheiden. Primer sollten in einer Endkonzentration von 50 - 200 nM verwendet werden. Des Weiteren wurde stets darauf geachtet, keine Bereiche auszuwählen, die nicht-kodierende Sequenzen oder Polymorphismen enthalten [4, 54].

Das Programm PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) wurde schließlich benutzt, um die Primer zu designen. Nach einigen Optimierungsversuchen zeigte das zweite Primerpaar, das einen Bereich in der Mitte des LASP-1-Gens amplifizierte, das für den verwendeten Versuchsaufbau optimale Verhalten. Ich entschloss mich daher, die weiteren Untersuchungen ausschließlich mit diesem Primerpaar durchzuführen. Alle im Weiteren als LASP-1 bezeichneten Primer beziehen sich auf den hier genannten Primer LASP-1-2.

Das Design des GAPDH-Primerpaares verlief analog.

Alle Primerpaare wurden von der Operon Biotechnologie GmbH bezogen.

#### **2.2.14 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA**

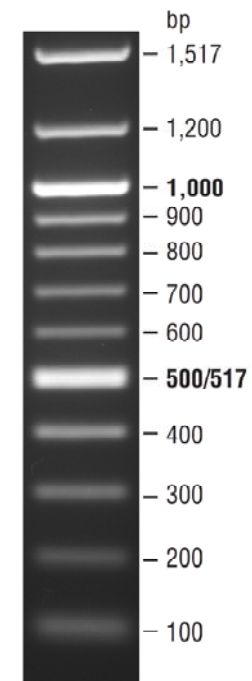
Die Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode um DNA oder RNA ihrer Größe nach, mittels angelegter Spannung aufzutrennen. Dabei wird mit Hilfe von Agarose eine Trägermatrix geschaffen, die je nach Konzentration „dichter“ ist, und die Nukleinsäurestränge mehr oder minder stark zurückhält. Insgesamt gilt, dass kleinere Fragmente schneller durch gleich konzentrierte Agarose wandern als größere. Man benötigt also höher-prozentige Agarosegele um kleinere Fragmente aufzutrennen, während größere Fragmente in einem niedrig-prozentigen Agarosegel am besten „laufen“.

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente aus der PCR mit LASP-1- beziehungsweise GAPDH-Primern wurden ein etwa 180 bp großes Fragment für LASP-1 und ein 320 bp großes Fragment für GAPDH erwartet, so dass 1,2 bis 1,5 %ige Agarosegele mit 40 nl/ml Ethidiumbromid Anwendung fanden. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert in, das heißt es lagert sich zwischen, doppelsträngige DNA. Durch die Interkalation wird das Absorptionsspektrum verändert, die Intensität der Fluoreszenz-emission aber etwa um den Faktor 50 - 100 gesteigert. Als Elektrophoresepuffer diente ein 1 x TBE-Puffer. 5 µl des PCR-Ansatzes wurden zusammen mit 3/5 Volumen H<sub>2</sub>O und 1/5 Volumen 1 x DNA-Ladepuffer, insgesamt also 25 µl, in die Geltaschen aufgetragen und bei angelegten 120 V und 95 mA für 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zugabe eines Ladepuffers dient der Erhöhung des spezifischen Gewichts der Probe und ermöglicht den Fortschritt der Elektrophorese anhand einer sichtbaren Lauffront zu verfolgen.

Nach Beendigung der Laufzeit wurde das Gel auf einen Transluminator (Gel Jet Imager) gelegt, um die DNA-Banden mit kurzwelligem UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 254$  nm sichtbar zu machen. Dies geschah zeitnah und zügig, um die Diffusion der Probe im Gel gering zu halten. Ein mitgeführter Längenstandard, ein 100 bp DNA-Leiter (siehe **Abbildung 4**), ermöglicht die Identifikation der jeweiligen Banden. Mit Hilfe einer in das Gerät integrierten schwarz-weiß-CCD Kamera, die an einen Computer mit Dokumentationssoftware angeschlossen ist, wurde die elektrophoretische Auftrennung aufgezeichnet, ein Thermoprint angefertigt und die zugehörige Bilddatei gespeichert.

Dies diente der Überprüfung des regelrechten Ablaufs der PCR, letztlich aber auch ob Mikrodissektion und Lyse erfolgreich verlaufen waren.

**Abb. 4: DNA-Größenmarker**



**100 bp DNA Ladder**  
1.3% TAE agarose gel.  
Mass values are for  
0.5 µg/lane.

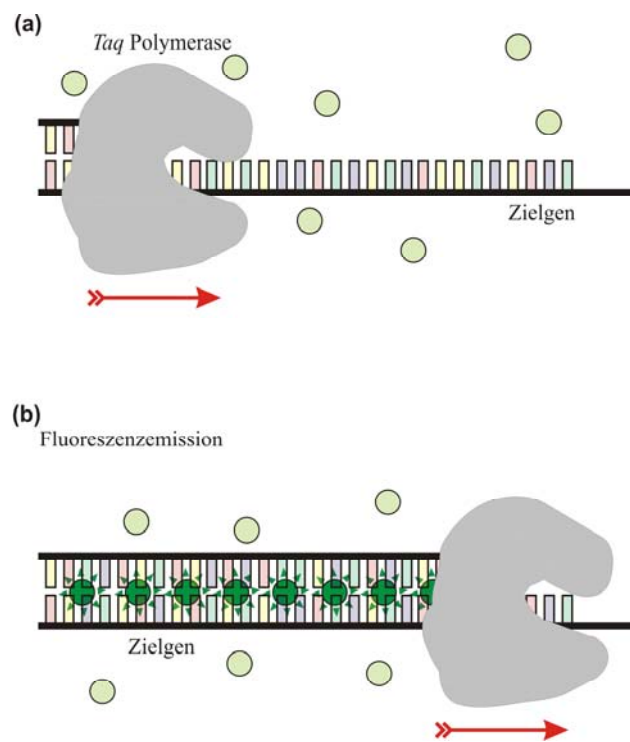


### 2.2.15 Quantitative Real-Time-PCR

Die Funktionsprinzipien der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) basieren im Wesentlichen auf denen der konventionellen PCR. Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, bei der man nur theoretisch abschätzen kann, wie viel Produkt nach einer bestimmten Anzahl an Zyklen entstanden ist, erlaubt es die qRT-PCR den Verlauf der Wiederholungsschleifen und des Produktanstiegs in Echtzeit zu verfolgen und das synthetisierte Produkt zu quantifizieren. Natürlich besteht auch bei der herkömmlichen PCR die Möglichkeit, den Anstieg des Produkts nahezu in Echtzeit zu beobachten. Dazu kann man das Programm der herkömmlichen PCR nach einer bestimmten Anzahl an Schleifen anhalten, ein Aliquot entnehmen und es elektrophoretisch auftrennen. Dies wäre aber zu aufwändig, zu umständlich und viel zu ungenau.

Die Entwicklung von der herkömmlichen zur quantitativen Real-Time-PCR vollzog

**Abb. 5: Prinzip von SYBR® Green I [gemäß 62]**



**(a)** Taq Polymerase synthetisiert komplementären Strang, SYBR® Green I in Lösung (hellgrüne Kugeln); **(b)** SYBR® Green I hat sich zwischen die DNA gelagert und fluoresziert (dunkelgrüne Kugeln)

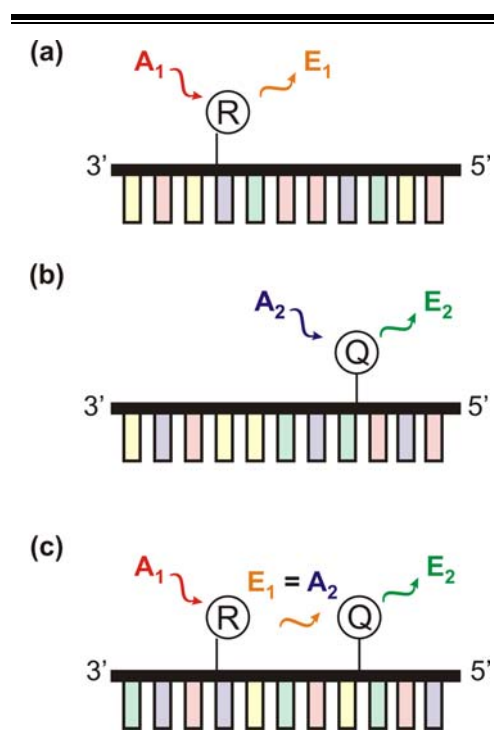
sich folgendermaßen. Im Zuge neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse, halfen weiterentwickelte PCR-Geräte, die mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera ausgestattet waren, HIGUCHI ET AL. 1992, 1993, dem Problem der mangelnden Genauigkeit der Quantifizierung zu entgegen [37, 38]. Dazu fügten sie den Reaktionsansätzen zusätzlich Ethidiumbromid hinzu und registrierten die Veränderung des Absorptionsspektrums sowie der Intensität der Fluoreszenzemission durch die Interkalation des Farbstoffes in die Nukleinsäuren (siehe **Abbil-**

**dung 5)**! Mit jeder zusätzlichen Kopie der ursprünglichen DNA-Matrize, bindet auch mehr Ethidiumbromid. Damit kann mit steigender Menge des Produkts ein Fluoreszenzanstieg mit der CCD-Kamera detektiert werden. Leider ist diese Methode sehr unspezifisch, da sich Ethidiumbromid nicht ausschließlich an bestimmte Strukturen anlagert. Folglich muss ausgeschlossen werden, dass das Amplikon, nicht dem gewünschten Produkt entspricht. Ein großer Vorteil des Ethidiumbromids ist seine universale Verwendbarkeit und die große resultierende Signalstärke. Heute werden allerdings andere Farbstoffe, wie SYBR® Green I verwendet.

Beim Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wird ein Fluorochrom mit Licht einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda_{A1}$  bestrahlt, wodurch es angeregt wird (siehe **Abbildung 6**). Die dabei aufgenommene Energie wird aber gleich wieder abgegeben und Licht einer bestimmten veränderten Wellenlänge  $\lambda_{E1}$  emittiert. Absorptions- und Emissionsspektrum sind dabei spezifisch für das jeweilige Fluorochrom. Bringt man nun in die Nähe des ersten ein zweites Fluorochrom, so kann dies, sofern beide Fluorochrome entsprechend gewählt werden ( $\lambda_{E1} = \lambda_{A2}$ ) durch das emittierte Licht  $\lambda_{E1}$  des ersten Fluorochromes angeregt werden. Das zweite Fluorochrom emittiert dann Licht einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda_{E2}$ . Je nach detektierter Wellenlänge  $\lambda_{E1}$  oder  $\lambda_{E2}$ , kann auf die räumliche Entfernung der Fluorochrome zueinander geschlossen werden. Dies ist die noch heute gültige Grundlage [6].

Zusammen mit den Erkenntnissen von HOLLAND ET AL. 1991 und den gewonnenen Erfahrungen mit der FRET mündete der wissen-

**Abb. 6: Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer**

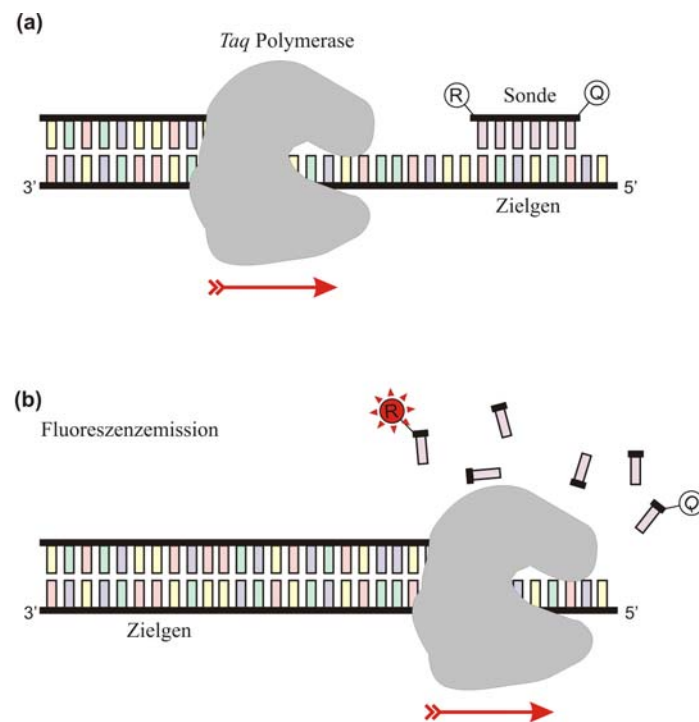


(a) Absorptions- und Emissionsspektrum des Reporters R sowie (b) des Quencher Q; (c) gegenseitige Stimulation, wenn Emissionsspektrum  $E_1$  des Reporters R mit dem Absorptionsspektrum  $A_2$  des Quencher Q übereinstimmt

schaftliche Fortschritt in der Entwicklung dreier ähnlicher Nachweismethoden [6, 39]. LIVAK ET AL. entwickelten 1995 das **TaqMan®-Prinzip** (auch als **Hydrolysis Probes** bezeichnet; siehe **Abbildung 7**), bei dem anstatt einer radioaktiven Markierung eines Endes, ein Fluoreszenzmolekül am Anfang und eines am Ende desselben Oligonukleotids sitzt. Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die messbare Emission bei  $\lambda_{E1}$  gering, da sie durch das zweite Fluorochrom absorbiert wird. Durch die  $5' \rightarrow 3'$ -Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wird das Oligonukleotid abgebaut und die Fluorochrome räumlich voneinander getrennt, so dass die Fluorochrome sich nicht mehr gegenseitig stimulieren. Dies wird durch einen Anstieg der Emission bei  $\lambda_{E1}$  messbar. Will man die Emission  $\lambda_{E1}$  messen, so bezeichnet man dieses Fluorochrom als Reporter (engl. to report, berichten) und das zweite als Quencher (engl. to quench, löschen). Die Benutzung der TaqMan®-Oligonukleotide sowie von SYBR® Green I habe ich meinen

qRT-PCR-Versuchen zu-  
grundegelegt [56].

**Abb. 7: Prinzip fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide**  
[gemäß 62]



**(a)** Taq Polymerase synthetisiert komplementären Strang, Oligonukleotid hat hybridisiert, keine messbare Emission des Reporters R; **(b)** Oligonukleotid durch  $5' \rightarrow 3'$ -Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase hydrolysiert, Reporter R und Quencher Q dissoziieren, detektierbare Emission des Reporters

Aus Gründen der Vollständigkeit sollen die beiden anderen Nachweismethoden noch kurz Erwähnung finden.

**Molecular beacons** sind eine Weiterentwicklung der TaqMan-Sonden [90]. Das Oligonukleotid enthält zusätzlich an seinen Enden zueinander komplementäre Sequenzen, wodurch es zur Ausbildung einer Haarnadelstruktur kommt. Auch hierbei ist gewährleistet, dass sich die Fluorochrome nahe genug kommen, um sich gegen-

seitig zu anzuregen. **Hybridization Probes**, die bei der letzten Methode Anwendung finden, bestehen aus zwei Oligonukleotiden, die jeweils nur ein Fluorochrom tragen. Diese hybridisieren in einem Abstand von eins bis fünf Nukleotiden zueinander auf dem gleichen DNA-Strang. In diesem Fall wird Licht der Emission  $\lambda_{E2}$  gemessen. Dies ist nur so lange möglich, wie die räumliche Distanz zwischen beiden Fluorochromen minimal ist.

Das iCycler iQ<sup>TM</sup> System von Bio-Rad besteht aus einem gewöhnlichen PCR-Gerät mit einem Anregungs- und einem Detektionssystem. Das Anregungssystem setzt sich zusammen aus einer Lichtquelle, einer Wolfram-Halogenlampe, einem Infrarotfilter, einem Rad mit sechs verschiedenen optischen Filtern, darunter ein lichtdichter Filter sowie zwei Spiegel, die so angeordnet sind, dass eine 96-Well-Platte simultan belichtet werden kann. Das Detektionssystem besteht aus einem identischen Rad von sechs verschiedenen Emissionsfiltern, einem Bildverstärker und einem CCD-Detektor. Der von der Lichtquelle ausgehende Lichtstrahl durchläuft den IR-Filter, den ausgewählten Farbfilter und trifft schließlich auf die 96-Well-Platte. Das eintreffende Licht regt die Fluoreszenzfarbstoffe in den Wells zur Emission an. Die emittierten Lichtstrahlen werden weiter durch den ausgewählten Farbfilter geleitet. Nachdem das Fluoreszenzsignal durch den Verstärker intensiviert wurde, wird es durch den 350.000 Pixel CCD-Detektor sehr diskret quantifiziert. Mit Hilfe eines Computers und der zugehörigen Software lässt sich der iCycler steuern und die Versuchsergebnisse auswerten.

Für die qRT-PCR mit den fluoreszenzmarkierten Sonden fand ein von Bio-Rad vorgefertigter 2 x konzentrierter iQ<sup>TM</sup> Supermix Verwendung, der laut Hersteller 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, 1,6 mM dNTPs, 50 units/ml iTaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase, 6 mM MgCl<sub>2</sub> sowie Stabilisatoren bei pH 8,4 enthält. Dabei wurden 12,5 µl des Supermix, 1 µl des jeweiligen 5 µM Primergemisches, der entsprechenden 5 µM Sonde sowie 1 µl der lysierten mikrodessektierten Proben aliquotiert und mit H<sub>2</sub>O auf 25 µl aufgefüllt.

Für die Versuche mit SYBR<sup>®</sup> Green I wurde der iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix von Bio-Rad angewandt. Dieser ist ebenfalls 2 x konzentriert und enthält

Desoxyribonukleosidtriphosphate, iTaq<sup>TM</sup> DNA Polymerase, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR<sup>®</sup> Green I, Fluoreszein und Stabilisatoren. Diese Versuche wurden analog zu den Versuchen mit dem iQ<sup>TM</sup> Supermix pipettiert. Aus Gründen der mangelnden Spezifität von SYBR<sup>®</sup> Green I müssen hierbei die beiden Gene getrennt untersucht werden. Im Fall der fluoreszenzmarkierten Sonden, können sie simultan in einem Cap untersucht werden.

Die qRT-PCR begann mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für fünf Minuten. Darauf folgten 40 Wiederholungen einer Abfolge, bestehend aus je 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, Annealing bei 57°C und Elongation bei 72°C. An jede qRT-PCR mit SYBR<sup>®</sup> Green I schloss sich die Erstellung einer Schmelzkurve an, die Rückschlüsse auf das entstandene Produkt ermöglicht. Wird DNA erhitzt, so dissoziiert sie in Einzelstränge bei Temperaturen proportional zu ihrem Gewicht, was in einer Dissoziation von SYBR<sup>®</sup> Green I und damit einer Abnahme des messbaren Fluoreszenzsignals resultiert. Die Analyse der Schmelzkurve bestätigte die Vervielfältigung des jeweilig gewünschten DNA-Abschnittes. Die Versuche wurden in 96-Well-Platten durchgeführt, wobei die äußeren Wells stets frei gelassen wurden.

Der Anstieg der Fluoreszenzemission korreliert während der exponentiellen Phase der PCR mit der Zunahme des PCR-Produktes. Die computergestützte Software des iCyclers ermittelt nach Beendigung sämtlicher Wiederholungsschleifen einen Wert, den sogenannten C<sub>t</sub>-Wert (engl. threshold cycle, Schwellenwert-Zyklus), der den Zyklus angibt, ab dem sich die gemessene Fluoreszenz von der Hintergrundfluoreszenz, die durch die Grundfluoreszenz der eingesetzten Farbstoffe entsteht, statistisch signifikant abhebt. Dieser Wert liegt immer in der exponentiellen Phase, so dass die Quantifizierung nie von mangelnden Edukten während der Plateauphase beeinträchtigt wird. Je größer die Anzahl an Templatekopien zu Beginn der qRT-PCR, desto weniger Wiederholungsschleifen sind zum Erreichen des Schwellenwertes nötig und umso kleiner wird also der C<sub>t</sub>-Wert. Der C<sub>t</sub>-Wert ist direkt proportional zur anfänglichen Templatemenge [4, 28].

### 2.2.16 Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonden

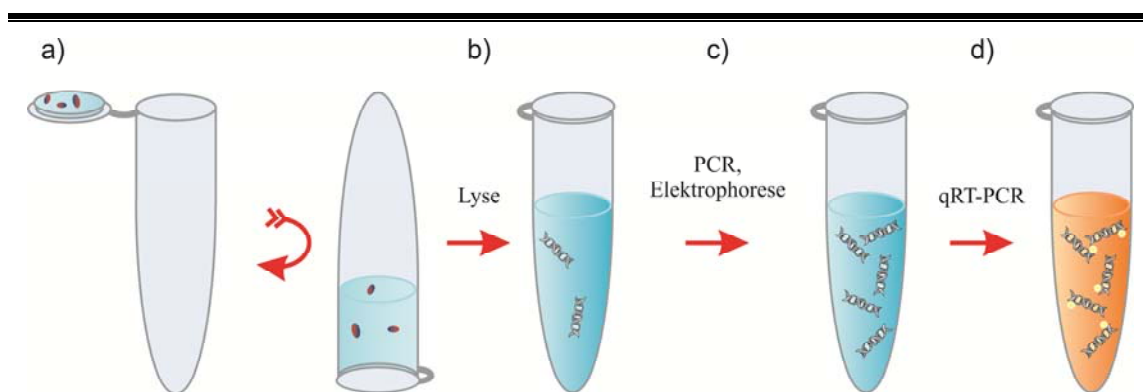
Genau wie bei Erstellung der Primer, wurde mit den Sonden verfahren. Mit Hilfe des Genom-Browsers ENSEMBL wurden die zugehörigen Gensequenzen erneut dargestellt. Das Programm PRIMER3 wurde 2002 von GINZINGER ET AL. dazu verwendet und bietet zusätzlich die Möglichkeit Sondensequenzen zu ermitteln [28].

Die Oligonukleotidsonden wurden so berechnet, dass die Schmelztemperatur etwa 10°C über der des zugehörigen Primerpaares lag. Dadurch wird gewährleistet, dass die Oligonukleotidsonden zeitlich vor den Primern an die komplementären Sequenzen auf der Template-DNA hybridisieren und durch die synthetisierende DNA-Polymerase wieder hydrolysiert werden. Ferner gelten für ihre Erstellung dieselben Voraussetzungen wie bei den Oligonukleotidprimern (siehe auch **2.2.13 Oligonukleotidprimer**).

Die LASP-1-Sonde wurde am 5'-Ende mit dem Reporter 6-FAM (6-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende mit dem Quencher BHQ-1 (3'-terminaler Black Hole™ Dark Quencher) markiert. Die GAPDH-Sonde trägt am 5'-Ende Texas Red-X und am 3'-Ende BHQ-2 als Quencher. Die Verwendung von Sonden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, erlaubt die gleichzeitige Amplifikationsuntersuchung mehrerer Gene in einem Reaktionsgefäß.

Auch die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonden wurden von der biomers.net GmbH synthetisiert.

**Abb. 8: Übersicht über die Abfolge der Versuche**



**(a)** Mikrodissektion, **(b)** Gewebeverdaulichkeit in inverser Stellung, **(c)** PCR und Gelelektrophorese, **(d)** qRT-PCR, genetische Analyse

### 2.2.17 Quantifizierung der Ergebnisse der qRT-PCR

Zur Quantifizierung der Ausgangsmenge an Nukleinsäuren wird der während der qRT-PCR ermittelte  $C_t$ -Wert benutzt. Prinzipiell kann die relative von der absoluten Quantifizierung unterscheiden werden. Der Begriff der absoluten Quantifizierung ist irreführend gewählt. Besser wäre es, von „Quantifizierung mit Hilfe der Standardkurve“ zu sprechen.

Führt man eine  $C_t$ -Wert-Messung mit einer Verdünnungsreihe von DNA bestimmter Konzentrationen durch, so erhält man eine Standardkurve, mit deren Hilfe eine „**absolute**“ Quantifizierung möglich wird. Dies war aber für den hier angewandten Versuchsaufbau nicht nötig, da mit GAPDH als internem Referenzgen gearbeitet wurde. Normalerweise wird bei der **relativen** Quantifizierung der  $C_t$ -Wert des Referenzgens vom  $C_t$ -Wert des Gens von Interesse subtrahiert. Der relative Unterschied zwischen den Ausgangsmengen beider Gene wird durch das Ergebnis der Basis 2, potenziert mit der Differenz der  $C_t$ -Werte beider Gene  $\Delta C_t$  ( $2^{\Delta C_t}$ ), beschrieben. Eine weitere Möglichkeit den relativen Unterschied der Ausgangsmengen zu beschreiben, ist das Ergebnis aus  $2^{-\Delta\Delta C}$ . Dabei steht  $-\Delta\Delta C_t$  für die Differenz der  $C_t$ -Werte von Referenz- und Zielgen einer Kontrolle, subtrahiert von der Differenz der  $C_t$ -Werte von Referenz- und Zielgen einer Probe [28, 49].

Für die Interpretation der Ergebnisse bin ich von der oben beschriebenen Berechnung abgewichen und kalkulierte für jede Gewebeprobe das Verhältnis aus  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ . Aus den  $C_t$ -Werten des Kontrollgewebes wurden die Mittelwerte  $MC_t[\text{LASP-1}]$  sowie  $MC_t[\text{GAPDH}]$  und das mittlere Verhältnis, um das die  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ -Verhältnisse der einzelnen Tumorproben innerhalb der Standardabweichung streuen sollten, ermittelt. Auf diese Weise konnte ein Erwartungsintervall errechnet werden, das den Bezug zu den „realeren“ Gegebenheiten des Brustgewebes ermöglichte. Die  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ -Verhältnisse der Tumorproben sollten sich, sofern LASP-1 nicht amplifiziert wäre, wie die  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ -Verhältnisse der Kontrollgewebe verhalten. Für den Mittelwert  $\mu$  und die Standardabweichung  $s$  der Kontrollgewebe ermittelte ich:

$$\mu = 0,96990462$$

$$s = 0,07431306$$

Damit ergibt sich für die  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ -Verhältnisse der Tumorproben folgendes Erwartungsintervall  $\mu \pm 2 \cdot s$ :

$$0,96990462 \pm 2 \cdot 0,07431306 = [0,821278502; 1,118530727]$$

Unter der Annahme, dass GAPDH als „housekeeping“ Gen in konstanter Anzahl an Genkopien auf dem Genom vorliegt, kann man folgern, dass die  $C_t$ -Werte von GAPDH relativ konstant sind. Für LASP-1 ist dieser Schluss nicht gültig. Ist LASP-1 amplifiziert, so ist die Anzahl an Genkopien vermehrt, was bedeutet, dass weniger qRT-PCR-Schleifen notwendig sind, damit sich das Fluoreszenzsignal von der Hintergrundfluoreszenz abhebt. Der  $C_t$ -Wert von LASP-1 wird also kleiner. Das führt dazu, dass das  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ -Verhältnis größer wird. Umgekehrt, wird das  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ -Verhältnis größer, wenn LASP-1 in kleinerer Anzahl an Genkopien vorliegt.

$$\frac{C_t[\text{GAPDH}]}{C_t[\text{LASP-1}]} > 1,118530727 \rightarrow \frac{C_t[\text{GAPDH}]}{C_t[\text{LASP-1} \uparrow \downarrow]} \quad (3)$$

$$\frac{C_t[\text{GAPDH}]}{C_t[\text{LASP-1}]} < 1,118530727 \rightarrow \frac{C_t[\text{GAPDH}]}{C_t[\text{LASP-1} \downarrow \uparrow]} \quad (4)$$

Ich legte fest, dass Proben, deren  $C_t[\text{GAPDH}] / C_t[\text{LASP-1}]$ -Verhältnis größer als  $\mu + 2 \cdot s = 1,118530727$  ist, wahrscheinlich Amplifikation für LASP-1 zeigen.



### 2.2.18 Patientenstudie

Die bemerkenswerte Entdeckung, dass das Protein LASP-1 nicht ausschließlich im Zytoplasma sondern auch innerhalb des Zellkerns zu finden ist, veranlasste mich zu untersuchen, ob die unterschiedliche Lokalisation eine Auswirkung auf das Überleben der Patienten hat [32].

Alle für die statistische Auswertung notwendigen Daten, wie die histologische Tumorentität, Staging und Grading, Geburtsdatum sowie Zeitpunkt der OP wurden aus den entsprechenden Patientenakten, den jeweiligen Berichten und pathologischen Befunden in den Archiven der Universitäts-Frauenklinik gesucht und dokumentiert (siehe **Appendix, 6.2 Rohdaten der Patientenstudie**). Außerdem wurde versucht zu ermitteln, ob die Patientinnen am Ende des Beobachtungszeitraumes, Dezember 2007, noch lebten oder schon verstorben waren. War dies aus den Patientenakten nicht zu erschließen, wurden die entsprechenden Einwohnermeldeämter mit einem Formular, das zusammen mit dem Tumorzentrum der Universitätsklinik Würzburg erstellt wurde, um Hilfe gebeten (siehe **Appendix, 6.1 Anschreiben an die Einwohnermeldeämter**).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Design der LASP- und GAPDH-Primer

Für die Erstellung der LASP-1-Primer wurde zunächst mittels ENSEMBL die komplette Gensequenz ermittelt. Ausgewählt wurden drei verschiedene Exons, anhand derer mit Hilfe des Programmes PRIMER3, die Primer später designt wurden. Das erste Exon wird von den Basen 601 - 745, das vierte von den Basen 28.897 - 29.006 und das siebente von den Basen 49.192 - 52.248 repräsentiert. Es wurde versucht ausschließlich Exons auszuwählen und Sequenzen mit genetisch vorhandenen Polymorphismen zu vermeiden. Das erste Primerpaar bindet im Bereich der LIM-Domäne, das zweite im Bereich der Nebulin-like-Repeats und das letzte im Bereich der SH3-Domäne.

Ebenso sind wir mit der Erstellung der GAPDH-Primer verfahren, wobei wir nur ein Primerpaar designten. Die GAPDH Primer umschließen die Basen 3.986 - 4.326 (siehe auch **Tabelle 1**).

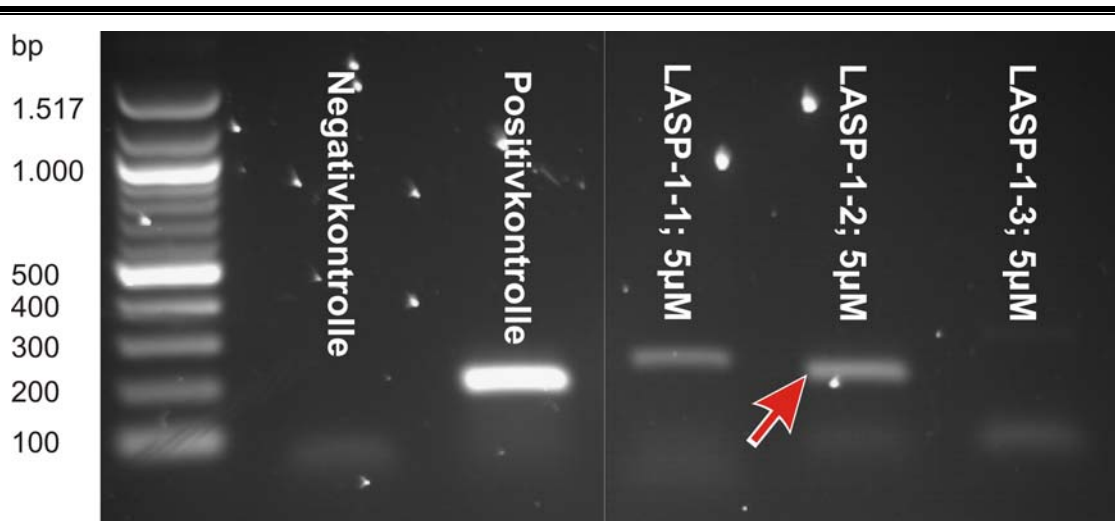
Bereits die ersten orientierenden Versuche, die jeweiligen Sequenzen mittels PCR zu vervielfältigen, ließen klar erkennen, dass das Primerpaar LASP-1-2 am besten funktionierte. Auch in weiteren Versuchen, die der Ermittlung der optimalen Primermenge, des besten Primerverhältnisses und der günstigsten Annealingtemperatur dienten,

**Tab. 1: Sequenzen der Primerpaare**

Oligo-nukleotid	Länge [Basen]	Produktgröße [Basen]	Schmelztemperatur [°C]	Sequenz von 5' nach 3'
LASP-1-1 for.	20		59,95	TCC CCG CTG TGT TTA TTA GG
LASP-1-1 rev.	20	221	59,95	CTC CGT GGG ATA CAC GAT CT
LASP-1-2 for.	20		60,02	TGT CTC CTG ACT GGT TGC TG
LASP-1-2 rev.	20	197	60,05	TGA TCT GGT CCT GGG TCT TC
LASP-1-3 for.	20		60,07	CCT GGC CTC ACT TGA TTC AT
LASP-1-3 rev.	20	287	60,30	AAG GAA AAG GGA TGG GTC AG
GAPDH for.	20		59,34	ATC AAG AAG GTG GTG AAG CAG
GAPDH rev.	20	340	61,05	TAC TCC TTG GAG GCC ATG TG

konnte LASP-1-2 überzeugen (siehe auch **Abbildung 9**). Deshalb wurde beschlossen, alle weiteren Versuche mit dem Primerpaar LASP-1-2 durchzuführen. Alle, im Weiteren als LASP-1 bezeichneten Primer, beziehen sich auf den hier genannten Primer LASP-1-2.

**Abb. 9: Vergleich der Primer LASP-1-1, -2 und -3**



Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte, 1,2%iges Agarosegel, bei 120 V und 95 mA für 1 h; aufgetragen sind ein Größenmarker, eine Negativ- und eine Positivkontrolle, sowie BT-20-Zell-DNA, die mit den Primerpaaren LASP-1-1, -2 und -3 amplifiziert wurde; bei der Positivkontrolle wurde ein bereits (außerhalb meiner Versuche) optimiertes Primerpaar (LMNA) verwandt; deutlichste Bande bei Primer LASP-1-2

### 3.2 MicroSpin Tissue DNA Kit zeigt bessere Ergebnisse als peqGOLD Tissue DNA Mini Kit

In Vorversuchen sollte die Extrahierbarkeit genomischer DNA mit dem Tissue DNA Mini Kit und MicroSpin Tissue DNA Kit von peqLab verglichen werden.

Dazu wurden BT-20-Kulturzellen, die in einer T<sub>25</sub>-Kulturflasche gewachsen sind, gemäß der Anleitung der Kits zuerst lysiert und homogenisiert sowie schließlich in mehreren Schritten aufgereinigt.

Laut Herstellerangaben ist der Tissue DNA Mini Kit für maximal 30 µg, entsprechend  $1 \cdot 10^7$  Zellen, und der MicroSpin Tissue DNA Kit für maximal 10 µg, entsprechend  $5 \cdot 10^6$  Zellen, genomischer DNA konzipiert.

Dies ließ sich durch eine anschließende spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration sowie einer anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung nach einer PCR bestätigen (siehe **Tabelle 2**).

**Tab. 2: Mit Extraktionskits erzielte DNA-Konzentrationen**

	MicroSpin Tissue DNA Kit		Tissue DNA Mini Kit	
	Eluat 1	Eluat 2	Eluat 1	Eluat 2
OD <sub>260</sub>	0,019	0,011	0,039	0,018
OD <sub>280</sub>	0,011	0,006	0,034	0,012
OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	1,727	1,833	1,147	1,500
[DNA] (ng/µl)	19	11	39	18

Von einer Säule wurde zweimal eluiert, Eluat 1 und 2

Bei einer Schichtdicke von etwa 8 µm der angefertigten histologischen Schnitte (etwa 200.000 mikrodisektierten Quadratzentimetern), sowie einem angenommenen Zelldurchmesser von 7,5 µm, erwarteten wir etwa  $7,3 \cdot 10^3$  Zellen (vergleiche auch **2.2.11 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**). Die Extraktionskapazität der Kits wurde demnach bei Weitem unterschritten. Es war zu erwarten, dass der MicroSpin Tissue DNA Kit für lysierte, mikrodisektierte Proben besser Ergebnisse zeigen sollte, was in gelelektrophoretischen Auftrennungen bestätigt werden konnte (nicht abgebildet).

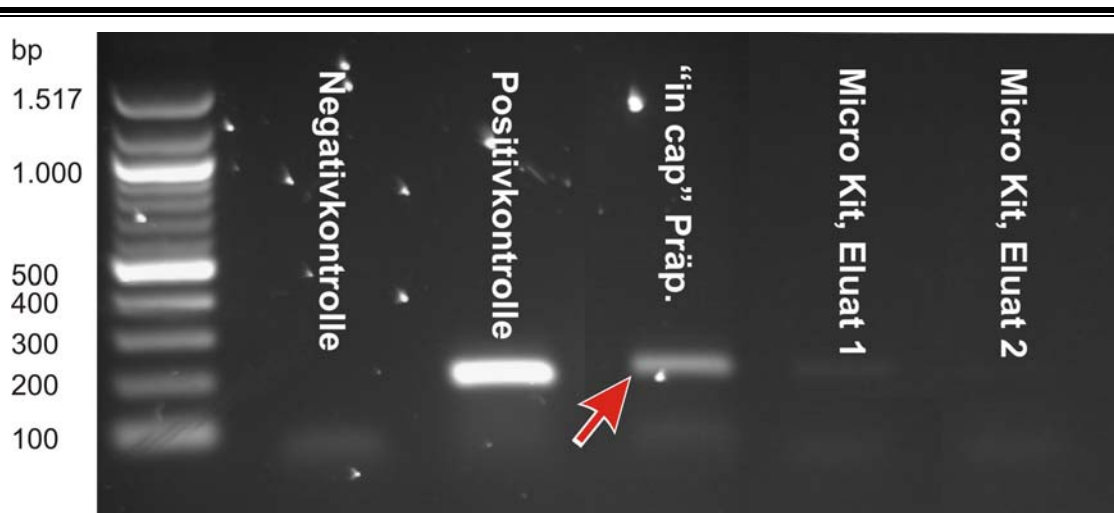
### 3.3 Einfache „in cap“-Preparation ist dem MicroSpin Tissue DNA Kit überlegen

Im Jahr 2000 publizierten LEHMANN ET AL. ein Protokoll, das speziell für die Isolierung von DNA aus mikrodisektierten Gewebeproben entwickelt wurde. Dabei lysierten die

Wissenschaftler das Gewebe durch einen simplen Proteinase K-Verdau und benutzten es auch ohne anschließende Aufreinigung weiter [48].

Ich kontrollierte dies mit den hier verwendeten mikrodisezierten Proben und verglich diese mit dem MicroSpin Tissue DNA Kit. Nach einer Amplifikation der Proben mittels PCR und anschließender gelelektrophoretischen Auftrennung zeigte sich die Überlegenheit der einfachen „in cap“-Preparation mit Proteinase K-Verdau gegenüber dem DNA-Extraktions-Kit (vergleiche **Abbildung 10**). Alle weiteren Aufarbeitungen erfolgten mit Proteinase K „in cap“.

**Abb. 10: Vergleich des Extraktionskits mit der „in cap“ Präparation**



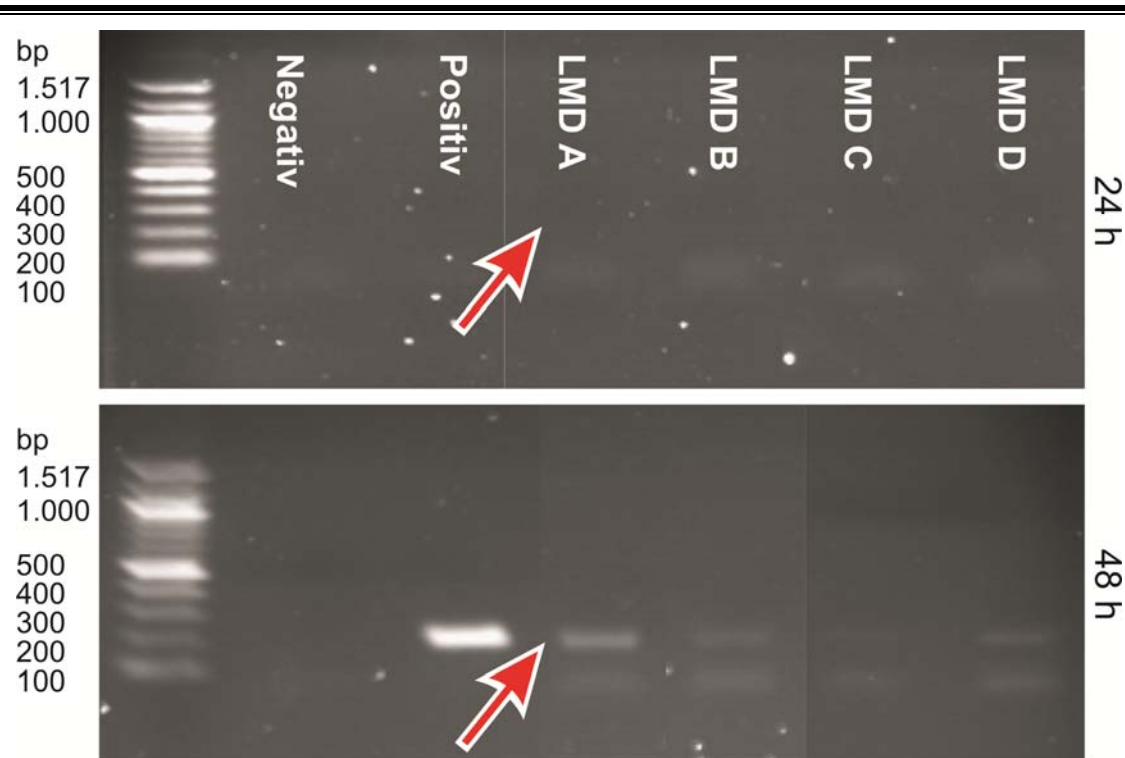
Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte, 1,2%iges Agarosegel, bei 120 V und 95 mA für 1 h; aufgetragen sind ein Größenmarker, eine Positivkontrolle, BT-20-Zellen „in cap“ präpariert, BT-20-Zellen mit dem MicroSpin Tissue DNA Kit in zwei Eluaten aufgearbeitet. Verwendet wurde ein (außerhalb meiner Versuche) optimiertes Primerpaar (LMNA). Die „in cap“-Präparation ist dem MicroSpin Tissue DNA Kit deutlich überlegen

### 3.4 Optimierung des Proteinase K-Verdaus

LEHMANN ET AL. inkubierten 2001 ihre mit Methylenblau gefärbten und mikrodisezierten Gewebeproben bei 40°C über Nacht mit 0,1 mg/ml Proteinase K [49]. Ich inkubierte die Proben mit einer 3 mU/ml Lösung der Proteinase K und verglich die

Extrahierbarkeit der DNA nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Diese variierten zwischen 18 und 60 Stunden. Die besten Ergebnisse erzielte ich nach 50 - 60 Stunden Inkubation bei 37°C (siehe **Abbildung 11**).

**Abb. 11: Vergleich verschieden langer Proteolysezeiten**



Gelelektrophoretisch aufgetrennte PCR-Produkte, 1,2%iges Agarosegel, bei 120 V und 95 mA für 1 h; aufgetragen sind ein Größenmarker, eine Negativ- und eine Positivkontrolle sowie vier verschiedene LMD-Proben A – D, verwandt wurde jeweils dasselbe Primerpaar; nach 24-stündiger Inkubation (**oben**) und nach 48-stündiger Inkubation (**unten**)

### 3.5 PCR und Gelelektrophorese der lasermikrodissektierten Gewebeproben

Alle lasermikrodissektierten und lysierten Gewebeproben wurden von mir mittels PCR amplifiziert und anschließend mit Hilfe einer Gelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt.

Einerseits wollte ich hierdurch überprüfen, ob der Mikrodissektionsvorgang mit an-

schließlich Protease K-Verdau erfolgreich verlaufen ist. Andererseits wollte ich aber auch sicherstellen, dass das amplifizierte Produkt, auch jeweils den gewünschten DNA-Sequenzen von LASP-1 oder GAPDH entsprach.

Von 73 mikrodisssektierten und lysierten Gewebeschnitten zeigten schließlich 63 eine positive Amplifizierbarkeit, erkennbar an den Banden mit einer Länge von 197 bp in der Gelelektrophorese.

Die hohe Reinheit der DNA-Proben war für die spätere Nutzung des Farbstoffes SYBR® Green I wichtig, aufgrund seines unspezifischen Bindungsverhaltens. Im Gegensatz zu den fluoreszenzmarkierten Sonden bindet SYBR® Green I nicht an komplementäre Sequenzen, sondern interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA. Es war sicherzustellen, dass das Amplikon, welches für das gemessene Fluoreszenzsignal verantwortlich war, auch dem gewünschten Produkt entsprach.

### 3.6 Erstellung fluoreszenzmarkierter Sonden

Für die Erstellung der jeweiligen Hybridisierungsoligonukleotide wurde zunächst mittels des Genom-Browsers ENSEMBL die komplette Sequenz des Gens ermittelt. Der Berechnung der Hybridisierungsoligonukleotide mit Hilfe des Programmes PRIMER3 wurden die Sequenzen der jeweiligen Primer zugrunde gelegt. Wie auch schon bei der Erstellung der Primer, wurden Sequenzen mit genetisch vorhandenen Polymorphismen vermieden.

Die Sonden habe ich so berechnet, dass die Schmelztemperatur etwa 10°C über der des zugehörigen Primerpaares lag. Die LASP-1-Sonde wurde am 5'-Ende mit dem Reporter 6-FAM und am 3'-Ende mit dem Quencher BHQ-1 markiert. Die GAPDH-Sonde trägt am 5'-Ende Texas Red-X und am 3'-Ende den BHQ-2 als Quencher (siehe auch **Tabelle 3**).

**Tab. 3: Sequenzen und Eigenschaften der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide**

Oligo-nukl.	Länge [Basen]	Reporter/Quencher	Schmelztemperatur [°C]	Sequenz von 5' nach 3'
LASP-1	20	6-FAM/BHQ-1	68,00	ACA CGC CCG AGC TCC AGA GA
GAPDH	20	Texas Red-X/BHQ-2	66,99	AAA AGT GCA GGG TCT GGC GC

### 3.7 Quantitative Real-Time-PCR

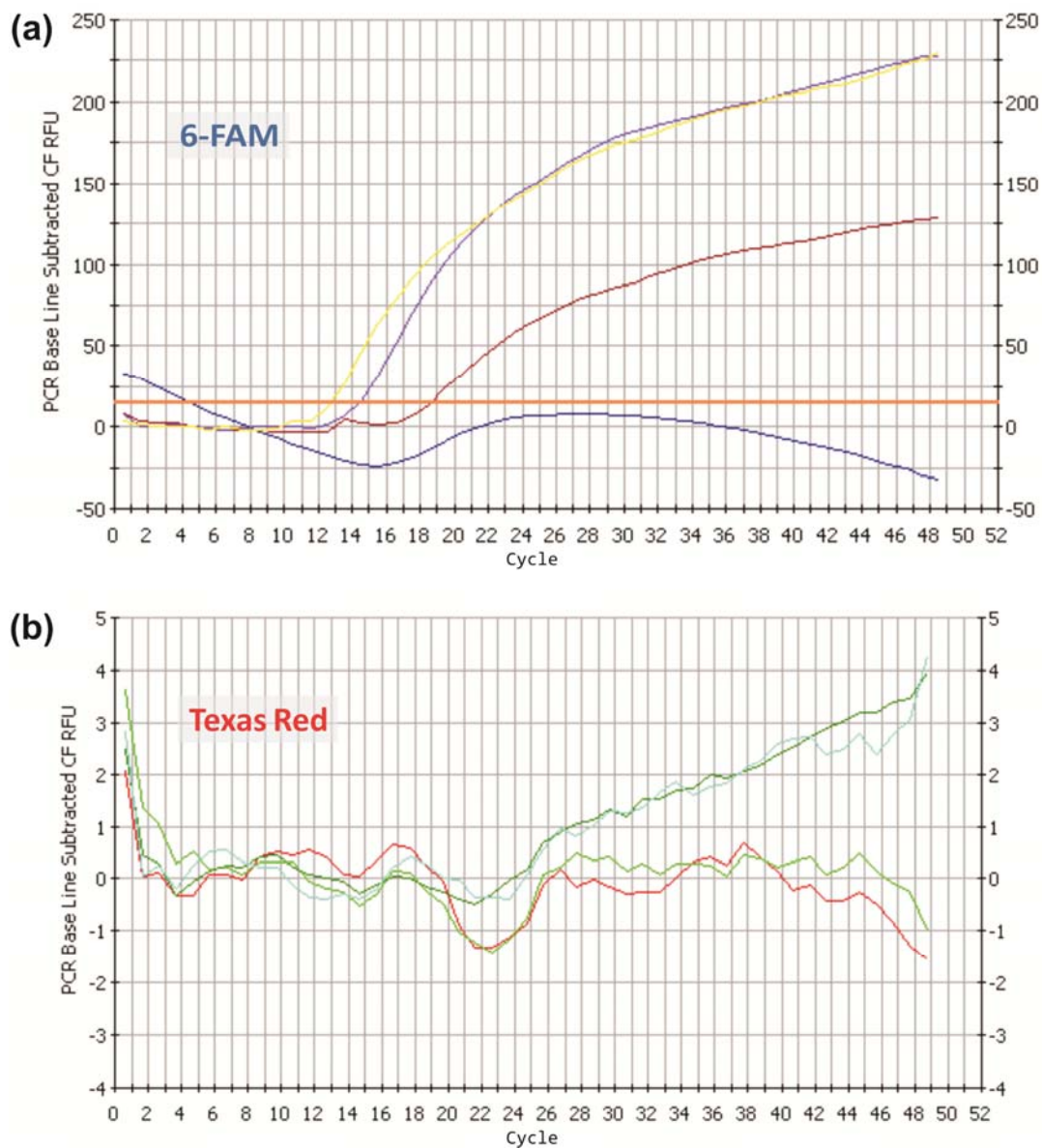
Die ersten Versuche mit den fluoreszenzmarkierten Sonden sind wider Erwarten nicht verwertbar verlaufen (siehe **Abbildung 12**). Die aufgezeichneten Signalintensitätskurven verliefen nicht annähernd – wie theoretisch zu erwarten war – sigmoidal. Außerdem wurden Signalintensitäten lediglich zwischen 5 und 200 Einheiten erreicht. Hier wären etwa 2.000 Einheiten zu erwarten gewesen. Optimierungsversuche für die richtige Annealingtemperatur, die richtigen Sonden- und Primerkonzentrationen, sowie verschiedene Wells und den jeweiligen Verschlussfolien erbrachten nicht die erwünschte Verbesserung. Anschließende gelelektrophoretische Auftrennungen ließen aber erkennen, dass die Amplifikation der DNA-Matrizen regelrecht ablief.

Es wurde schnell klar, dass der Fehler bei den fluoreszenzmarkierten Sonden zu suchen war. Zusammen mit der Firma biomers.net GmbH wurden mögliche Fehlerquellen analysiert (siehe **4.3 Fluoreszenzmarkierte Hybridisierungsoligonukleotide**).

Erste Probeversuche mit Hilfe von SYBR® Green I verliefen so erfolgsverheißend, dass entschlossen wurde, die Experimente mit SYBR® Green I fortzusetzen (siehe **Abbildung 13**).

Alle mikrodisezierten und lysierten Gewebeproben wurden einer quantitativen Real-Time-PCR-Untersuchung zugeführt. Auch die Proben, aus negativen Vorversuchen, wurden erneut überprüft. Zusätzlich zur Registrierung der Signalintensitätskurven, wurden jetzt Schmelzkurven aufgezeichnet. Der Verlauf der Schmelzkurven war jeweils eingipflig, was bedeutete, dass spezifisch ein Produkt amplifiziert wurde.



**Abb. 12: Fluoreszenzkurven von 6-FAM und Texas Red-X**

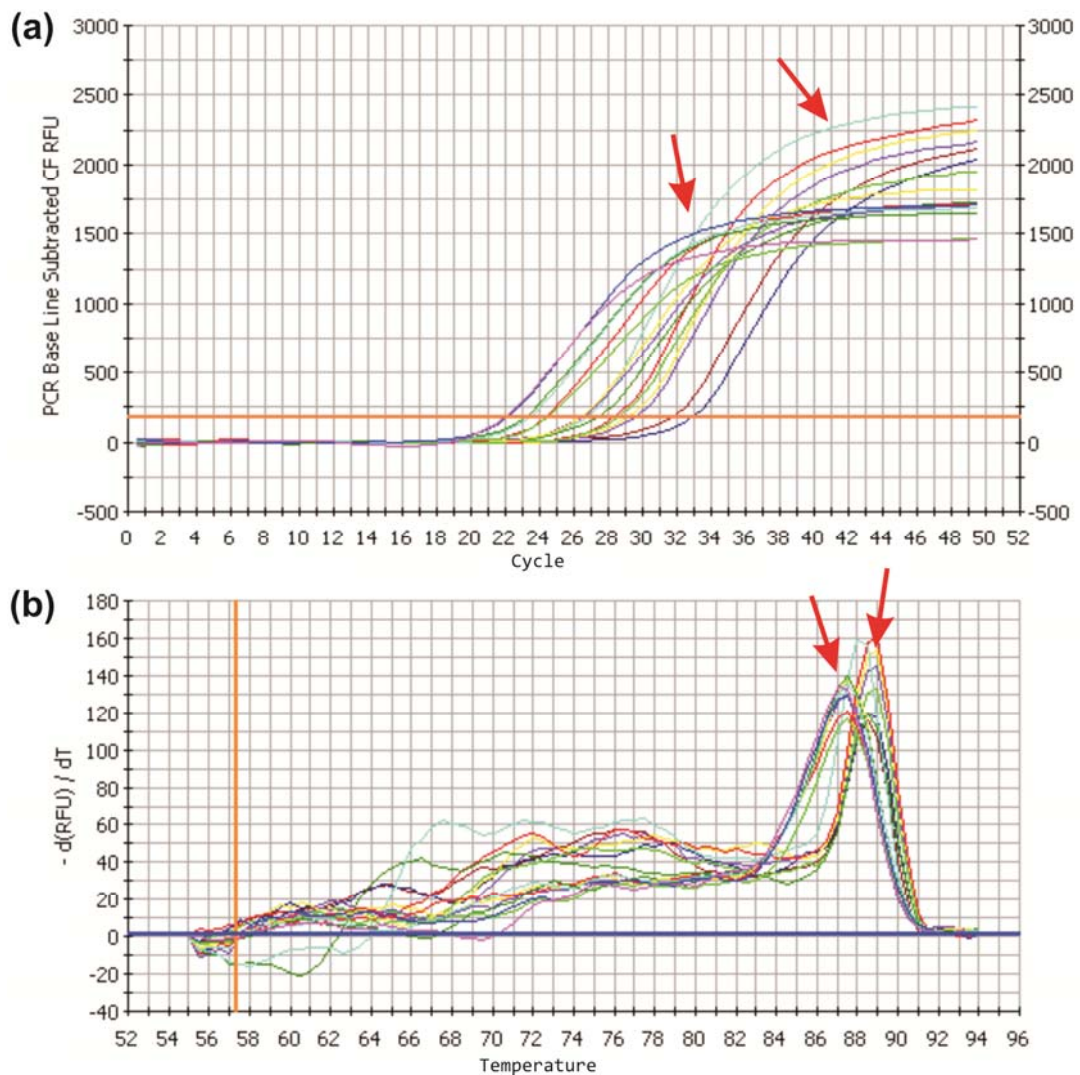
qRT-PCR, Fluoreszenzkurven mit **(a)** 6-FAM- und **(b)** Texas Red-X-markiertem Oligonukleotid; verwendet wurden unterschiedliche Konzentrationen an BT-20-Zell-DNA (repräsentiert durch verschieden farbige Kurven); Kurvenverlauf nicht sigmoidal, bei zu geringen Signalintensitäten

Hierin bestand eine Kontrolle, die nötige Spezifität zu gewährleisten.

Insgesamt zeigte nur eine von 63 (1,6 %) qRT-PCR-analysierten Tumorproben eine Amplifikation des Gens LASP-1. Letztlich kann damit geschlossen werden, dass die erzielten Ergebnisse, die mit mikrodisektierten Proben gewonnen wurden, die Re-

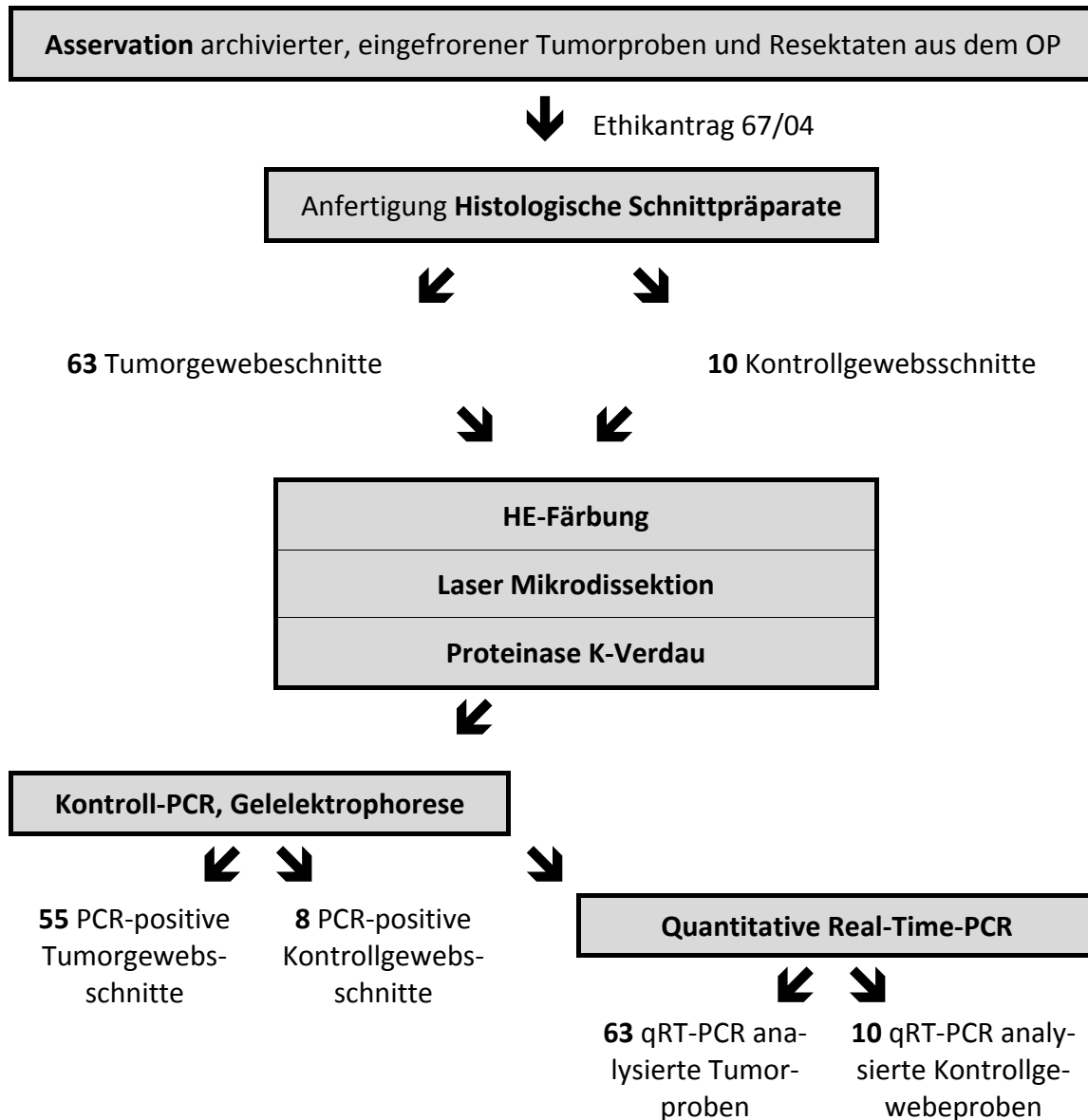
sultate von TOMASSETTO und Kollegen bekräftigen, obwohl sie Homogenisate ganzer histologischer Schnitte benutzten [85, 86].

**Abb. 13: Fluoreszenz- und Schmelzkurve von SYBR® Green I**



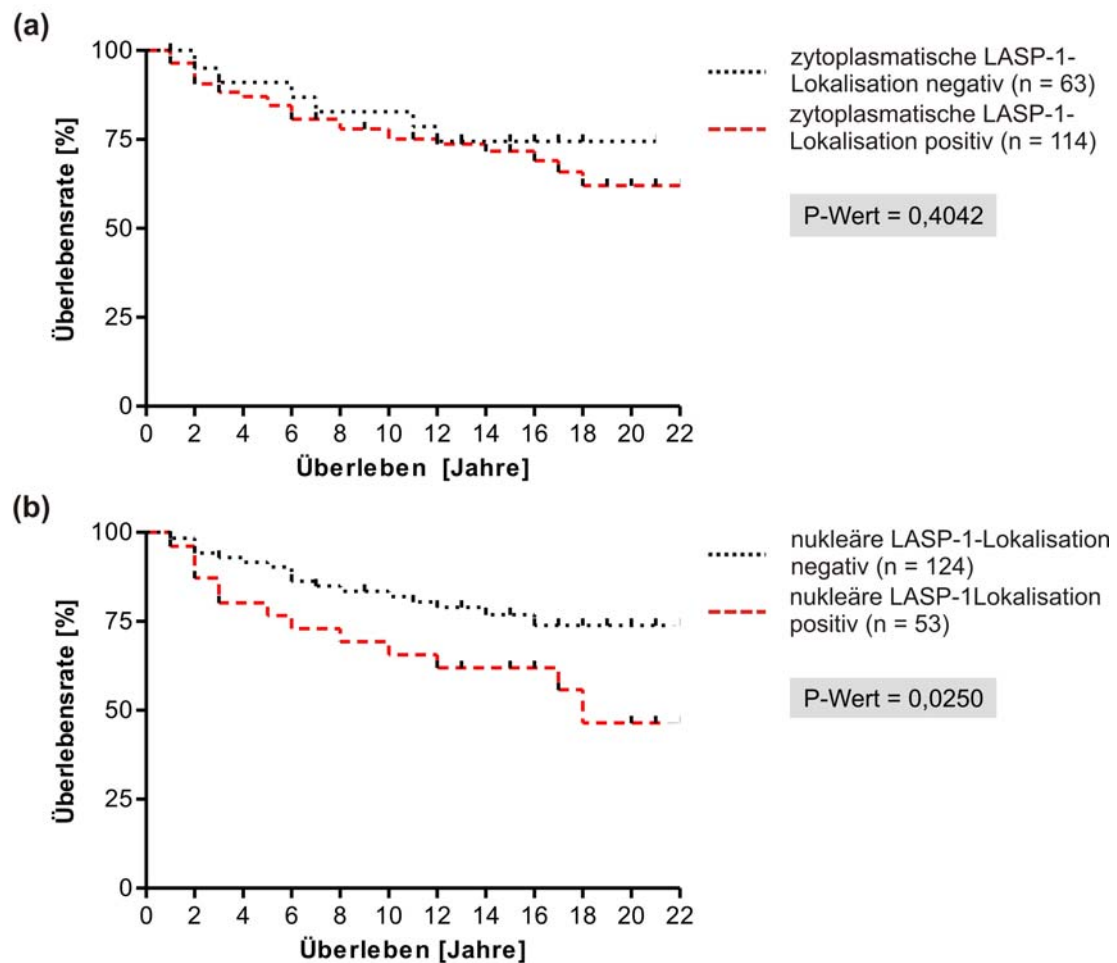
**(a)** qRT-PCR, Fluoreszenzkurve mit SYBR® Green I; verwendet wurden unterschiedliche Konzentrationen von BT-20-Zell-DNA mit LASP-1- (Peak bei höherer Temperatur) und mit GAPDH-Primern (Peak bei niedrigerer Temperatur); **(b)** zugehörige Schmelzkurve; sigmoidaler und jeweils eingipfliger Verlauf

### 3.8 Übersicht der Ergebnisse aus PCR und qRT-PCR



### 3.9 Die nukleäre Lokalisation von LASP-1 ist mit einem kürzerem Langzeitüberleben verknüpft

Ich klassifizierte den LASP-1-IRS von 177 Patienten mit Hilfe Anti-LASP-1-gefärbter histologischer Schnittpräparate. Anschließend wurde eine mögliche Korrelation der

**Abb. 14: Überlebenskurven**

**(a)** Patientenüberleben mit zytosolischer ASP-1-Lokalisation (rot) und ohne (schwarz), P-Wert = 0,4042; **(b)** Patientenüberleben mit nukleärer ASP-1-Lokalisation (rot) und ohne (schwarz), P-Wert = 0,0250

nukleären oder zytosolischen ASP-1-Lokalisation jeweils mit der Überlebenszeit der Patienten untersucht (siehe **Abbildung 14**).

Die Analyse der zytosomatischen ASP-1-Expression erbrachte keinen signifikanten ( $p = 0,4042$ ) Effekt auf das Patientenüberleben. Die zytosomatisch ASP-1-positiven Patientinnen (114 aus 177) erkrankten im Alter zwischen 33 und 85 (Mittel  $55,04 \pm 12,46$ ) Jahren und überlebten im Durchschnitt  $9,13 \pm 6,98$  Jahre. Patientinnen hingegen, die zytosomatisch als ASP-1-negativ eingestuft wurden

(63 von 177) erhielten die Diagnose im Alter zwischen 32 und 79 (Mittel  $55,63 \pm 10,91$ ) Jahren und überlebten durchschnittlich weitere  $6,25 \pm 6,29$  Jahre.

Im Kontrast dazu, zeigten die Patientinnen mit nukleärer LASP-1-Lokalisation, verglichen mit den nukleär-negativen Patientinnen, ein signifikant ( $p = 0,0250$ ) um etwa 50 % reduziertes Langzeitüberleben, bezogen auf den Beobachtungszeitraum von Januar 1985 bis Dezember 2007. Als nukleär LASP-1-positiv eingestufte Patientinnen (56 von 177), wurden im Alter zwischen 33 und 85 (Mittel  $54,29 \pm 12,78$ ) diagnostiziert

**Tab. 4: Korrelation der LASP-1-Lokalisation und -Expression zu klinisch-pathologischen und biologischen Parametern**

		zytosolische Lokalisation			P-Wert	nukleäre Lokalisation			P-Wert
		⊕	⊖	%		⊕	⊖	%	
Nodalstatus (n = 177)	N ⊕ (n = 83)	59	24	71,1	0,1571 (FET)	31	52	37,3	0,1953 (FET)
	N ⊖ (n = 94)	55	39	58,5		25	69	26,6	
Tumorgroße (n = 177)	Tis (n = 3)	3	0	100,0	0,5433 (MWT)	0	3	0,0	0,6853 (MWT)
	T1 (n = 108)	65	43	60,2		37	71	34,3	
	T2 (n = 51)	37	14	72,5		15	36	29,4	
	T3 (n = 5)	3	2	60,0		2	3	40,0	
	T4 (n = 10)	6	4	60,0		2	8	20,0	
Metastasierung (n = 177)	M ⊕ (n = 6)	5	1	83,3	0,4240 (FET)	1	5	16,7	0,6663 (FET)
	M ⊖ (n = 171)	109	62	63,7		55	116	32,2	
Gefäßeinbruch (n = 177)	L ⊕ (n = 21)	11	10	52,4	0,2331 (FET)	5	16	23,8	0,4657 (FET)
	L ⊖ (n = 156)	103	53	66,0		51	105	32,7	
Grading (n = 121)	G1 (n = 7)	4	3	57,1	0,2607 (MWT)	4	3	57,1	0,0254 (MWT)
	G2 (n = 69)	47	22	68,1		27	42	39,1	
	G3 (n = 45)	24	21	53,3		9	36	20,0	
Rezidiv (n = 87)	Ja (n = 26)	23	13	63,9	0,6908 (FET)	8	28	22,2	0,3845 (FET)
	Nein (n = 87)	52	35	59,8		27	60	31,0	
E-Rezeptor (n = 160)	ER ⊕ (n = 98)	60	38	61,2	0,8685 (FET)	28	70	28,6	0,2977 (FET)
	ER ⊖ (n = 62)	39	23	62,9		23	39	37,1	
P-Rezeptor (n = 157)	PR ⊕ (n = 86)	53	33	61,6	1,0000 (FET)	22	64	25,6	0,1195 (FET)
	PR ⊖ (n = 71)	43	28	60,6		27	44	38,0	
c-erbB-2 (n = 75)	Her ⊕ (n = 27)	11	7	61,1	0,5951 (FET)	6	12	33,3	0,7708 (FET)
	Her ⊖ (n = 47)	33	31	51,6		18	46	28,1	

⊕ = positiv; ⊖ = negativ; FET = Fisher's Exact Test; MWT = Mann-Whitney-Test; n = Anzahl; N ⊕/⊖ = nodal positiv/negativ; Tis = Carcinoma in situ; M ⊕/⊖ = metastasiert/nicht metastasiert; L ⊕/⊖ = Einbruch ins Gefäßsystem/kein Einbruch ins Gefäßsystem; G1-3 = gut, mäßig, wenig differenziert; ER ⊕/⊖ = Estrogenrezeptor positiv/negativ; PR ⊕/⊖ = Progesteronrezeptor positiv/negativ; Her ⊕/⊖ = c-erbB-2 positiv/negativ

und verlebten im Schnitt weitere  $7,41 \pm 7,19$  Jahre. Die Patientinnen, die als LASP-1-negativ (121 von 177) bewertet wurden, erkrankten im Alter zwischen 32 und 84 (Mittel  $55,70 \pm 11,50$ ) Jahren und hatten im Mittel noch  $8,43 \pm 6,72$  Jahre zu leben.

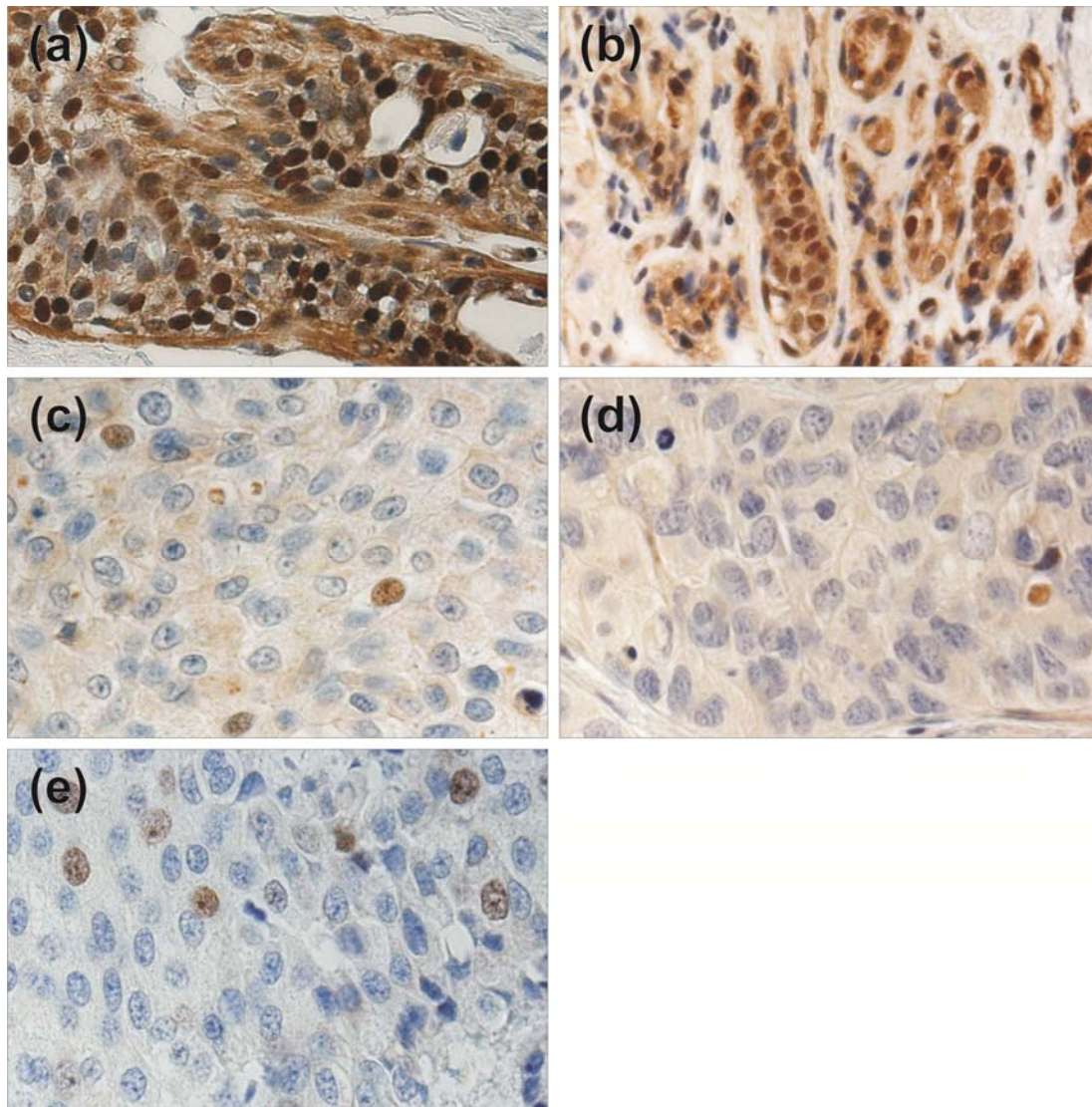
Schließlich wurden weitere klinisch-pathologische und biologische Parameter, wie der Nodalstatus N, die TumorgroÙe T, eine eventuelle Metastasierung M und ein möglicher GefäÙeinbruch L, sowie das Grading G, das eventuelle Auftreten eines Rezidivs R und das Expressionsniveau relevanter Rezeptoren in Korrelation zur nukleären oder zytosolischen LASP-1-Lokalisation untersucht. Dabei wurde nur ein möglicher, statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading G und der nukleären LASP-1-Lokalisation gefunden (siehe auch **Tabelle 4**).

### 3.10 Postulierter Zusammenhang zwischen PDEF und LASP-1 nicht übertragbar

FELDMAN ET AL. fanden PDEF hauptsächlich in Nuklei von Epithelien in normalem Brustgewebe, Epithel in invasiven Karzinomen zeigte hingegen einen reduzierten nukleären Gehalt an PDEF sowie eine eher zytosolische Lokalisation des Proteins. Ihrer Auffassung nach kommt es möglicherweise bei der Transition von benignem zu malignem Gewebe zu seiner Herabregulation [21].

TURNER ET AL. gelang es 2008 zu zeigen, dass ein Knockdown des PDEF-Proteins zu einer gesteigerten Expression von LASP-1 führt. Um zu überprüfen, ob dies auf Mammakarzinomata zu übertragen ist, wurden 35 histologische Präparate von Gewebeproben, die mit einem LASP-1-IRS  $\leq 2$  und  $\geq 9$  klassifiziert wurden, angefertigt. Es war zu erwarten, dass die Schnitte mit niedrigen LASP-1-IRS eine hohe Färbeintensität und Schnitte mit einem hohen LASP-1-IRS eine niedrige Färbeintensität für PDEF zeigen sollten [88].

Sowohl die Schnitte, die als LASP-1-positiv (LASP-1-IRS  $\geq 9$ ), als auch die Präparate, die als LASP-1-negativ (LASP-1-IRS  $\leq 2$ ) klassifiziert wurden, zeigen ein nahezu

**Abb. 15: Histologie Anti-PDEF-gefärbter Schnittpräparate**

**(a)** und **(b)** benignes Brustgewebe aus Reduktionsplastiken, deutliche, überwiegende nukleäre PDEF-Färbereaktion; **(c)**, **(d)** und **(e)** malignes Brustgewebe,  $LASP-IRS \geq 9$ , **(d)** und **(e)** nukleäre  $LASP-1$ -Expression negativ, **(e)** positiv, keine nukleäre, aber zytosolische PDEF-Verteilung; 20-fache Vergrößerung

einheitliches zytosolisches Anfärbeverhalten für PDEF. Außerdem scheint es keinen Einfluss auf die Expression von PDEF zu haben, ob in einem Gewebepräparat eine hohe beziehungsweise niedrige nukleäre  $LASP-1$ -Lokalisation gefunden wurde. Eine schwache Farbreaktion ist bei diesen Schnittpräparaten jedoch immer nachweisbar gewesen (siehe **auch Abbildung 15**). Insgesamt sind bei allen betrachteten Präparaten nur vereinzelt Zellkerne augenfällig positiv gefärbt. Somit gelang es mir nicht, den von TURNER

ET AL. in der Zellkultur beobachteten Zusammenhang zwischen niedriger PDEF-Protein-Expression und hohen LASP-1-Leveln in Brustgewebeschnitten zu bestätigen [88].

Verglichen mit der Anti-LASP-1-Färbung, zeigen Anti-PDEF-gefärbte Präparate ein engeres Spektrum an Färbereaktionen. Die maximal zu beobachtende Anti-PDEF-Anfärbbarkeit entspricht in etwa dem LASP-Score 2. Damit präsentierte sich ein völlig unerwartetes PDEF-Färbeverhalten der histologischen Schnittpräparate im Vergleich zu den Zellkulturexperimenten.



# 4 Diskussion

## 4.1 Immun- und Histochemie

Die Anfertigung eines histologischen Schnittpräparates mit nachfolgender immunhisto- oder histochemischer Färbung erfordert einen Fixationsvorgang sowie die Behandlung mit einigen chemischen Farbstoffen, die die Gewebeproteine und andere Bestandteile modifizieren. Dies ist aber zugleich ein notwendiger Schritt, um den übermäßigen Verlust eben dieser Proteine und Bestandteile zu verhindern und den Gewebeschnitt dadurch haltbarer zu machen. Dennoch handelt es sich bei einem Schnittpräparat lediglich um eine statische Momentaufnahme; eine Situation, die nicht mit dem tatsächlichen Zustand lebender Zellen vergleichbar ist.

Viele Effekte, die den Gehalt an DNA und RNA reduzieren, sind beschrieben worden. Gewebe wird während der operativen Entnahme von der Blutversorgung abgeklemmt, was zu einer Minderperfusion und damit zu Hypoxie führt. Die Hypoxie induziert eine pH-Verschiebung und ein saurer pH-Wert führt zu einer Reduktion der Konzentration an Nukleinsäuren. Ebenso sollte die Zeitspanne, zwischen Entnahme und Fixation möglichst kurz gehalten werden. Die Konzentration und Art des Fixiermittels, die Inkubationsdauer und die Inkubationstemperatur spielen eine Rolle für den Verlust an Nukleinsäuren. Auch die Größe der inkubierten Gewebestücke, die unterschiedliche Penetrationsdauern bedingt, ist von Bedeutung. Je kleiner die Gewebestücke sind, desto schneller und gleichmäßiger, werden sie vom Fixiermittel durchdrungen, wodurch sich der Verlust ebenfalls reduzieren lässt [82]. Nach Langzeitaufbewahrung über Jahrzehnte scheint der extrahierbare RNA-Gehalt jedoch nicht notwendiger Weise von der Aufbewahrungszeit abzuhängen [91].

Es ist anzunehmen, dass nach dem Verlust an Nukleinsäuren durch Hypoxie während der Gewebeentnahme, Fixation und dergleichen, der Gehalt an Nukleinsäuren über Jahre konstant erhalten bleibt. Erst dann durchzuführende Entparaffinierungen

und histologische Färbungen werden den Anteil an Nukleotiden weiter reduzieren (siehe auch **4.4 Die HE-Färbung reduziert den Gehalt extrahierbarer DNA und hemmt PCR und Proteinase K**).

#### 4.2 Laser Mikrodissektion

Die Laser Mikrodissektion bietet die Möglichkeit, spezifisch nur bestimmte Zellen eines histologischen Schnittpräparates in hoher „Reinheit“ zu separieren. Man kann mit ihrer Hilfe, den Anteil an kontaminierender nicht-tumoröser DNA so gering wie möglich halten.

Ich habe dabei stets versucht, einen möglichst großen Anteil tumoröser Zellen aus dem Schnittpräparat zu mikrodisektieren. KALLIONIEMI ET AL. 1994 proklamierten, dass größere Mengen an kontaminierenden nicht-tumorösen Zellen zu einem signifikanten Verlust der Detektionssensitivität führen. Der Anteil tumoröser Zellen an dem mikrodisektierten Gewebe solle mindestens 50 % betragen [43].

Ein großer Nachteil bei der Verwendung der Laser Microbeam Microdissection bestand für mich in der Tatsache, dass die histologischen Schnitte nicht mit einem Deckgläschen oder Vitro-Clud verschlossen werden. Dies verleiht den Präparaten im Vergleich zu den verschlossenen ein verschwommenes Erscheinen, als ob sie nicht scharf zu fokussieren wären (vergleiche **Abbildung 3** mit **Abbildung 15**). Man kann die einzelnen Strukturen so nicht genau erkennen und teilweise nur vermuten, was gerade betrachtet wird. Damit ist es für mich nicht möglich mit Sicherheit auszuschließen, dass ausschließlich tumoröse Zellareale dissektiert wurden.

Darüber hinaus muss ein Paraffinblock eines heterogen beschaffenen Tumors nicht zwangsläufig nur aus malignem Gewebe bestehen. Es ist denkbar, dass die tumorösen Anteile bereits weggeschnitten wurden und der übrige Block nur noch aus benignem Gewebe besteht.

Diesen Problemen wurde versucht zu entgegen, durch Betrachtung eines vorher zusätzlich HE-gefärbten Schnittpräparates derselben Patientin mit einem normalen Lichtmikroskop, das neben dem LMM-Mikroskop aufgestellt wurde. Der direkte Vergleich der Schnitte und die vom Pathologen klassifizierten Areale halfen dabei, tumoröse Zellen sicherer zu identifizieren.

Des Weiteren wurden allgemeine Malignitätskriterien bei der Auswahl tumoröser Zellen und Gewebeareale während der Mikrodissektion zu Rate gezogen. Mit abnehmender Differenzierung steigt die Malignität eines Tumors. Histologisch bedeutet abnehmende Differenzierung beispielsweise eine Abnahme der „Ordnung“, ein Verlust der Zellpolarität sowie ein Verschwinden der Ähnlichkeit zu normalem, differenziertem Gewebe. Dafür nehmen als Zeichen der Malignität Mitosen, Kernpolymorphie, irreguläre luminale Räume, deutlich sichtbare Chromatinstrukturen sowie nekrotische Foci deutlich an Häufigkeit und die Kernanfärbbarkeit an Intensität zu. Außerdem ist die Kern-Plasma-Relation zu Ungunsten des Plasmas verschoben.

Letztlich kann aufgrund der „Unschärfe“ der Schnittpräparate aber nicht mit endgültiger Sicherheit gesagt werden, dass ausschließlich Tumorzellen ausgeschnitten wurden.

#### 4.3 Fluoreszenzmarkierte Hydrolysierungsoligonukleotide

Die ersten Versuche mit den fluoreszenzmarkierten Sonden erbrachten wider Erwarten keine verwertbaren Ergebnisse. Die Signalintensitätskurven verliefen nicht sigmoidal und erreichten lediglich Signalintensitäten zwischen 5 und 200 Einheiten, also weit unter den zu erwartenden 2.000 Einheiten (siehe auch **Abbildung 12**). Als dann sämtliche Optimierungsgesuche scheiterten, aber anschließende gelelektrophoretische Auftrennungen erkennen ließen, dass die Amplifikation der DNA-Matrizen funktionierte, wurde klar, dass der Fehler nicht am Versuchsaufbau oder den Primern, sondern

bei den fluoreszenzmarkierten Sonden zu suchen war. Zusammen mit der Firma biomers.net GmbH wurden mögliche Fehlerquellen analysiert.

Eine Möglichkeit warum die Sonden nicht hydrolysiert wurden, besteht in der falschen Lagerung oder Handhabung der Sonden. Die Sonden wurden von uns vorschriftsgemäß, zusätzlich sogar in lichtdichten Reaktionsgefäßen, aufbewahrt und sorgfältig behandelt. Auch der geforderte pH-Bereich zwischen 7,5 - 8,0 für eine sichere Lagerung war gewährleistet.

Es war ebenso auszuschließen, dass histologische Färbeverfahren oder Fixationsprozesse ihren inhibitorischen Einfluss geltend machten (siehe auch **4.4 Die HE-Färbung reduziert den Gehalt extrahierbarer DNA und hemmt PCR und Proteinasen K**), da für die orientierenden Versuche kultivierte und damit unbehandelte BT-20-Zell-DNA verwandt wurde.

Auch die Synthesedaten und eine Reportdatei der Produktionsfirma biomers.net GmbH waren in Ordnung und schlossen eine fehlerhafte oder unvollständige Herstellung der Sonden aus.

Durch die Zusammensetzung des Puffers und durch Verunreinigungen der Template-DNA kann schließlich das Verhältnis zwischen Hydrolyse und Displacement der Sonden beeinflusst werden. Ich habe die hier zu untersuchenden mikrodisezierten und lysierten Proben nicht eigens aufgereinigt, was eine mögliche Verunreinigungsquelle und damit eine mögliche Fehlerquelle darstellen könnte.

Schließlich wurden die Sonden von der biomers.net GmbH überprüft und erneut berechnet. In die Berechnungen gingen sowohl Temperatur als auch mögliche Sekundärstruktur- und Dimer-Bildungen ein. Bei den Berechnungen fiel auf, dass möglicherweise bei der Erstellung der Oligonukleotidsonden eine andere thermodynamische Matrix als üblich verwandt wurde und wodurch Berechnungen der Schmelztemperaturen stark variierten. Hierin lag vermutlich der Fehler.

Ich habe daher als kostengünstigste Variante von der biomers.net GmbH passend zu den Sonden neue Primerpaare für GAPDH und LASP-1 bestimmen lassen. Ob die Son-

den zusammen mit den neuen Primerpaaren funktionieren werden, konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

#### **4.4 Die HE-Färbung reduziert den Gehalt extrahierbarer DNA und hemmt PCR und Proteinase K**

Für die ersten histologischen Schnitte wurde zur HE-Färbung ein Standard-Protokoll benutzt. Die Versuche, amplifizierbare DNA aus den daraus gewonnenen mikrodisektierten und anschließend lysierten Proben mit Hilfe der Gelelektrophorese nachzuweisen misslangen anfangs nahezu in allen Fällen.

Laut SERTH ET AL. 2000 führt eine Formalin-Fixation sowie die anschließende Hämatoxylin-Färbung gefrorener Gewebeschnitte mit Delafields oder Mayers Alaun ebenso wie mit Weigerts Eisenhämatoxylin zu einer signifikanten Reduktion der extrahierbaren DNA [78]. Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin gestattet aber eine gute Unterscheidbarkeit von Zytoplasma sowie Kernen und scheint keinen Einfluss auf den Transfer mit der EVA-Membran zu haben. Darüber hinaus soll die Varianz der nötigen Inkubationszeiten, um mit Proteinase K Gewebe zu lysieren, auf den Einfluss unterschiedlicher Fixationsprozeduren zurückzuführen sein [78].

EHRIG ET AL. bestätigten 2001, dass die Amplifizierbarkeit extrahierter DNA aus HE-gefärbten Gewebeschnitten signifikant abnimmt, sofern diese zuvor gefroren waren. Zudem scheint die Hämatoxylin-Färbung einen inhibitorischen Einfluss auf die PCR und den Proteinase K-Abbau auszuüben [17]. Trotzdem scheint die HE-Färbung mit der qRT-PCR kompatibel zu sein. Nach Mikrodisektion seien die beschriebenen hemmenden Effekte jedoch nicht zu beobachten. In mikrodisektiertem Gewebe wäre eine so geringe Färbe- und Fixationssubstanzmenge enthalten, dass daraus keine Inhibition resultiere [17].

Erst kürzlich wurde von Ruff entdeckt, dass geringe Mengen an Proteinase K eine Hitzeinaktivierung überstehen können. Daher ist also eine Inaktivierung der PCR-Enzyme durch die Proteinase möglich [29].

Aufgrund all dieser beschriebenen inhibitorischen Wirkungen habe ich die Dauer der Inkubation in Hämatoxylin und Eosin wesentlich reduziert. Dadurch gelang es mir den Anteil an amplifizierbaren DNA-Proben, im Vergleich zum Beginn der Versuchsreihen, erheblich zu erhöhen und die erzielten Ergebnisse im Rahmen der Messungenauigkeit zu reproduzieren.

#### **4.5 Die Überexpression von LASP-1 ist nicht auf Genamplifikation zurückzuführen**

Vor mehr als zehn Jahren, wurde die Hypothese aufgestellt, dass das LASP-1-Protein bei Brustkrebs auf Grund von Genamplifikation überexprimiert würde. TOMASETTO ET AL. fanden 1995 nur in einer von acht (12,5 %) Brustkrebszelllinien nicht repräsentative Hinweise, aber in fünf von 61 (8,20 %) primären Brustkrebsproben Anzeichen der Proteinüberexpression [85, 86]. BIÈCHE ET AL. untersuchten 95 Brustkrebsproben und wiesen dort in 12,24 % der Proben Genamplifikation nach. Für sie erschien hingegen das Gen LASP-1 nicht zwangsläufig, sondern nur inzidenziell amplifiziert [3]. Beide, TOMASETTO sowie BIÈCHE und Kollegen, verwandten humane Brustkrebs-Homogenisate, ohne vorher die Tumorzellen von den nicht-tumorösen kontaminierenden Zellen zu separieren. GRUNEWALD ET AL. konnten 2007 das Protein LASP-1 in 46 von 83 (55,4 %) Brustkrebsproben nachweisen [32].

Diese inkonsistenten Ergebnisse vergangener Arbeiten, veranlassten mich mit neuen Methoden zu überprüfen, ob LASP-1 nur auf genomischer Ebene amplifiziert, nur auf Proteinebene hochreguliert oder sowohl amplifiziert als auch überexprimiert ist. Um dies zu beurteilen, untersuchte ich 63 der 177 Brustkrebsproben, die ich von zufäl-

lig ausgewählten Patientinnen erhielt, die zwischen Januar 2000 und Dezember 2007 operiert wurden.

In dieser Arbeit konnte ich Genamplifikation nur in einer von 63 (1,6 %) mikrodissektierten Tumorproben nachweisen. Es scheint, dass die LASP-1 Proteinüberexpression als aktiver Prozess in der Tumorgenese aufgefasst werden muss und in der Mehrheit der Fälle von Brustkrebs eher durch transkriptionelle Regulation als durch Genamplifikation hervorgerufen wird.

#### **4.6 Die Nukleäre LASP-1-Lokalisation reduziert das Langzeitüberleben**

Vorangegangene Arbeiten verknüpften die Überexpression der LASP-1 mRNA mit gesteigerter Tumorgöße und fortgeschrittenerer Metastasierung bei Brustkrebspatientinnen. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Verlust des LASP-1-Proteins zu einer starken Inhibition der Migration und der Zellproliferation führt. Umgekehrt führt eine artifizielle Überexpression von LASP-1 in nicht neoplastischen Zellen zu einem Anstieg der Migration. Zusätzlich wurde beobachtet, dass es sich bei LASP-1 nicht nur um ein exklusiv zytosolisches Protein handelt, sondern dass es ebenso im Zellkern nachzuweisen ist. Damit liegt die Vermutung nahe, dass LASP-1 Teil eines bedeutenden Signalweges sein könnte [32, 33, 34].

Wie sich die nukleäre oder zytosolische Lokalisation von LASP-1 auf das Überleben der Patientinnen auswirkt, überprüfte ich durch die statistische Auswertung entsprechender Patientendaten, die über einen Beobachtungszeitraum von Januar 1985 bis Dezember 2007 gesammelt wurden.

Dazu berechnete ich das Überleben der Patientinnen und das mittlere Erkrankungsalter in jeder für die statistische Auswertung gebildeten Patientengruppe. Ein Vergleich der mittleren Erkrankungsalter in den Subgruppen ergab, dass sich dieses maximal um weniger als zwei Jahre unterschied (siehe **3.9 Die nukleäre Lokalisation von LASP-1 ist**

mit einem schlechten Langzeitüberleben verknüpft). Damit kann ausgeschlossen werden, dass das Überleben in einer Subgruppe aufgrund eines höheren Erkrankungsalters reduziert werden würde. Es wäre beispielsweise denkbar, dass Patientinnen, die mit 80 Jahren erkranken, den Kurvenverlauf deutlich negativ beeinflussen würden, da sie aufgrund der ihnen noch verbleibenden Lebenszeit ein deutlich geringeres Überleben zeigen sollten, als Patientinnen, die im Alter von 65 Jahren erkranken. Effekte und Tendenzen auf Grund des Erkrankungsalters sollten sich folglich ausgleichen, die Gruppen damit vergleichbar sein.

Bisherigen Arbeiten ist es gelungen, die zytosolische LASP-1-Lokalisation mit der Tumorgröße und nodaler Positivität, nicht aber mit der c-erbB-2-, der Estrogen- oder Progesteronexpression zu korrelieren [32]. Mit dieser Arbeit konnte ich den Beweis erbringen, dass die nukleäre LASP-1-Lokalisation für das Langzeitüberleben bedeutender ist als sein Vorhandensein im Zytosol (siehe auch **Abbildung 14**). Eine vermehrte Lokalisation von LASP-1 im Zellkern führt zu einem signifikant reduzierten Langzeitüberleben. Dieser Befund impliziert, dass der Transit von LASP-1 in den Zellkern, seine nukleäre Anwesenheit oder einige seiner Downstream-Funktionen mit bislang unbekanntem Signalen verbunden sind, die das Überleben des Patienten verkürzen.

**Tab. 5: Nukleäre LASP-1-Lokalisation verglichen mit dem Patientenüberleben**

Nukleäre Lokalisation	Anzahl	$\Sigma$ verstorbener Patienten	$\Sigma$ überlebender Patienten	Überleben [%]
Negativ	121	21	100	82,6
Positiv	56	17	39	69,6

Damit wird es zukünftig wichtig, nicht nur das LASP-1-Expressionsniveau zu untersuchen sondern auch die nukleäre LASP-1-Lokalisation zu bestimmen, um eine Prognose für den einzelnen Patienten treffen zu können.



#### 4.7 PDEF-Expression als Ausdruck der Metastasierungsinitiation

TURNER ET AL. gelang es 2008 unter anderem LASP-1 als vermeintliches Zielgen von PDEF zu identifizieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown des PDEF-Proteins in einer gesteigerten Expression von LASP-1 resultiert. Analog dazu ergaben hohe PDEF-Proteinspiegel genau entgegengesetzte Effekte. In der MCF-7-Zellkultur führte der Knockdown der PDEF-Expression außerdem zu einem Anstieg der Zellmigration, sowie zur Tumorentstehung in vivo [87, 88]. Ich versuchte dies auf histologische Schnittpräparate von Brustkrebsproben zu übertragen.

Die Befunde der Anti-PDEF-gefärbten Schnittpräparate waren jedoch nicht mit den von Turner erzielten Ergebnissen an Zelllinien vereinbar. Bei Schnitten, die mit einem LASP-1-IRS  $\geq 9$  bewertet wurden, handelt es sich um hochmaligne Tumoren, überwiegend mit Differenzierungsgrad G3, die sich hoch aktiv bezüglich Migration und Proliferation verhalten. Alle Schnittpräparate, denen ein LASP-1-IRS  $\leq 2$  zugeordnet wurde, sind dagegen mehrheitlich differenzierte Tumoren mit geringer Metastasierungstendenz. Alle Schnittpräparate zeigen jedoch ein nahezu einheitliches Anfärbeverhalten für PDEF. Außerdem scheint es keinen Einfluss auf die Expression von PDEF zu haben, ob in einem Gewebepräparat eine hohe beziehungsweise niedrige nukleäre LASP-1-Lokalisation gefunden wurde. Somit konnte ich nicht, den von TURNER ET AL. beobachteten Zusammenhang zwischen niedriger PDEF-Protein-Expression und hohen LASP-1-Leveln bestätigen [88].

Bei den Anti-PDEF-Färbungen wurden verschiedene PDEF-Antikörper verwandt. Leider waren die Ergebnisse, die mit dem Antikörper PDEF (N-14): sc-46446 der Santa Cruz Biotechnology, Inc. erzielt wurden, zu uneinheitlich und nur unzureichend zu reproduzieren, so dass wir unsere Färbungen mit dem Rabbit anti-PDEF-Antikörper von Invitrogen durchführten. Hiermit waren viel verlässlichere Ergebnisse zu erzielen, die durch Kontrollfärbungen ohne Antikörper und Färbungen gegen Ki67 verifiziert werden konnten. Außerdem wurde versucht Zugang zu dem PDEF-Antikörper zu bekommen, der in den Watson-Labors [88, 89] verwendet, uns aber letztlich verweigert wurde. Inwieweit unsere Ergebnisse Ausdruck eines mangelhaften PDEF-Antikörpers sind oder

ob das Watson-Labor mit einem bekanntermaßen schlechten LASP-1-Antikörper gearbeitet hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

FELDMAN ET AL. [21] konnten das Protein PDEF in normalen epithelialen Zellen sowie in gut differenzierten MCF-7-Krebszellen mit geringem Metastasierungspotential finden. Für diese Zellen ist der Verlust des PDEF-Proteins möglicherweise mit einer gesteigerten Metastasierungstendenz verbunden. Epithelzellen invasiver duktaler Mammarkarzinomata zeigten hingegen eine reduzierte PDEF-Expression. FELDMAN und Kollegen interpretierten die verringerte PDEF-Expression als Ausdruck der Transition normaler Zellen in invasive Krebszellen, während TURCOTTE ET AL. [87] den Verlust der PDEF bei gleichzeitig erhaltenen hohen PDEF-mRNA-Expression in fortgeschrittenen Tumoren als Marker für die Vorbereitung auf Metastasierung deuten. Die PDEF-Überexpression in geringgradigeren Tumoren und dem normalen Brustgewebe könnte daher an der Initiation oder dem Progress von frühen Brustkrebsstadien beteiligt sein, hat aber keinerlei direkten Einfluss, zum Beispiel als Tumorsuppressor, auf die Expression von LASP-1.

#### **4.8 Patientenstudie**

Die Ergebnisse klinischer Studien sind bedeutsam für die Entwicklung neuer und effektiverer Behandlungsmodalitäten. Um die Wirkung verschiedener Therapien zu beurteilen und zu vergleichen sind standardisierte Bewertungskriterien nötig. So kann mit einer Behandlung eine komplette oder eine partielle Remission, ein stabiler oder ein fortschreitender Erkrankungsverlauf erzielt werden. Außerdem sind Endpunkte wie das Overall Survival, das Progression-Free Survival (PFS), das Event-Free Survival, die Time to Progression (TTP), das Disease-Free Survival (DFS) oder die Response Duration zu definieren. Eine Verlaufskontrolluntersuchung erfordert gutes klinisches Urteilsvermögen und gute körperliche sowie Laboruntersuchungen in bestimmten regelmäßigen Abständen [9].

In meinem Fall war es leider nach teilweise mehr als 25 Jahren nicht mehr absolut exakt nachzuvollziehen, wie die einzelnen Patientinnen behandelt wurden. Zudem haben sich während der letzten 25 Jahre die Behandlungsstrategien des Mammakarzinoms deutlich verändert. Man kann wohl kaum davon sprechen, dass die Patientinnen unter den gleichen Bedingungen behandelt wurden. Von einigen Betroffenen ist bekannt, dass sie sicher Rezidive erlitten, aber nicht die genauen Umstände.

Sofern die Patientinnen verstarben, war die Todesursache nicht immer letztendlich zu klären. Dies gestaltete sich besonders schwierig, sofern mit Hilfe der Einwohnermeldeämter nach den betroffenen Patientinnen gesucht wurde. Verstarb eine Patientin im Alter von 80 Jahren, so kann es sich ursächlich um eine Folge des Alters aber auch um eine Embolie im Rahmen eines rezidivierenden Tumorgeschehens handeln. Um mit Sicherheit die Todesursache zu klären, ist eine Obduktion post mortem von Nöten. Bei der statistischen Auswertung bin ich so verfahren, dass am Ende des Beobachtungszeitraumes alle noch lebenden Patientinnen als „lebend“ und alle verstorbenen als „verstorben“ gewertet wurden. Selbst wenn eine Patientin nur einen Tag nach dem Ende des Beobachtungsintervalls, also am 01. Januar 2008, verstarb, so ging sie in die Berechnungen trotzdem als lebend ein.

Somit bin ich nicht in der Lage weder das Overall Survival, noch das PFS, das Event-Free Survival, die TTP, das DFS oder die Response Duration anzugeben. Beim Overall Survival wird vom Eintritt in die Studie bis zum Tod egal welcher Ursache gemessen. Am ehesten kann in diesem Fall von einem Overall Survival die Rede sein. In dieser Ungenauigkeit liegt einer der Schwachpunkte meiner Dissertationsarbeit.

#### **4.9 LASP-1 wird transkriptionell durch p53 reguliert**

Nach heutigem Verständnis ist Krebs im Wesentlichen eine genetische Erkrankung, die durch die Akquisition genetischer Mutationen entsteht. Ein fortgeschrittenes Lebensalter, geographische und genetische Faktoren sowie andere Risikofaktoren dispo-

nieren dabei für die Entstehung eines Malignoms. Besonders die Aktivierung von Onkogenen sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen können zu einer transformierten Zelle und damit im Weiteren zu neoplastischem Wachstum führen.

Eines der bekanntesten und am besten untersuchtesten Tumorsuppressorgene ist p53. Die wichtigste Aufgabe von p53 ist die Induktion des apoptotischen Zelltodes in Folge von onkogenem Stress. Darüber hinaus vermittelt p53 den Arrest des Zellzyklus, Seneszenz sowie Differenzierung und ist an der Reparatur genotoxischer Schäden beteiligt. Seine Bedeutung für die Karzinogenese wird besonders durch die Bezeichnung als „Wächter des Genoms“ noch unterstrichen. In über 50 % der menschlichen Tumoren ist eine funktionelle Inaktivierung des Proteins nachweisbar [35, 92, 93]. Neuere Ergebnisse lassen aber vermuten, dass p53 nicht nur in den frühen Schritten der Karzinogenese, sondern auch an der Regulation der Zellmigration und –invasion sowie den an Mechanismen der Metastasierung beteiligt ist [52].

LASP-1 reguliert die Zellmigration und –proliferation und ist an Fokalkontakten, entlang von Stressfasern sowie an Lamellipodien, Filopodien und Pseudopodien lokalisiert. Der Knockdown von LASP-1 führt dabei in metastasierenden Brustkrebszellen zu einer starken Hemmung der Migration und Proliferation mit einem Arrest in der G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus. Umgekehrt resultiert eine artifizielle Überexpression von LASP-1 in nicht neoplastischen Zellen in einer deutlichen Zunahme der Migration [31, 32, 33, 34].

WANG ET AL. erforschten 2009 einen Zusammenhang zwischen p53 und LASP-1. Bindet das funktionsfähige p53 direkt an das p53 consensus response-Element im LASP-1-Promoter, so wird die Expression von LASP-1 unterdrückt. Umgekehrt führt ein Verlust der p53-Funktion zu einem Anstieg des LASP-Expressionslevels sowie der Proliferation und Motilität [93].

Die Ergebnisse von WANG ET AL. stellen damit eine mögliche Erklärung da, wie p53 Motilität, Wachstum und Proliferation der Zellen und damit auch die Ausbreitung im Gewebe beeinflusst. Vielleicht ist es zukünftig möglich aus diesem Zusammenhang, potentielle therapeutische Modalitäten gegen Wachstum und Metastasierung maligne entarteter Zellen zu entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

Brustkrebs ist gegenwärtig die häufigste bösartige Erkrankung bei Frauen weltweit, jede neunte Frau wird davon im Laufe ihres Lebens betroffen sein. Das Mammakarzinom ist verantwortlich für 15 % der Krebstodesursachen in der westlichen Welt. Maligne Erkrankungen im metastasierten Stadium gelten generell als unheilbar mit einem medianen Überleben von wenigen Jahren.

Das LIM- und SH3-Domänen Protein ist ein spezielles fokales Adhäsionsprotein, das an den Vorgängen der Zellproliferation und -migration beteiligt ist. Seine Überexpression ist in einer bestimmten Gruppe von humanem Brust- und Eierstockkrebsentitäten mit einer fortgeschrittenen Tumorgroße und Lymphknoten-Metastasierung assoziiert. Der Knockdown des LASP-1-Proteins in metastatischen Brust- und Eierstockkrebszelllinien führt zu einer starken Hemmung der Zellmigration und -proliferation. Umgekehrt resultiert eine artifizielle Überexpression von LASP-1 in nicht neoplastischen Zellen in einer dramatischen Beschleunigung der Migration.

Die genetische Analyse von 63 mikrodisezierten histologischen Schnittpräparaten mit anschließender qRT-PCR ergab, eine Amplifikation des Gens LASP-1 in nur einem Fall (1 von 63; 1,6 %). Es scheint, dass die LASP-1 Proteinüberexpression als aktiver Prozess in der Tumorgenese aufgefasst werden kann und in der Mehrheit der Fälle von Brustkrebs bevorzugt durch transkriptionelle Regulation als durch Genamplifikation hervorgerufen wird.

LASP-1 ist nicht ausschließlich ein zytosolisch lokalisiertes Protein, sondern außerdem im Zellkern nachweisbar. Mit Hilfe Anti-LASP-1 gefärbter histologischer Schnittpräparate gelang es die Bedeutung der unterschiedlichen LASP-1-Lokalisationen für das Überleben der Patienten zu untersuchen. Dabei wurde der LASP-1-IRS bestimmt und mit dem Überleben der Patienten korreliert. Patientinnen mit nukleärer LASP-1-Lokalisation zeigen, verglichen mit den nukleär-negativen Patientinnen, ein signifikant

( $p = 0,0250$ ) um etwa 50 % reduziertes Langzeitüberleben, bezogen auf den Beobachtungszeitraum von Januar 1985 bis Dezember 2007.

Um zukünftig Aussagen über die Auswirkungen der LASP-1-Expression für den einzelnen Patienten zu treffen, ist es wichtig, nicht nur das LASP-1-Expressionsniveau zu bestimmen, sondern auch die nukleäre LASP-1-Lokalisation zu untersuchen.

Obwohl in mehreren Studien ein indirekter Zusammenhang zwischen der Expression von LASP-1 und der von PDEF nachgewiesen wurde, war es mir nicht möglich, diese Ergebnisse in meinen Brustkrebspräparaten zu verifizieren. In den untersuchten Gewebeproben korreliert eine hohe beziehungsweise niedrige LASP-1-Expression sowie die nukleäre Lokalisation mit einer nahezu einheitlichen PDEF-Konzentration.

Zukünftig sollte weiterhin Augenmerk auf die Untersuchung von LASP-1 und den ihm voran- sowie nachgeschalteten Signalwegen gelegt werden, um vielleicht neue, effektivere therapeutische Behandlungsmodalitäten etablieren zu können. Wenn es sich wirklich um eine transkriptionelle Hochregulierung des LASP-1-Proteins nur in einer bestimmten Subgruppe von Brustkrebsentitäten handeln sollte, was ist die Ursache dafür? Die Beantwortung der Fragen, ob die Transkription oder die Translation beschleunigt, die Stabilität der mRNA verbessert oder der Umsatz des Proteins vermindert sind, sollten Bestandteil noch bevorstehender Arbeiten sein.

# 6 Appendix

## 6.1 Anschreiben an die Einwohnermeldeämter

**Universitätsklinikum Würzburg**  
Klinikum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität

**Frauenklinik und Hebammenschule**  
Direktor: Prof. Dr. med. Johannes Diethl



---

Frauenklinik und Hebammenschule - Josef-Schneider-Str. 4 - 97080 Würzburg

«Anrede»  
«Vorname» «Name»  
«Straße»  
«PLZ» «Ort»

Würzburg, «Datum»

Sehr geehrte Damen und Herren,

wir möchten Sie höflichst bitten, die folgende Anschrift zu überprüfen:

«Name», «Vorname», «Geburtsname»  
«Geburtsdatum»  
«Straße», «PLZ», «Ort»

**Direktion:**  
Prof. Dr. Johannes Diethl

**Sekretariat:**  
Friederike Markert  
Tel.: (09 31) 2 01 – 2 52 51  
Fax: (09 31) 2 01 – 2 52 58  
frauenklinik@mail.uni-wuerzburg.de

Die Person ist gemeldet wie angegeben

Die Person ist verzogen:  
Neue Anschrift Wegzugsdatum

---

Die Person ist verstorben:  
Sterbedatum Sterbeort

---

Sonstige Bemerkungen

---

Diese Angaben werden ausschließlich für wissenschaftliche Forschungszwecke nach Art. 2 Bayer. Hochschulgesetz benötigt.

Die Universität ist eine Körperschaft des öffentlichen Rechts. Wir bitten deshalb um kostenlose Auskunft auf dem Wege der Amtshilfe, entsprechend Art. 8, Abs. 1 Verwaltungsverfahrensgesetz.

Mit vielem Dank im Voraus für Ihre Bemühungen und freundlichen Grüßen.



Prof. Dr. Johannes Diethl  
Direktor der Universitäts-Frauenklinik



PD Dr. Amd Hönig  
Oberarzt der Klinik

Universitätsklinikum Würzburg  
Frauenklinik und Hebammenschule  
Josef-Schneider-Straße 4  
97080 Würzburg

Tel. Pforte: (09 31) 2 01 – 2 52 53  
Fax Pforte: (09 31) 2 01 – 2 54 06  
frauenklinik@mail.uni-wuerzburg.de  
www.frauenklinik.uni-wuerzburg.de



UFK Würzburg

Das Klinikum ist mit der Straßenbahn, Linie 1 und 5 (Richtung Grombühl), Haltestelle Luitpoldkrankenhaus, zu erreichen.

## 6.2 Rohdaten der Patientenstudie

## Tumor-Patientinnen

Nr.	OP-Jahr	Alter bei Diagnosestellung	Grading	Staging	Diagnose	LASP-1-IRS	Kern-Status	Verstorben [J/N]	postop. Überleben [Jahre]
1	2006	51	G3	pT1c pN0 Mx L0 V0	Invasiv-duktales CA	4	⊕	N	1
2	2006	67	G2	pT2 pN1c Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	1
3	2006	59	G2	pT2 pN3 pMx L1	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	1
4	2006	54	G3	pT4 pN2a Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	J	1
5	2006	36	G2	pT1c pN0i Mx L1 V0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	1
6	2006	66	G3	pT1c pN1 Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	1
7	2006	49	G3	pT2 pN1 Mx L0 V0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	1
8	2006	53	G2	pT1c pN0 Mx L0 V0	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	1
9	2006	85	G2	pT1c pN0 Mx L0 V0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	1
10	2006	48	G3	pT2 pNo Mx L0 V0	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	1
11	2006	70	G2	pT1c pN0 Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	1
12	2006	75	G3	pT2 pN3a Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	J	0
13	2006	59	G3	pT1c pN2a Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	1
14	2005	48	G3	pT1b N0 (sn) pMx	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	0	⊖	N	2
15	2005	56	G2	pT1c pN1 pMx	Invasiv-duktales CA	0	⊖	N	2
16	2005	66	G3	pT1c (m) pN1a pMx	Invasiv-duktales CA	4	⊖	N	2
17	2005	65	G1	pT1c pN0 (sn) pMx pL0 pV0	Invasiv-duktales CA	2	⊖	N	2
18	2005	63	G3	pT2 pN1mi (sn) pMx	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	2
19	2005	78	G1	pT1c pN0 (sn) pMx	Invasiv-duktales CA	2	⊖	N	2
20	2005	75	G3	pT2 pN1a pMx	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	2
21	2005	44	G3	pT2 pN0 (i+) (sn) pMx	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	1	⊖	N	2
22	2005	45	G3	pT1c pN0 (sn) pMx	Invasiv-duktales CA	0	⊖	N	2
23	2005	58	G3	pT2 pN0 (sn) pMx	invasiv-duktales CA + high grade DCIS	0	⊖	N	2
24	2005	56	G3	ypT4d pN1 pMx	Invasiv-duktales CA + Inflammation	1	⊖	N	2
25	2005	46	G1	pT1b N0 (sn) pMx	Invasiv-tubuläres CA + DCIS Grad 1	0	⊖	N	2
26	2005	64	G2	pT1b N0 (sn) pMx	Invasiv-duktales CA + low grade DCIS	1	⊖	N	2
27	2005	71	G2	pT1c pN1a pMx	Invasiv-duktales CA	6	⊕	N	2
28	2005	70	G2	pT2 pN0 (sn) pMx	Invasiv-duktales CA	12	⊖	J	2
29	2005	62	G3	pT2 pN0 (sn) pMx	Invasiv-duktales CA	1	⊖	N	2
30	2005	62	G2	pT3 pN3a pMx L1 V0	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	1	⊖	N	2
31	2005	65	G3	pT1c pN1a pMx	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	4	⊖	N	2
32	2005	55	G2	pT2 pN3b pMx	Invasiv-duktales CA + DCIS Grad 2	12	⊕	N	2
33	2005	42	G3	pT1c (m) pN2a pMx	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	2	⊖	N	2
34	2005	50	G3	pT1c pN0 (sn) pMx pL0 pV0	Invasiv-duktales CA + non high grade DCIS	0	⊖	N	2
35	2005	73	G3	pT1c pN1 pMx pL1 PV0	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	2	⊖	N	2
36	2005	48	G2	mpT1c pN0 (sn) pMx	Invasiv-tubuläres CA + DCIS	0	⊖	N	2
37	2005	79	G3	pT4b pN2a pMx	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	2
38	2005	57	G3	pT2 pN2a pMx	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	2
39	2005	63	G2	pT2 pN1 (sn) pMx	Invasiv-tubuläres CA + DCIS	0	⊖	N	2
40	2005	73	G3	pT4b pN1a pMx	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	4	⊖	N	2
41	2005	62	G2	pT1c pN1a Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	2
42	2005	62	G2	pT2 pN0 Mx L1 V0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	2
43	2005	64	G2	pT1c pN0 Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	2
44	2005	74	G2	pT1b pN0 Mx	Invasiv-duktales CA	4	⊖	N	2



Nr.	OP-Jahr	Alter bei Diagnosestellung	Grading	Staging	Diagnose	LASP-1-IRS	Kern-Status	Verstorben [J/N]	postop. Überleben [Jahre]
45	2005	55	G3	pT2 pN2a Mx L1 V0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	2
46	2005	54	G3	pT1b pN0 Mx	Invasiv-duktales CA	4	⊖	N	2
47	2005	36	G2	pT1a pN1 Mx L1 V0	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	2
48	2005	45	G2	pT2a pN1a Mx	Invasiv-duktales CA	1	⊖	N	2
49	2005	49	G2	pT1c pN0 Mx	Invasiv-duktales CA	2	⊖	N	2
50	2005	66	G2	pT1b pN1 Mx L1 V0	Invasiv-duktales CA	1	⊖	N	2
51	2005	68	G3	pT1c pN1 Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	2
52	2005	34	G2	pT1c pN2 Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	2
53	2005	74	G3	pT4 pN2aiii Mx L1 V1	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	2
54	2005	57	G3	pT2 pN0 Mx L0 V0	Invasiv-duktales CA	6	⊕	N	2
55	2005	70	G2	pT2 pN1 Mx L1 V0	Invasiv-duktales CA	6	⊕	N	2
56	2005	55	G3	pT2a pN1mi Mx	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	2
57	2005	61	G2	pT2 pN1 pM1	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	2
58	2005	56	G2	pT4b pN1a pMx L1 V1	Invasiv-duktales CA	12	⊕	N	2
59	2005	65	G2	pT3 pN2a Mx	Invasiv-duktales CA	4	⊕	N	2
60	2005	37	G2	pT1c pN0 Mx L1	Invasiv-duktales CA	4	⊕	N	2
61	2005	80	G2	pT3 pN3 pM0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	J	2
62	2005	78	G2	pT1b pN0 Mx	Invasiv-duktales CA	4	⊕	N	2
63	2005	48	G3	pT1c pN0 Mx	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	2
66	2004	69	G2	pT1c pN0 pM0	Invasiv-duktales CA	12	⊖	N	3
67	2004	54	G3	mpT4d pN3 pM1	Invasiv-duktales CA	4	⊖	N	3
68	2004	84	G2	pT1c pN1a pM1	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	8	⊖	J	0
69	2004	57	G2	pT1cm pN0 pMx	Multifokal invasiv-duktales CA	4	⊖	J	3
70	2004	55	G2	pT2 pN0 pMx	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	8	⊖	N	3
71	2004	51	G3	pT2(m) pN2a pMx	Multifokales invasiv-duktales CA + high grade DCIS + M. Paget	12	⊖	N	3
72	2004	81	G3	pT4b pN2a pMx	Invasiv-duktales CA	12	⊖	J	2
73	2004	78	G3	pT2 pN2a(sn) pMx	Invasiv-duktales CA	8	⊖	J	1
74	2001	36	G3	pT1c pN1biii pM0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	6
75	2001	41	G3	pT3 pN1bi pM0	Invasiv-duktales CA + high grade DCIS	8	⊖	N	6
76	2000	49	G2	pT2 pN1biii pM0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	7
77	2000	67	G3	pT2 pN0 pM0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	7
78	2000	69	G3	pT3 pN1biii pMx	Invasiv-duktales CA	6	⊖	J	5
79	2000	76	G3	pT4d pN1biv pM1	Invasiv-duktales CA + Inflammation	8	⊖	J	1
80	2000	69	G2	pT2 pN1biii pM1	Invasiv-duktales CA	12	⊖	N	7
81	2000	53	G2	pT2 pN1biii pM0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	7
82	2000	65	G3	pT4b pN1biv pM0	Invasiv-duktales CA	12	⊖	J	2
83	1995	73	/	pT1b pN0 M0	Invasiv-papilläres CA	8	⊖	N	12
84	1995	46	/	pT1c pN0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	12
85	1995	53	G2	pT2 pN1b M0 L1	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	12
86	1995	49	/	pT1c N0 M0 L1	Invasiv-duktales CA mit intraduktalen Ausläufern	3	⊖	N	12
87	1995	71	/	pTis N0 M0	Intraduktales CA	8	⊖	N	12
88	1995	75	/	pT1c N0 M0	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	12
89	1995	50	/	pTis N0 M0	Intraduktales CA	8	⊖	N	12
90	1995	47	/	pT1c N21b M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	12
91	1995	57	/	pT1c pN0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	12
92	1995	43	/	pT1b N0 M0 L1	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	12
93	1995	51	/	pT1s N0 M0	Intraduktales CA	6	⊖	N	12
94	1995	67	/	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	12
95	1995	55	/	T1 N0 M0	Invasiv-duktales, vorwiegend tubuläres CA	3	⊖	N	12
96	1995	50	/	pT1a N0 M0	Intraduktales CA (Subtyp apokrines Clinching)	8	⊕	N	12
97	1995	50	/	pT2 N1a M0 L1	Invasiv-duktales, teilweise muzinöses CA	4	⊖	N	12

Nr.	OP-Jahr	Alter bei Diagnosestellung	Grading	Staging	Diagnose	LASP-1-IRS	Kern-Status	Verstorben [J/N]	postop. Überleben [Jahre]
98	1994	35	/	pT2 N1biii M0 L1	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	13
99	1994	42	/	T1 N1 M0	Invasiv-duktales CA mit invasiver Komponente	6	⊕	N	13
100	1994	54	/	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	0	⊖	N	13
101	1994	63	/	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	13
102	1994	59	/	pT1c N1 M0	Invasiv-duktales CA	9	⊖	J	13
103	1993	42	/	pT1c N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	14
104	1993	56	/	pT1c N1biii Mo	Invasiv-duktales CA	6	⊖	N	11
105	1993	64	/	Tis N0 M0	Intraduktales CA, Comedo-CA	8	⊖	N	14
106	1993	44	G2	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	14
107	1993	63	G2	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	12	⊕	N	15
108	1993	67	/	pT1b N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	J	14
109	1993	41	G2	pT2 N1 M0 L1	Invasiv-duktales CA	4	⊖	J	12
110	1992	55	/	T2 N1bI M0	Invasiv-medulläres CA	2	⊖	N	15
111	1992	45	G2	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	15
112	1992	63	/	pT1c N0 M0	Invasiv-duktales CA	2	⊖	N	15
113	1992	56	/	pT2 pN1bIV M0	Invasiv-duktales CA	4	⊖	J	2
114	1992	56	/	pT1 N1 M0	Invasiv-tubuläres CA	6	⊖	N	15
115	1992	71	/	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	15
116	1992	42	/	T1 N1 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	15
117	1992	53	/	pT1c N2 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	J	2
118	1992	59	/	pT1c N0 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊖	N	15
119	1992	36	/	pT2 N1bIV M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	J	6
120	1991	48	/	T1 N0 M0	Invasives/intraduktales CA	8	⊖	N	16
121	1991	44	G2/ 3	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	16
122	1991	41	/	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊖	N	16
123	1991	41	/	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊕	J	3
124	1991	46	/	pT1b N0 M0	Invasiv-duktales CA	4	⊖	N	16
125	1991	59	/	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	J	16
126	1991	51	/	pT1c N0 M0	Invasiv-muzinöses CA	2	⊖	N	16
127	1991	60	/	pT1 N0 M0 L1	Invasiv-duktales CA	2	⊖	N	16
128	1991	52	/	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	0	⊖	N	16
129	1990	52	G1	pT1c N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	17
130	1990	61	/	T1 N0 M0	tubuläres CA	6	⊕	N	17
131	1990	49	G2	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊕	J	6
132	1990	34	G2	T1 N0 M0 L1	Invasiv-duktales CA	8	⊖	J	6
133	1990	42	/	T1 N0 M0	Adeno-szirrhöses CA	8	⊖	N	18
134	1990	56	/	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	17
135	1990	45	G1	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	17
136	1990	54	G2	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	4	⊖	N	17
137	1990	40	G2	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	17
138	1989	68	/	T1 N0 M0	Invasiv-muzinöses CA	4	⊖	J	7
139	1989	52	G2	T1 N1 M0	Invasiv-duktales CA	3	⊖	N	18
140	1989	42	G3	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊖	N	18
141	1989	59	G2	pT1 N1 M0	Invasives, solides duktales CA	4	⊖	J	6
142	1988	65	G3	T1 N0 M0	Undifferenziertes, invasives teils medulläres CA	8	⊖	J	4
143	1988	41	G2	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	19
144	1988	53	G2	pT1 pN1 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	J	18
145	1988	48	/	pT2 N0 M0	Invasiv-tubuläres/duktales CA	12	⊕	N	19
146	1988	51	G2	T2 N2 M0	Invasives, solides duktales CA	8	⊖	N	3
147	1988	57	G2	T1 N1 MX	Invasives, teils tubuläres, teils solides duktales CA	6	⊕	J	2
148	1988	66	G2	T1 N0 M0	Invasives, solides duktales CA	8	⊕	J	1

Nr.	OP-Jahr	Alter bei Diagnosestellung	Grading	Staging	Diagnose	LASP-1-IRS	Kern-Status	Verstorben [J/N]	postop. Überleben [Jahre]
149	1988	56	G1	T2 N2 M0	Invasives, solides duktales CA	8	⊕	J	12
150	1988	54	G2	pT1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	4	⊖	J	11
151	1988	43	G2	pT1 N0 M0	Invasives, solides duktales CA	4	⊖	N	16
152	1988	44	G2	pT1 N1 M0	Invasives, solides duktales CA	8	⊕	J	17
153	1988	35	G1	pT1 N2 M0	Invasives, solides duktales CA	8	⊕	N	3
154	1988	48	/	pT1 N0 M0	Invasives, solides/tubuläres CA	8	⊖	N	19
155	1987	33	G2	T1 N1 M0	Invasiv-solides CA	6	⊕	J	10
156	1987	62	G2	T1 N2a M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	J	8
157	1987	44	G2	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	20
158	1987	52	/	T2 N1b M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	20
159	1987	49	G2	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	J	3
160	1987	35	G2	pT1a N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	20
161	1987	49	G2	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊖	N	20
162	1987	57	G2	pT2 N2 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	20
163	1987	50	G2	pT1 N0 M0	Invasives, solides/tubuläres CA	8	⊕	N	20
164	1987	52	G2	T1 N0 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊖	N	20
165	1987	38	G2	pT1 N0 M0	Invasives, solides duktales CA	6	⊕	N	16
166	1986	53	/	T2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	2	⊖	N	21
167	1986	57	G2	pT1a N2 M0	Invasives, solides tubuläres CA	12	⊖	N	22
168	1986	71	/	T2 N0 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊖	N	9
169	1986	44	G3	T1 N0 M0	medulläres CA	4	⊕	N	21
170	1986	32	/	pT1 N1 M0	invasives duktales CA	2	⊖	J	2
171	1986	50	G2	pT1 N0 M0	medulläres CA	2	⊕	J	2
172	1986	44	/	pT2 N0 M0	Invasiv-duktales und Comedo-CA	6	⊕	J	5
173	1986	48	/	T1 N1 M0	Invasiv-duktales CA	8	⊕	N	21
174	1986	44	/	pT1 N1 M0	Comedo- und invasive duktales CA	8	⊕	J	8
175	1985	41	/	T1 N1 M0	Invasiv-duktales CA	6	⊕	N	22
176	1985	41	/	T1 N1 M1	Invasiv-duktales CA	6	⊖	J	10
177	1985	38	/	T1 N1 M0 L1	Drüsig-solides CA	6	⊖	N	22

**Kontroll-Patientinnen**

Nr.	OP-Jahr	Alter bei Operation	Diagnose	LASP-1-IRS	Kern-Status
201	2007	33	fibrolipomatöse Makromastie	0	⊖
202	2007	44	Makromastie mit perilobulär akzentuierter Fibrose	2	⊖
203	1994	45	Brustdrüsengewebe, Fibroadenom	0	⊖
204	1993	42	Fibrozystische Mastopathie mit fokaler, leichter Epitheliose und sklerosierender Adenose	0	⊖
205	1993	36	Leichte, chronische, unspezifische Mastitis	0	⊖
206	1993	21	Leichtes, sklerosiertes Mammagewebe	0	⊖
207	1993	34	Geringe herdförmige Fibrosierung, fokale Adenose	4	⊖
208	1993	22	Juveniles fibroadenomatöse Makromastie	0	⊖
209	1993	22	Teils fibröse, teils lipomatöse Makromastie	0	⊖
210	1992	30	Fibroadenom, fibröse Mastopathie	4	⊖

### 6.3 Rohdaten der Genetischen Untersuchung zur Amplifikation von LASP-1 in Kontroll-Brustgewebe

Kontroll-Brustgewebe					
Probe	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
201	1	LASP-1	30,6	30,8	1,03089431
	2	LASP-1	30,9		
	3	GAPDH	30,5	31,7	
	4	GAPDH	32,9		
202	1	LASP-1	28,6	28,7	1,04363002
	2	LASP-1	28,7		
	3	GAPDH	30,2	29,9	
	4	GAPDH	29,6		
203	1	LASP-1	29,5	29,9	1,00507185
	2	LASP-1	29,9		
	3	LASP-1	29,6		
	4	LASP-1	29,3		
	5	GAPDH	29,7	29,6	
	6	GAPDH	29,5		
	7	GAPDH	29,9		
	8	GAPDH	29,8		
204	1	LASP-1	29,8	29,9	0,9916318
	2	LASP-1	29,8		
	3	LASP-1	29,9		
	4	LASP-1	30,0		
	5	GAPDH	29,4	29,6	
	6	GAPDH	29,4		
	7	GAPDH	30,1		
	8	GAPDH	29,6		
205	1	LASP-1	30,0	29,5	0,97370653
	2	LASP-1	29,3		
	3	LASP-1	29,0		
	4	LASP-1	29,6		
	5	GAPDH	29,5	28,7	
	6	GAPDH	28,2		
	7	GAPDH	28,3		
	8	GAPDH	28,8		
206	1	LASP-1	29,5	29,5	1,0610687
	2	LASP-1	28,9		
	3	LASP-1	29,9		
	4	LASP-1	29,6		
	5	GAPDH	30,9	31,3	
	6	GAPDH	29,9		
	7	GAPDH	30,8		
	8	GAPDH	33,5		

Kontroll-Brustgewebe					
Probe	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
207	1	LASP-1	27,2	27,4	0,83773929
	2	LASP-1	26,4		
	3	LASP-1	28,0		
	4	LASP-1	28,1		
	5	GAPDH	22,6	23,0	
	6	GAPDH	21,5		
	7	GAPDH	24,7		
	8	GAPDH	23,1		
208	1	LASP-1	27,0	27,1	0,86082949
	2	LASP-1	27,3		
	3	LASP-1	27,2		
	4	LASP-1	27,0		
	5	GAPDH	23,9	23,4	
	6	GAPDH	22,4		
	7	GAPDH	23,3		
	8	GAPDH	23,8		
209	1	LASP-1	30	29,8	0,9394958
	2	LASP-1	29,8		
	3	LASP-1	29,6		
	4	LASP-1	29,6		
	5	GAPDH	27,9	28,0	
	6	GAPDH	27,8		
	7	GAPDH	27,9		
	8	GAPDH	28,2		
210	1	LASP-1	30,0	28,9	0,95497835
	2	LASP-1	28,8		
	3	LASP-1	28,0		
	4	LASP-1	28,7		
	5	GAPDH	27,3	27,6	
	6	GAPDH	28,3		
	7	GAPDH	26,9		
	8	GAPDH	27,8		

Mittelwert  $\mu$   
0,96990462

Standardabweichung  $s$   
0,074313056

Erwartungswerte  $\mu \pm 2 \cdot s$   
[0,821278502; 1,118530727]

### 6.4 Rohdaten der Genetischen Untersuchung zur Amplifikation von LASP-1 in Tumorgewebe

Brustkrebsgewebe						
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]	
18	1	LASP-1	28,7			
	2	LASP-1	29,0			
	3	LASP-1	28,1			
	4	LASP-1	28,5			
	5	LASP-1	29,0	29,0		
	6	LASP-1	29,9			
	7	LASP-1	29,4			
	8	LASP-1	29,4			
	9	GAPDH	23,8			0,87586207
	10	GAPDH	25,1			
	11	GAPDH	25,0			
	12	GAPDH	24,9			
	13	GAPDH	25,1	25,4		
	14	GAPDH	26,4			
	15	GAPDH	26,6			
	16	GAPDH	26,3			
9	1	LASP-1	28,2			
	2	LASP-1	28,0	27,9		
	3	LASP-1	27,8			
	4	LASP-1	27,6			
	5	GAPDH	21,7			0,77419355
	6	GAPDH	21,7			
	7	GAPDH	21,1	21,6		
	8	GAPDH	21,9			
17	1	LASP-1	27,7			
	2	LASP-1	27,1	27,5		
	3	LASP-1	27,7			
	4	LASP-1	27,4			
	5	GAPDH	24,2			0,8944495
	6	GAPDH	24,8			
	7	GAPDH	24,7	24,6		
	8	GAPDH	24,6			
53	1	LASP-1	27,3			
	2	LASP-1	28,9	28,0		
	3	LASP-1	27,7			
	4	LASP-1	28,0			
	5	GAPDH	22,2			0,81411975
	6	GAPDH	22,1			
	7	GAPDH	23,1	22,8		
	8	GAPDH	23,7			

Brustkrebsgewebe					
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
15	1	LASP-1	28,5	28,1	0,81639929
	2	LASP-1	27,8		
	3	LASP-1	28,4		
	4	LASP-1	27,5		
	5	GAPDH	23,7	22,9	
	6	GAPDH	21,5		
	7	GAPDH	23,3		
	8	GAPDH	23,1		
14	1	LASP-1	27,8	27,5	0,88808007
	2	LASP-1	27,0		
	3	LASP-1	27,8		
	4	LASP-1	27,3		
	5	GAPDH	24,5	24,4	
	6	GAPDH	23,8		
	7	GAPDH	24,7		
	8	GAPDH	24,6		
40	1	LASP-1	27,8	28,4	0,86191733
	2	LASP-1	28,4		
	3	LASP-1	28,1		
	4	LASP-1	29,4		
	5	GAPDH	25,0	24,5	
	6	GAPDH	24,1		
	7	GAPDH	24,3		
	8	GAPDH	24,6		
7	1	LASP-1	26,6	27,0	0,83148148
	2	LASP-1	27,2		
	3	LASP-1	27,0		
	4	LASP-1	27,2		
	5	GAPDH	22,2	22,5	
	6	GAPDH	22,3		
	7	GAPDH	22,8		
	8	GAPDH	22,5		
48	1	LASP-1	27,6	27,9	0,84021544
	2	LASP-1	28,0		
	3	LASP-1	27,6		
	4	LASP-1	28,2		
	5	GAPDH	23,3	23,4	
	6	GAPDH	23,9		
	7	GAPDH	24,5		
	8	GAPDH	22,8		
64	1	LASP-1	23,9	22,6	1,0320442
	2	LASP-1	23,2		
	3	LASP-1	21,7		
	4	LASP-1	21,7		
	5	GAPDH	24,3	23,4	
	6	GAPDH	23,2		
	7	GAPDH	22,8		
	8	GAPDH	23,1		



Brustkrebsgewebe					
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
71	1	LASP-1	25,2	25,7	1,01166181
	2	LASP-1	24,9		
	3	LASP-1	26,1		
	4	LASP-1	26,7		
	5	GAPDH	25,3	26,0	
	6	GAPDH	25,1		
	7	GAPDH	26,7		
	8	GAPDH	27,0		
36	1	LASP-1	30,2	29,3	0,87350427
	2	LASP-1	29,2		
	3	LASP-1	29,8		
	4	LASP-1	27,8		
	5	GAPDH	25,9	25,6	
	6	GAPDH	26,0		
	7	GAPDH	25,5		
	8	GAPDH	24,8		
42	1	LASP-1	26,4	26,9	0,86153846
	2	LASP-1	27,3		
	3	LASP-1	25,3		
	4	LASP-1	25,0		
	5	GAPDH	22,8	22,7	
	6	GAPDH	22,6		
	7	GAPDH	22,2		
	8	GAPDH	22,0		
70	1	LASP-1	26,7	27,1	0,91236162
	2	LASP-1	26,8		
	3	LASP-1	27,4		
	4	LASP-1	27,5		
	5	GAPDH	24,9	24,7	
	6	GAPDH	24,3		
	7	GAPDH	25,5		
	8	GAPDH	24,7		
34	1	LASP-1	18,8	18,9	1,27984085 ↑
	2	LASP-1	18,8		
	3	LASP-1	19,0		
	4	LASP-1	18,8		
	5	GAPDH	23,8	24,1	
	6	GAPDH	24,0		
	7	GAPDH	24,8		
	8	GAPDH	23,9		
29	1	LASP-1	29,2	29,5	0,88898305
	2	LASP-1	29,5		
	3	LASP-1	29,7		
	4	LASP-1	29,6		
	5	GAPDH	26,1	26,2	
	6	GAPDH	26,6		
	7	GAPDH	25,8		
	8	GAPDH	26,4		

Brustkrebsgewebe					
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
6	1	LASP-1	28,4	28,3	0,84289497
	2	LASP-1	28,0		
	3	LASP-1	28,8		
	4	LASP-1	28,1		
	5	GAPDH	23,4	23,9	
	6	GAPDH	24,2		
	7	GAPDH	23,8		
	8	GAPDH	24,1		
25	1	LASP-1	29,5	29,7	0,88131313
	2	LASP-1	29,6		
	3	LASP-1	29,6		
	4	LASP-1	30,1		
	5	GAPDH	26,5	26,2	
	6	GAPDH	25,8		
	7	GAPDH	26,1		
	8	GAPDH	26,3		
41	1	LASP-1	27,8	27,7	0,88527552
	2	LASP-1	27,6		
	3	LASP-1	27,2		
	4	LASP-1	28,1		
	5	GAPDH	24,2	24,5	
	6	GAPDH	24,3		
	7	GAPDH	24,8		
	8	GAPDH	24,7		
1	1	LASP-1	27,8	28,0	0,86493739
	2	LASP-1	27,5		
	3	LASP-1	28,6		
	4	LASP-1	27,9		
	5	GAPDH	23,9	24,2	
	6	GAPDH	23,5		
	7	GAPDH	24,3		
	8	GAPDH	25,0		
21	1	LASP-1	29,0	28,9	0,84502165
	2	LASP-1	29,4		
	3	LASP-1	28,7		
	4	LASP-1	28,4		
	5	GAPDH	24,6	24,4	
	6	GAPDH	24,5		
	7	GAPDH	24,1		
	8	GAPDH	24,4		
20	1	LASP-1	29,8	29,5	0,98052498
	2	LASP-1	29,1		
	3	LASP-1	29,8		
	4	LASP-1	29,4		
	5	GAPDH	28,0	29,0	
	6	GAPDH	30,1		
	7	GAPDH	28,5		
	8	GAPDH	29,2		

Brustkrebsgewebe					
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
31	1	LASP-1	27,7	28,0	0,87310098
	2	LASP-1	28,1		
	3	LASP-1	28,2		
	4	LASP-1	27,9		
	5	GAPDH	24,6	24,4	
	6	GAPDH	24,4		
	7	GAPDH	24,2		
	8	GAPDH	24,5		
23	1	LASP-1	28,7	28,6	0,83304196
	2	LASP-1	28,6		
	3	LASP-1	28,7		
	4	LASP-1	28,4		
	5	GAPDH	23,9	23,8	
	6	GAPDH	24,2		
	7	GAPDH	23,3		
	8	GAPDH	23,9		
19	1	LASP-1	29,9	29,8	0,98991597
	2	LASP-1	29,6	29,5	
	3	GAPDH	28,6		
	4	GAPDH	30,3		
45	1	LASP-1	28,0	27,7	0,87364621
	2	LASP-1	27,4	24,2	
	3	GAPDH	24,3		
	4	GAPDH	24,1		
69	1	LASP-1	30,0	29,8	0,87751678
	2	LASP-1	29,6	26,2	
	3	GAPDH	26,8		
	4	GAPDH	25,5		
30	1	LASP-1	28,6	28,9	0,68457539
	2	LASP-1	29,1	19,8	
	3	GAPDH	9,8		
	4	GAPDH	29,7		
68	1	LASP-1	28,3	28,1	0,907473310
	2	LASP-1	27,9	25,5	
	3	GAPDH	24,9		
	4	GAPDH	26,1		
81	1	LASP-1	28,6	29,2	1,001715266
	2	LASP-1	29,7	29,2	
	3	GAPDH	29,3		
	4	GAPDH	29,1		
59	1	LASP-1	30,3	30,2	0,968490879
	2	LASP-1	30,0	29,2	
	3	GAPDH	29,6		
	4	GAPDH	28,8		
79	1	LASP-1	29,4	29,7	1,099326599
	2	LASP-1	30,0	32,7	
	3	GAPDH	32,2		
	4	GAPDH	33,1		

Brustkrebsgewebe					
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
35	1	LASP-1	29,6	29,5	0,930508475
	2	LASP-1	29,4		
	3	GAPDH	27,8	27,5	
	4	GAPDH	27,1		
38	1	LASP-1	30,6	30,3	0,905940594
	2	LASP-1	30,0		
	3	GAPDH	27,7	27,5	
	4	GAPDH	27,2		
52	1	LASP-1	28,2	27,6	0,849364791
	2	LASP-1	26,9		
	3	GAPDH	24,3	23,4	
	4	GAPDH	22,5		
33	1	LASP-1	30,1	30,0	0,820000000
	2	LASP-1	29,9		
	3	GAPDH	25,3	24,6	
	4	GAPDH	23,9		
72	1	LASP-1	27,5	27,9	0,88509874
	2	LASP-1	28,2		
	3	GAPDH	24,7	24,7	
	4	GAPDH	24,6		
65	1	LASP-1	27,6	27,9	0,86894075
	2	LASP-1	28,1		
	3	GAPDH	24,5	24,2	
	4	GAPDH	23,9		
75	1	LASP-1	31,4	31,7	0,96208531
	2	LASP-1	31,9		
	3	GAPDH	30,3	30,5	
	4	GAPDH	30,6		
50	1	LASP-1	30,7	29,8	0,89243698
	2	LASP-1	28,8		
	3	GAPDH	26,9	26,6	
	4	GAPDH	26,2		
49	1	LASP-1	27,2	27,4	0,8464351
	2	LASP-1	27,5		
	3	GAPDH	23,1	23,2	
	4	GAPDH	23,2		
12	1	LASP-1	27,7	27,1	0,90221402
	2	LASP-1	26,5		
	3	GAPDH	24,8	24,5	
	4	GAPDH	24,1		
54	1	LASP-1	28,3	28,1	0,91459075
	2	LASP-1	27,9		
	3	GAPDH	26,0	25,7	
	4	GAPDH	25,4		
57	1	LASP-1	29,0	28,8	0,84869565
	2	LASP-1	28,5		
	3	GAPDH	24,0	24,4	
	4	GAPDH	24,8		

Brustkrebsgewebe					
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
55	1	LASP-1	27,8	27,6	0,84782609
	2	LASP-1	27,4		
	3	GAPDH	23,8	23,4	
	4	GAPDH	23,0		
32	1	LASP-1	27,1	27,6	0,88384755
	2	LASP-1	28,0		
	3	GAPDH	24,6	24,4	
	4	GAPDH	24,1		
74	1	LASP-1	30,4	31,1	0,96618358
	2	LASP-1	31,7		
	3	GAPDH	30,1	30,0	
	4	GAPDH	29,9		
51	1	LASP-1	26,7	26,4	0,94686907
	2	LASP-1	26,0		
	3	GAPDH	25,2	25,0	
	4	GAPDH	24,7		
3	1	LASP-1	29,0	28,9	0,85121107
	2	LASP-1	28,8		
	3	GAPDH	24,7	24,6	
	4	GAPDH	24,5		
11	1	LASP-1	28,3	28,4	0,8377425
	2	LASP-1	28,4		
	3	GAPDH	23,7	23,8	
	4	GAPDH	23,8		
66	1	LASP-1	30,9	30,5	0,89326765
	2	LASP-1	30,0		
	3	GAPDH	27,2	27,2	
	4	GAPDH	27,2		
10	1	LASP-1	29,0	28,1	0,91814947
	2	LASP-1	27,2		
	3	GAPDH	25,6	25,8	
	4	GAPDH	26,0		
58	1	LASP-1	28,3	28,1	0,89857651
	2	LASP-1	27,9		
	3	GAPDH	25,2	25,3	
	4	GAPDH	25,3		
56	1	LASP-1	29,5	29,4	0,8537415
	2	LASP-1	29,3		
	3	GAPDH	24,7	25,1	
	4	GAPDH	25,5		
4	1	LASP-1	28,2	28,3	0,87256637
	2	LASP-1	28,3		
	3	GAPDH	24,4	24,7	
	4	GAPDH	24,9		
67	1	LASP-1	29,0	29,1	0,87091222
	2	LASP-1	29,1		
	3	GAPDH	25,5	25,3	
	4	GAPDH	25,1		

Brustkrebsgewebe					
Proben-Nr.	Sample	Primer	C <sub>t</sub> -Wert	MC <sub>t</sub>	MC <sub>t</sub> [GAPDH] / MC <sub>t</sub> [LASP-1]
46	1	LASP-1	27,3	27,4	0,84124088
	2	LASP-1	27,5		
	3	GAPDH	22,8	23,1	
	4	GAPDH	23,3		
78	1	LASP-1	32,7	31,8	0,94488189
	2	LASP-1	30,8		
	3	GAPDH	30,2	30,0	
	4	GAPDH	29,8		
24	1	LASP-1	30,9	30,1	0,91694352
	2	LASP-1	29,3		
	3	GAPDH	27,3	27,6	
	4	GAPDH	27,9		
82	1	LASP-1	28,7	29,2	0,89365352
	2	LASP-1	29,6		
	3	GAPDH	26,2	26,1	
	4	GAPDH	25,9		
39	1	LASP-1	29,6	28,7	0,86062718
	2	LASP-1	27,8		
	3	GAPDH	24,7	24,7	
	4	GAPDH	24,7		
2	1	LASP-1	26,8	27,1	0,87245841
	2	LASP-1	27,3		
	3	GAPDH	23,4	23,6	
	4	GAPDH	23,8		
28	1	LASP-1	30,4	30,6	0,88707038
	2	LASP-1	30,7		
	3	GAPDH	26,8	27,1	
	4	GAPDH	27,4		

Feld „Proben-Nr.“ entspricht dem Feld „Nr.“ in **6.2 Rohdaten der Patientenstudie**.

## 6.5 Verwendete Protokolle

### Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung:

Gewebeschnitte für ... inkubieren in...

Entparaffinieren:

10 Minuten Xylol 1

10 Minuten Xylol 2

Hydratisieren:

1 Minute 100 % Ethanol

1 Minute 100 % Ethanol

1 Minute 96 % Ethanol

1 Minute 96 % Ethanol

1 Minute 70 % Ethanol

1 Minute Aqua destillata

Färben:

1,5 Minuten Hämalaun

2,5 Minuten Leitungswasser 1, danach erneuern

2,5 Minuten Leitungswasser 2, danach erneuern

Gut mit Aqua destillata spülen

1 Minute Eosin

2,5 Minuten Leitungswasser 1, danach erneuern

2,5 Minuten Leitungswasser 2

Entwässern:

1 Minute 70 % Ethanol

1 Minute 96 % Ethanol

1 Minute 96% Ethanol

1 Minute 100 % Ethanol

2 Minuten 100 % Ethanol

an Luft trocknen lassen

### Anti-LASP-1-Färbung:

Gewebeschnitte für ... inkubieren in...

Entparaffinieren:

10 Minuten Xylol 1

10 Minuten Xylol 2

Hydratisieren:

1 Minute 100 % Ethanol

1 Minute 100 % Ethanol

1 Minute 96 % Ethanol

1 Minute 96 % Ethanol

1 Minute 70 % Ethanol

1 Minute Aqua destillata

Kochen, 800 W Mikrowelle:

5 Minuten 0,01 M Zitronensäurepuffer

5 Minuten 0,01 M Zitronensäurepuffer

**Fortsetzung Anti-LASP-1-Färbung:**

Abkühlen:

20 Minuten

Gründlich Waschen      PBS

Blockade der endogenen Gewebeperoxidase:

10 Minuten      3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol

Gründlich Waschen      PBS

Blockade unspezifischer Bindungskapazitäten:

15 Minuten      Beriglobin 1:10 in PBS      RT

Gründlich Waschen      PBS

Färbung:

Über Nacht      Anti-LASP-1-AK 1:1000 in DAKO anti-body diluent      4°C

Gründlich Waschen      PBS

30 Minuten      HRP-markiertes EnVision/rabbit detection system      RT

Gründlich Waschen      PBS

5 Minuten      Chromogen DAB      RT

Gründlich Waschen      PBS

2 Minuten      Hämalun

2,5 Minuten      Leitungswasser 1, danach erneuern

2,5 Minuten      Leitungswasser 2

Gut mit Aqua destillata spülen

Entwässern:

1 Minute      70 % Ethanol

1 Minute      96 % Ethanol

1 Minute      96 % Ethanol

1 Minute      100 % Ethanol

2 Minuten      100 % Ethanol

1 Minute      Xylol

Versiegelung mit Vitro-Clud

**Anti-PDEF-Färbung:**

Gewebeschnitte für ... inkubieren in...

Entparaffinieren:

10 Minuten      Xylol 1

10 Minuten      Xylol 2

Hydratisieren:

1 Minute      100 % Ethanol

1 Minute      100 % Ethanol

1 Minute      96 % Ethanol

1 Minute      96 % Ethanol

1 Minute      70 % Ethanol



**Fortsetzung Anti-PDEF-Färbung:**

1 Minute	Aqua destillata	
Kochen, 800 W Mikrowelle:		
5 Minuten	0,01 M Zitronensäurepuffer	
5 Minuten	0,01 M Zitronensäurepuffer	
Abkühlen:		
20 Minuten		
Gründlich Waschen	PBS	
Blockade der endogenen Gewebeperoxidase:		
10 Minuten	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol	
Gründlich Waschen	Aqua destillata	
Gründlich Waschen	PBS	
Blockade unspezifischer Bindungskapazitäten:		
15 Minuten	Beriglobin 1:50 in PBS	RT
Abkippen, nicht Waschen		
Färbung:		
Über Nacht	Rabbit Anti-PDEF-Antikörper 1:200 in DAKO antibody diluent	4°C
Gründlich Waschen	PBS	
15 Minuten	DAKO Biotinylierter Brückenantikörper (LSAB2 System-HRP)	RT
Gründlich Waschen	PBS	
15 Minuten	DAKO Streptavidin-HRP (LSAB2 System-HRP)	RT
Gründlich Waschen	PBS	
5 Minuten	Chromogen DAB	RT
Gründlich Waschen	PBS	
Entwässern:		
1 Minute	70 % Ethanol	
1 Minute	96 % Ethanol	
1 Minute	96 % Ethanol	
1 Minute	100 % Ethanol	
2 Minuten	100 % Ethanol	
1 Minute	Xylol	
Versiegelung mit Vitro-Clud		

**PCR und qRT-PCR**

1 x	Erhitzen	
	5 Minuten	95°C
35/40 x	Denaturierung	
	30 Sekunden	95°C
	Annealing	
	30 Sekunden	58°C
	Elongation	
	30 Sekunden	72°C

**Bei qRT-PCR, zusätzlich:**

Schmelzkurve

**Mikrodissektion, DNA-Isolation von mikrodissektierten Gewebeschnitten**

29 µl des Proteinase K-Lyse-Puffers in den Deckel eines Reaktionsgefäßes vorlegen

Reaktionsgefäß in Halterung einspannen

Mikrodissektion;  $\geq 200.000 - 250.000 \mu\text{m}^2$  ausschneiden

Mikrodissektiertes Gewebe fällt in das Cap

1 µl Proteinase K [3 mU/ml Lösung] zum Puffer hinzufügen

Reaktionsgefäße verschließen und auf dem Kopf stellen

Über 48 - 60 h bei 37°C im Brutschrank inkubieren

3 Minuten bei 14.000 g zentrifugieren

8 Minuten bei 95°C Proteinase K blocken

3 Minuten bei 14.000 g zentrifugieren

Aufbewahrung bei - 20°C; über Monate möglich

# 7 Literaturverzeichnis

1. Bach I: **The LIM domain: regulation by association.** *Mech Dev.* 2000, **91**:5-17.
2. Baddoura FK, Cohen C, Unger ER, DeRose PB, Chenggis M: **Image analysis for quantitation of estrogen receptor in formalin-fixed paraffin-embedded sections of breast carcinoma.** *Mod Pathol.* 1991, **4**(1):91-95.
3. Bièche I, Tomasetto C, Régnier CH, Moog-Lutz C, Rio MC, Lidereau R: **Two distinct amplified regions at 17q11-q21 involved in human primary breast cancer.** *Cancer Res.* 1996; **56**(17):3886-90.
4. Bustin SA: **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol.* 2000, **25**(2):169-93.
5. Butt E, Gambaryan S, Gottfert N, Galler A, Marcus K, Meyer HE: **Actin binding of human LIM and SH3 protein is regulated by cGMP- and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation on serine 146.** *J Biol Chem.* 2003, **278**:15601-15607.
6. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE: **Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.** *Proc Natl Acad Sci. USA* 1998, **85**(3):8790-8794.
7. Casey PM, Cerhan JR, Pruthi S: **Oral contraceptive use and risk of breast cancer.** *Mayo Clin Proc.* 2008 Jan, **83**(1):86-90.
8. Cheng KC, Loeb LA: **Genomic stability and instability: a working paradigm.** *Curr Top Microbiol Immunol.* 1997, **221**:5-18.
9. Cheson BD: **The International Harmonization Project for response criteria in lymphoma clinical trials.** *Hematol Oncol Clin North Am.* 2007, **21**(5):841-54.
10. Chew CS, Chen X, Parente JA, Jr., Tarrer S, Okamoto C, Qin HY: **Lasp-1 binds to non-muscle F-actin in vitro and is localized within multiple sites of dynamic actin assembly in vivo.** *J Cell Sci.* 2002, **115**:4787-4799.
11. Chew CS, Parente JA, Jr., Chen X, Chaponnier C, Cameron RS: **The LIM and SH3 domain-containing protein, lasp-1, may link the cAMP signaling pathway with dynamic membrane restructuring activities in ion transporting epithelia.** *J Cell Sci.* 2000, **113**(Pt 11):2035-2045.

12. Chew CS, Parente JA, Jr., Zhou C, Baranco E, Chen X: **Lasp-1 is a regulated phosphoprotein within the cAMP signaling pathway in the gastric parietal cell.** *Am J Physiol.* 1998, **275**:C56-67.
13. Collins JA, Blake JM, Crosignani PG: **Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment.** *Hum Reprod Update.* 2005, **11**(6):545-60.
14. Dalton LW, Pinder SE, Elston CE, Ellis IO, Page DL, Dupont WD, Blamey RW: **Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement.** *Mod Pathol.* 2000, **13**(7):730-735.
15. Dawid IB, Breen JJ, Toyama R: **LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions.** *Trends Genet.* 1998, **14**:156-162.
16. Dean-Colomb W, Esteva FJ: **Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond.** *Eur J Cancer.* 2008, **44**(18):2806-12.
17. Ehrig T, Abdulkadir SA, Dintzis SM, Milbrand J, Watson MA: **Quantitative Amplification of Genomic DNA from Histological Tissue Sections after Staining with Nuclear Dyes and Laser Capture Microdissection.** *J Mol Diag.* 2001, **3**(1):22-5.
18. Ellsworth DL, Shriver CD, Ellsworth RE, Deyarmin B, Somiari RI: **Laser Capture Microdissection of Paraffin-Embedded Tissues.** *BioTechniques.* 2003, **34**:42-46.
19. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA: **Laser Capture Microdissection.** *Science.* 1996, **274**(5289):998-1001.
20. Fackenthal JD, Olopade OI: **Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations.** *Nat Rev Cancer.* 2007, **7**(12):937-48.
21. Feldman RJ, Sementchenko VI, Gayed M, Fraig MM, Watson DK: **Pdef expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression.** *Cancer Res.* 2003, **63**(15):4626-31.
22. Fokas E, Engenhardt-Cabillic R, Daniilidis K, Rose F, An HX: **Metastasis: the seed and soil theory gains identity.** *Cancer Metastasis Rev.* 2007, **26**(3-4):705-15.
23. Friedl P, Wolf K: **Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.** *Nat Rev Cancer.* 2003, **3**(5):362-74.
24. Garcia M, Jemal A, Ward EM, Center MM, Hao Y, Siegel RL, Thun MJ: **Global Cancer Facts & Figures 2007.** Atlanta, GA: *American Cancer Society*, 2007.

25. Gerber B, Müller H, Reimer T, Krause A, Friese K: **Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat.* 2003, **79**(2):265-76.
26. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., RKI: **Krebs in Deutschland**, 2006, Saarbrücken.
27. Ghadersohi A, Pan D, Fayazi Z, Hicks DG, Winston JS, Li F: **Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) downregulates survivin expression and inhibits breast cancer cell growth in vitro and xenograft tumor formation in vivo.** *Breast Cancer Res Treat.* 2007, **102**(1):19-30.
28. Ginzinger DG: **Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream.** *Exp Hematol.* 2002, **30**(6):503-512.
29. Godfrey TE, Kim SH, Chavira M, Ruff DW, Warren RS, Gray JW, Jensen RH: **Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction.** *J Mol Diagn.* 2000, **2**(2):84-91.
30. Greenberg PA, Hortobagyi GN, Smith TL, Ziegler LD, Frye DK and Buzdar AU: **Long-term follow-up of patients with complete remission following combination chemotherapy for metastatic breast cancer.** *J Clin Oncol.* 1996, **14**(8):2197-205.
31. Grunewald TG, Butt E: **The LIM- and SH3 Domain Protein Family: Structural Proteins or Signal Transducers or both?** *Mol Cancer.* 2008, **7**:31.
32. Grunewald TG, Kammerer U, Kapp M, Eck M, Dietl J, Butt E, Honig A: **Nuclear localization and cytosolic overexpression of LASP-1 correlates with tumor size and nodal-positivity of human breast carcinoma.** *BMC Cancer.* 2007, **7**:198.
33. Grunewald TG, Kammerer U, Schulze E, Schindler D, Honig A, Zimmer M, Butt E: **Silencing of LASP-1 influences zyxin localization, inhibits proliferation and reduces migration in breast cancer cells.** *Exp Cell Res.* 2006, **312**(7):974-982.
34. Grunewald TG, Kammerer U, Winkler C, Schindler D, Sickmann A, Honig A, Butt E: **Overexpression of LASP-1 mediates migration and proliferation of human ovarian cancer cells and influences zyxin localisation.** *Br J Cancer.* 2007, **96**(2):296-305.
35. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell.* 2000, **100**(1):57-70.
36. Hanf V, Gonder U: **Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk.** *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005, **123**(2):139-49.

37. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: **Simultaneous amplification and detections of specific DNA sequences.** *Biotechnology.* 1992, **10**:1026-417.
38. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: **Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology.* 1993, **11**:1026-1030.
39. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH: **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991, **88**:7276-7280.
40. Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ: **Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells.** *Oncogene.* 2002, **21**(53):8196-8205.
41. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murry T, Tun MJ: **Cancer statistics, 2008.** *CA Cancer J Clin.* 2008, **58**(2):71-96.
42. Jumaa H, Hendriks RW, Reth M: **B cell signaling and tumorigenesis.** *Annu Rev Immunol.* 2005, **23**:415-45.
43. Kallioniemi OP, Kallioniemi A, Piper J, Isola J, Waldman FM, Gray JW, Pinkel D: **Optimizing Comparative Hybridization for Analysis of DNA Sequence Copy Number Changes in Solid Tumors.** *Genes Chromosom Cancer.* 1994, **10**(4):231-243.
44. Keicher C, Gambaryan S, Schulze E, Marcus K, Meyer HE, Butt E: **Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP- and cGMP-dependent protein kinase.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2004, **324**:308-316.
45. Kelsey JL, Gammon MD, John EM: **Reproductive factors and breast cancer.** *Epidemiol Rev.* 1993, **15**(1):36-47.
46. Kubba AA: **Breast cancer and the pill.** *J R Soc Med.* 2003 Jun, **96**(6):280-3.
47. La Vecchia C, Levi F, Lucchini F: **Descriptive epidemiology of male breast cancer in Europe.** *Int J Cancer.* 1992, **51**(1):62-66.
48. Lehmann U, Glöckner S, Kleeberger W, von Wasielewski HFR, Kreipe H: **Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction.** *Am J Pathol.* 2000, **156**(6):1855-1864.
49. Lehmann U, Kreipe H: **Real-Time PCR Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies.** *Methods.* 2001, **25**(4):409-418.

50. Lester J: **Breast cancer in 2007: incidence, risk assessment, and risk reduction strategies.** *Clin J Oncol Nurs.* 2007, **11**(5):619-22.
51. Li B, Zhuang L, Trueb B: **Zyxin interacts with the SH3 domains of the cytoskeletal proteins LIM-nebulette and Lasp-1.** *J Biol Chem.* 2004, **279**:20401-20410.
52. Li K, Hornshaw MP, van Minnen J, Smalla KH, Gundelfinger ED, Smit AB: **Organelle proteomics of rat synaptic proteins: correlation-profiling by isotope-coded affinity tagging in conjunction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry to reveal post-synaptic density specific proteins.** *J Proteome Res.* 2005, **4**:725-733.
53. Li S, Ting NSY, Zheng L, Chen PL, Ziv Y, Shiloh Y, Lee EHP, Lee WH: **Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response.** *Nature.* 2000, **406**(6792):210-215.
54. Lie YS, Petropoulos CJ: **Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays.** *Curr Opin Biotechnol.* 1998, **9**(1):43-8.
55. Lin YH, Park ZY, Lin D, Brahmabhatt AA, Rio MC, Yates JR, 3rd, Klemke RL: **Regulation of cell migration and survival by focal adhesion targeting of Lasp-1.** *J Cell Biol.* 2004, **165**:421-432.
56. Livak KJ, Flood SJA, Marmaro J, Giustu W, Deetz K: **Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite end provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization.** *PCR Methods and Applications.* 1995, **4**:357-362.
57. Loberg RD, Bradley DA, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Pienta KJ: **The Lethal Phenotype of Cancer - The Molecular Basis of Death Due to Malignancy.** *CA Cancer J Clin.* 2007, **57**(4):225-241.
58. Loeb KR, Loeb LA: **Significance of multiple mutations in cancer.** *Carcinogenesis.* 2000, **21**(3):379-385.
59. Loeb LA, Christians FC: **Multiple mutations in human cancers.** *Mutat Res.* 1996, **350**(1):279-286.
60. Mauriac L, Debled M, MacGrogan G: **When will more useful predictive factors be ready for use?** *Breast.* 2005, **14**(6):617-23.
61. McTiernan A: **Behavioral risk factors in breast cancer: can risk be modified?** *Oncologist.* 2003, **8**(4):326-34.
62. Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D, Marincola FM: **Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research.** *Trends Mol Med.* 2003, **9**(5):189-95.

63. Mullis KB, Faloona FA: **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction.** *Meth Enzymol.* 1987, **155**:335-350.
64. Nakagawa H, Terasaki AG, Suzuki H, Ohashi K, Miyamoto S: **Short-term retention of actin filament binding proteins on lamellipodial actin bundles.** *FEBS Lett.* 2006, **580**:3223-3228.
65. Nielsen DL, Andersson M, Kamby C: **HER2-targeted therapy in breast cancer. Monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors.** *Cancer Treat Rev.* 2009, **35**(2):121-36.
66. Opatrny L, Dell'Aniello S, Assouline S, Suissa S: **Hormone replacement therapy use and variations in the risk of breast cancer.** *BJOG.* 2008, **115**(2):169-75, discussion 175.
67. Orlando L, Colleoni M, Fedele P, Cusmai A, Rizzo P, D'Amico M, Chetri MC, Cinieri S: **Management of advanced breast cancer.** *Ann Oncol.* 2007, **18** Suppl 6:vi74-6.
68. Osborne CK: **Tamoxifen in the treatment of breast cancer.** *N Engl J Med.* 1998, **339**(22):1609-18.
69. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P: **Global cancer statistics, 2002.** *CA Cancer J Clin.* 2005, **55**(2):74-108.
70. Phillips GR, Anderson TR, Florens L, Gudas C, Magda G, Yates JR, 3rd, Colman DR: **Actin-binding proteins in a postsynaptic preparation: Lasp-1 is a component of central nervous system synapses and dendritic spines.** *J Neurosci Res.* 2004, **78**:38-48.
71. Rachlin AS, Otey CA: **Identification of palladin isoforms and characterization of an isoform-specific interaction between Lasp-1 and palladin.** *J Cell Sci.* 2006, **119**:995-1004
72. Ronckers CM, Erdmann CA, Land CE: **Radiation and breast cancer: a review of current evidence.** *Breast Cancer Res.* 2005, **7**(1):21-32.
73. Ross JS, Fletcher JA: **The HER-2/neu Oncogene in Breast Cancer: Prognostic Factor, Predictive Factor, and Target for Therapy.** *Oncologist.* 1998, **3**(4):237-252.
74. Sambrook JF, Maniatis T: **Molecular cloning – A laboratory manual.** Cold Spring Harbour Laboratory 1998, Cold Spring Harbor, New York
75. Sanchez-Garcia I, Rabbitts TH: **The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins.** *Trends Genet.* 1994, **10**:315-320.



76. Schlehe B, Schmutzler R: **Hereditäres Mammakarzinom.** *Chirurg.* 2008, **79**(11):1047-54.
77. Schreiber V, Moog-Lutz C, Regnier CH, Chenard MP, Boeuf H, Vonesch JL, Tomasetto C, Rio MC: **Lasp-1, a novel type of actin-binding protein accumulating in cell membrane extensions.** *Mol Med.* 1998, **4**:675-687.
78. Serth J, Kuczyk MA, Paeslack U, Lichtinghagen R, Jonas U: **Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections.** *Am J Pathol.* 2000, **156**(4):1189-96.
79. Singletary SE, Connolly JL: **Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual.** *CA Cancer J Clin.* 2006, **56**(1):37-47; quiz 50-31.
80. Singletary SE: **Rating the risk factors for breast cancer.** *Ann Surg.* 2003, **237**(4):474-82.
81. Spence HJ, McGarry L, Chew CS, Carragher NO, Scott-Carragher LA, Yuan Z, Croft DR, Olson MF, Frame M, Ozanne BW: **AP-1 differentially expressed proteins Krp1 and fibronectin cooperatively enhance Rho-ROCK-independent mesenchymal invasion by altering the function, localization, and activity of nondifferentially expressed proteins.** *Mol Cell Biol.* 2006, **26**:1480-1495.
82. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S: **Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids.** *Am J Pathol.* 2002, **161**(6):1961-71.
83. Strehl S, Borkhardt A, Slany R, Fuchs UE, Konig M, Haas OA: **The human LASP1 gene is fused to MLL in an acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q21).** *Oncogene.* 2003, **22**(1):157-160.
84. Tan PH, Bay BH, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, Lee CH, Li KB: **Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death.** *Mod Pathol.* 2005, **18**(3):374-381.
85. Tomasetto C, Moog-Lutz C, Regnier CH, Schreiber V, Basset P, Rio MC: **Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains.** *FEBS Lett.* 1995, **373**:245-249.
86. Tomasetto C, Regnier C, Moog-Lutz C, Mattei MG, Chenard MP, Lidereau R, Basset P, Rio MC: **Identification of four novel human genes amplified and overexpressed in breast carcinoma and localized to the q11-q21.3 region of chromosome 17.** *Genomics.* 1995, **28**(3):367-376.

87. Turcotte S, Forget MA, Beauseigle D, Nassif E, Lapointe R: **Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer.** *Neoplasia*. 2007, **9**(10):788-96.
88. Turner DP, Findlay VJ, Kirven AD, Moussa O, Watson DK: **Global Gene Expression Analysis Identifies PDEF Transcriptional Networks Regulating Cell Migration during Cancer Progression.** *Mol Biol Cell*. 2008, **19**(9):3745-57.
89. Turner DP, Moussa O, Sauane M, Fisher PB, Watson DK: **Prostate-derived ETS factor is a mediator of metastatic potential through the inhibition of migration and invasion in breast cancer.** *Cancer Res*. 2007, **67**(4):1618-25.
90. Tyagi S, Kramer FR: **Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.** *Nature Biotechnol*. 1996, **14**:303-308.
91. von Smolinski D, Leverkoehne I, von Samson-Himmelstjerna G, Gruber AD: **Impact of formalin-fixation and paraffin-embedding on the ratio between mRNA copy numbers of differently expressed genes.** *Histochem Cell Biol*. 2005, **124**(2):177-88.
92. Vousden KH, Lu X: **Live or let die: the cell's response to p53.** *Nat Rev Cancer*. 2002, **2**(8):594-604.
93. Wang B, Feng P, Xiao Z, Ren EC: **LIM and SH3 protein 1 (Lasp1) is a novel p53 transcriptional target involved in hepatocellular carcinoma.** *J Hepatol*. 2009 Mar, **50**(3):528-37.
94. Wetmore C: **Sonic hedgehog in normal and neoplastic proliferation: insight gained from human tumors and animal models.** *Curr Opin Genet Dev*. 2003, **13**(1):34-42.
95. Widakowich C, de Azambuja E, Gil T, Cardoso F, Dinh P, Awada A, Piccart-Gebhart M: **Molecular targeted therapies in breast cancer: where are we now?** *Int J Biochem Cell Biol*. 2007, **39**(7-8):1375-87.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Histologie Anti-LASP-1-gefärbter Schnittpräparate	21
2	Ablauf der LMD	24
3	Laser Mikrodisektion	25
4	DNA-Größenmarker	32
5	Prinzip von SYBR® Green I [gemäß 62]	33
6	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	34
7	Prinzip fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide [gemäß 62]	35
8	Übersicht über die Abfolge der Versuche	38
9	Vergleich der Primer LASP-1-1, -2 und -3	43
10	Vergleich des Extraktionskits mit der „in cap“ Präparation	45
11	Vergleich verschieden langer Proteolysezeiten	46
12	Fluoreszenzkurven von 6-FAM und Texas Red-X	49
13	Fluoreszenz- und Schmelzkurve von SYBR® Green I	50
14	Überlebenskurven	52
15	Histologie Anti-PDEF-gefärbter Schnittpräparate	55

# 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Sequenzen der Primerpaare	42
2	Mit Extraktionskits erzielte DNA-Konzentrationen	44
3	Sequenzen und Eigenschaften der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide	48
4	Korrelation der LASP-1-Lokalisation und -Expression zu klinisch-pathologischen und biologischen Parametern	53
5	Nukleäre LASP-1-Lokalisation verglichen mit dem Patientenüberleben	64

# 10 Abkürzungen

---

°C	Grad Celsius
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
<b>Abb.</b>	Abbildung
APES	3-Aminopropyltri-Ethoxysilan
<b>BHQ</b>	3'-terminaler Black Hole™ Dark Quencher
bp	Basenpaar(e), engl. base pair
BRCA1/2	<b>B</b> reast <b>C</b> ancer 1/2, early onset
BT-20	invasive, epitheliale, metastatische Brustkrebszelllinie
<b>CA</b>	Karzinom
CCD	Charge-coupled Device
cDNA	komplementäre <b>DNA</b> , engl. complementary
c-erbB-2	siehe <b>HER-2/neu</b> , human epidermal growth receptor 2
C <sub>t</sub>	qRT-PCR-Wiederholungsschleife bei Überschreiten des Schwellenwerts, engl. threshold cycle
<b>d. h.</b>	das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCIS	Duktales Karzinom in situ
DFS	Krankheitsfreies Überleben, engl. disease free survival
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate

---

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EtBr</b>	<b>E</b> thidium <b>b</b> romid
<b>EVA</b>	Ethyl-Vinyl-Acetat
<b>F</b>	
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>G</b>	
	Grading, Einteilung des Differenzierungsgrades eines Tumors
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<b>h</b>	
	Stunde(n)
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HER-2/neu</b>	human epidermal growth receptor 2, siehe <b>c-erbB-2</b>
<b>HRP</b>	Meerrettich-Peroxidase, engl. horseradish peroxidase
<b>I</b>	
<b>IR</b>	Infrarot
<b>IRS</b>	Immunreaktiver-Score
<b>K</b>	
<b>Ki67</b>	Antigen, Proliferationsmarker
<b>Krp1</b>	kelch related protein 1
<b>L</b>	
<b>LASP-1</b>	Lim- und SH3-Domänen Protein 1
<b>LCM</b>	Laser Capture Microdissection
<b>LIM</b>	Proteinmotiv, benannt nach den ersten drei Genen Lin 11, Isl 1, mec 3
<b>LK</b>	Lymphknoten
<b>LMD</b>	Laser Microdissection
<b>LMM</b>	Laser Microbeam Microdissection
<b>LMPC</b>	Laser Microdissection and Pressure Catapulting

---

<b>MCF-7</b>	epitheliale, metastatische Brustkrebszelllinie
<b>mRNA</b>	Boten-Ribonukleinsäure, engl. messenger
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	Polymerase-Ketten-Reaktion, engl. polymerase chain reaction
<b>PDEF</b>	Prostate derived Ets factor
<b>PEN</b>	Polyethylenphthalat
<b>PFS</b>	Progressionsfreies Überleben, engl. progression free survival
<b>PtK2</b>	Protoro Nierenzellen, engl. Potorous tridactylis kidney
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Real-Time-PCR
<b>RAD51</b>	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz
<b>RPMI 1640</b>	Zellkulturmedium, entwickelt am <b>Roswell Park Memorial Institute</b>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SDS</b>	Sodium-Dodezyl-Sulfat
<b>SH3</b>	Proteindomäne, src homology 3
<b>SK-OV-3</b>	epitheliale, metastatische Eierstockkrebszelllinie
<b>SYBR</b>	Fluoreszenzfarbstoff, von <b>Synergy Brands, Inc.</b>
<b>Taq</b>	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA

---

<b>TNM</b>	Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Erkrankungen, T = Tumor, N = Lymphknoten, M = Metastase
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TTP</b>	Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung, engl. time to progression
<b>U</b>	Unit; diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen je Minute ein Mikromol Substrat umsetzt
<b>WHO</b>	World Health Organization

---



# 11 Publikationen

---

Frietsch JJ, Grunewald TG, Jasper S, Kammerer U, Herterich S, Kapp M, Honig A, Butt E: **Nuclear localisation of LASP-1 correlates with poor long-term survival in female breast cancer.** *Br J Cancer.* 2010, **102**(11):1645-53.

---

# 12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau **Prof. Dr. rer. nat. Elke Butt-Dörje** (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor) für die Überlassung des Dissertationsthemas. Sie verstand es mich zum wissenschaftlichen Arbeiten anzuleiten und durch ihre herzliche und aufrichtige Art zu führen. Sie hat wesentlich durch viel konstruktive Kritik und unterstützende Gespräche zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Auf ihre Unterstützung konnte ich immer, auch außerhalb des Labors zählen!

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn **Priv.-Doz. Dr. med. Arnd Hönig** (Universitäts-Frauenklinik) für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats bedanken. Er hatte immer ein offenes Ohr für Fragen, die während der Dissertationsarbeit aufkamen und unterstützte mich mit vielen hilfreichen Tipps und wertvollen Diskussionen.

Frau **Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Kämmerer** (Universitäts-Frauenklinik) danke ich für ihre Unterstützung und ihre nützlichen Ratschläge bei der Begutachtung der histologischen Schnittpräparate und den statistischen Auswertungen.

Herrn **Dr. med. Thomas Grünewald** (Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München) möchte ich für die Unterstützung bei der Bewertung der histologischen Präparate, die vielen aufschlussreichen Erörterungen und Gespräche sowie seine wissenschaftliche Arbeit danken, die der meinen den Weg bereitete.

Frau **Petra Thalheimer** (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor) gebührt mein Dank, für ihre Hilfestellung und Geduld bei Fragen während der Durchführung meiner Versuche im Labor, Frau **Michaela Kapp** für ihre Unterstützung beim Anfertigen der histologischen Schnittpräparate. Frau **Ingrid Strauss**, Frau

---

**Friederike Markert**, Herrn **Harald Hirn** (alle Universitäts-Frauenklinik) sowie Herrn **Dr. rer. nat. Uwe Mäder** (Comprehensive Cancer Center Mainfranken) und Frau **Michaela Fuchs** (Stadt Würzburg) bin ich für ihre Hilfe und Tatenkraft bei der Aktualisierung der Patientendaten zu Dank verpflichtet.

Des Weiteren möchte ich Frau **Dr. rer. nat. Sabine Herterich** (Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor) für ihre Unterstützung und Tatkraft bei humangenetischen und molekularbiologischen Fragestellungen sowie bei der Durchführung der Real-Time-PCR danken. Dem Institut für Humangenetik, besonders der Arbeitsgruppe um **Prof. Dr. med. Detlev Schindler** danke ich für die Leihgabe des Real-Time-PCR-Gerätes.

Dem Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung möchte ich für die Bereitstellung des Mikrodisektion-Mikroskops, Herrn **Dr. rer. nat. Christian Korn** für die hilfsbereite Einführung in die Benutzung des Gerätes danken.

Frau **Regina Mark** möchte ich für die hilfreichen und konstruktiven Korrekturvorschläge danken.

Allen **Mitarbeitern, Diplomanden und Doktoranden** des Institutes für Klinische Biochemie und Pathobiochemie und Zentrallabor sowie der Universitäts-Frauenklinik danke ich für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima.

Überhaupt möchte ich **allen** danken, die zur Lösung auftretender Problemstellungen und zu meiner Arbeit beigetragen haben, bisher aber noch keine Erwähnung fanden.

Schließlich möchte ich meinen **Freunden** danken, die mich ertrugen, wenn ich von der Dissertationsarbeit frustriert oder demotiviert war, mich ablenkten und aufbauten oder einfach für mich da waren.

Ganz besonderer Dank gilt **meiner Familie** für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht, ihre unermüdliche Geduld, ihr Verständnis sowie ihre anhaltende Liebe, die sie mir gegenüber während der Arbeit an der Dissertation, der Publikation und dem gesamten

---

Studium der Medizin aufbrachten. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen, die Kraft für diese Aufgabe aufzubringen.

---

# 14 Ehrenwörtliche Erklärung

---

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte, fremde Hilfe angefertigt zu haben. Ich habe keine anderen, als die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen benutzt und sämtliche Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen wurden, als solche kenntlich gemacht. Ebenfalls sind alle, von anderen Personen bereitgestellten Materialien oder erbrachten Leistungen als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt, mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben.

Ich habe noch nie versucht, einen akademischen Grad zu erwerben, es wurde mir auch kein solcher entzogen.

Gegen mich ist kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

Kirchheim, 26. November 2010

---

Frietsch Jochen

---