

» Detektion differenziell exprimierter Gene beim primären Mammakarzinom mittels cDNA-Array-Hybridisierung

Detection of Differentially Expressed Genes in Breast Cancer with cDNA-Array Hybridization

A. Ahr, U. Holtrich, T. Karn, C. Solbach, R. Gätje, A. Scharl, K. Strebhardt, M. Kaufmann

Bereich „Molekulare Gynäkologie und Geburtshilfe“ der Universitäts-Frauenklinik Frankfurt

Zusammenfassung

Fragestellung: Die molekularen Veränderungen, die zur Entstehung und Metastasierung beim primären Mammakarzinom führen, sind bisher unzureichend geklärt. Die Analyse pathologisch veränderter Genaktivität kann zur Aufklärung von Krankheitsmechanismen, Verbesserung der Diagnostik und zur Identifizierung neuer therapeutischer Angriffspunkte beitragen. Mittels einer neuen Untersuchungstechnik, der cDNA-Array-Hybridisierung, lassen sich umfassende Expressionsprofile von differenziell exprimierten Genen beim Mammakarzinom darstellen.

Methode: Untersucht wurde die mRNA-Expression von 588 humanen Genen an Primärtumoren von insgesamt 16 Mammakarzinompatientinnen (T1–4, N0–1 M0–1).

Ergebnis: Der Vergleich verschiedener Tumorproben lässt erkennen, dass die Genexpressionsmuster von Mammakarzinomen sehr ähnlich sind und sich um ca. 1,5% der analysierten Gene unterscheiden. Neben bereits beschriebenen Markern (z.B. ErbB2/neu) finden sich auch überexprimierte Genprodukte, über die bisher nur wenige Informationen beim Mammakarzinom vorliegen (z.B. Transkriptionsfaktor und Metalloproteinase).

Schlussfolgerung: Durch die Analyse einer größeren Anzahl von Proben erhoffen wir uns Genexpressionsprofile zu identifizieren, welche mit dem Ansprechen auf eine mögliche medikamentöse Therapie korrelieren.

Abstract

Objective: Differentially expressed genes are potential prognostic factors in human breast cancer. cDNA-array hybridization permits rapid simultaneous analysis of differentially expressed genes.

Methods: We studied the mRNA expression of 588 genes with cDNA-array analysis in 16 primary breast carcinomas (T1–4, N0–1, M0–1).

Results: Approximately 1.5% of the analyzed genes showed significant differences in expression. Differentially expressed genes included c-erbB2 (HER2/neu), metalloproteinases, and

newly identified transcripts. The expression of most genes did not seem to be altered significantly.

Conclusion: The cDNA-array hybridization technique is a powerful tool to identify differentially expressed genes in breast cancers. These gene profiles will be studied for their prognostic significance.

Einleitung

Gegenwärtig erkrankt in westlichen Ländern nahezu jede 10. Frau (bis zum 85. Lebensjahr) an einem Mammakarzinom. Die Inzidenz des Mammakarzinoms lag im Jahre 1995 in den USA bei 186 000 (Quelle USA: NCI-SEER-Programm, <http://www-seer.ims.nci.nih.gov/Publications/CSR7394/index.html>), in Deutschland bei ca. 45 000 Fällen (Quelle: Robert-Koch-Institut, <http://www.rki.de>), die Mortalität bei 46 000 bzw. ca. 18 000. In der Altersgruppe zwischen 35 und 50 Jahren ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache.

Etwa 3 von 4 Mammakarzinompatientinnen erleiden ein Rezidiv [4]. Prospektive randomisierte Studien zeigten, dass durch eine adjuvante Chemo- oder Hormontherapie das krankheitsfreie Intervall und das Gesamtüberleben verbessert werden kann [4,5]. Entsprechend wird eine adjuvante systemische Therapie ca. 90% aller Mammakarzinompatientinnen empfohlen, wobei der Risikokalkulation klinische (Alter der Patientin, Menopausenstatus), morphologische (Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Grading) und funktionelle Parameter (Hormonrezeptorstatus) zu Grunde gelegt werden [1]. Nur wenige differenziell exprimierte Gene wurden bisher als prädiktive/prognostische Marker beim Mammakarzinom untersucht und wenige Faktoren besitzen derzeit eine klinische Relevanz, z.B. HER2/neu [12]. Als prädiktiver Marker hat nur der Hormonrezeptorstatus eine Bedeutung im klinischen Alltag [1]. Alle bislang bekannten Faktoren beim Mammakarzinom genügen nicht, um den individuellen Krankheitsverlauf (= prognostische Bedeutung) und das Ansprechen auf bestimmte medikamentöse Therapien (= prädiktive Bedeutung) zuverlässig vorherzusagen. Es besteht daher die Notwendigkeit, neue molekulare Marker zu identifizieren.

Bisher verwandte Ansätze untersuchten immer nur einzelne pathologisch veränderte Gene beim Mammakarzinom. Neueste molekularbiologische Methoden (cDNA-Array-Technolo-

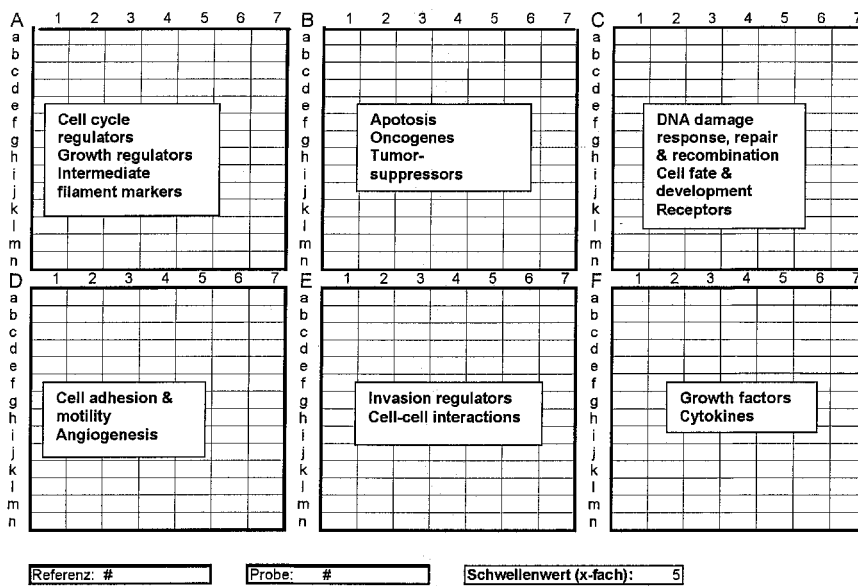


Abb. 1 Darstellung der Anordnung der funktionellen Gengruppen auf dem Array-Filter. Jeder Array-Filter enthält immobilisierte cDNA von 588 humanen Genen aus funktionell verwandten Gengruppen: u. a. Zellzyklus, Apoptose, Reparatur, Adhäsion, Invasion, Wachstumsfaktoren. Diese Gene sind in jeweils rechteckiger Gruppierung auf dem Filter angeordnet und anhand ihrer Koordinaten identifizierbar.

gien) erlauben nunmehr parallele Analysen der Expression einer Vielzahl von Genen. Die vorliegende Studie vergleicht die Expressionsprofile von Tumorproben mittels cDNA-Array-Techniken, um neue molekulare prognostische/prädiktive Marker beim Mammakarzinom zu identifizieren und deren Bezug zu klinischen Parametern zu analysieren.

Material und Methoden

Alle Patientinnen wurden zwischen Juni 1997 und Oktober 1998 an der Universitäts-Frauenklinik behandelt (Tab. 1).

Tab. 1 Charakterisierung der Patientinnen

Tumorprobe #	Erst-diagnose	TNM-Stadium, Grading, Hormonrezeptorstatus, Histologie
1	06/97	T4 N1(3/11) M0, G2, ER/PR pos., duktal
2	06/97	T4 N1(2/20) M0, G3, ER/PR pos., duktal
3	06/97	T2 N0(0/24) M0, G1, ER/PR pos., duktal
4	08/97	T2 N1(14/17) M1, G2, ER/PR pos., duktal
5	09/97	T2 N0(0/22) M0, G1, ER/PR pos., tubulär
6	09/97	T1 c N0(0/11) M0, G1, ER/PR pos., duktal
7	09/97	T2 N1(7/25) M0, G3, ER/RP neg., duktal
8	09/97	T3 N1(30/30) M0, G2, ER/PR neg., duktal
9	09/97	T2 N1(26/29) M0, G3, ER/PR pos., duktal
10	09/97	Lymphknotenmetastase von #9
11	10/97	T2 N1(6/23) M0, G3, ER/PR pos., duktal
12	10/97	Lymphknotenmetastase von #11
13	10/97	T2 N1(7/25) M0, G3, ER/PR neg., duktal
14	11/97	T2 N0 M0, G2, ER/PR neg., duktal
15	05/98	T1 c N1(2/13) M0, G2, ER/PR pos., duktal
16	10/98	T4a N1 (x/x) M1, ER/PR pos., lobulär
17	10/98	T2 N0(0/10) M0, G3, ER/PR pos., duktal
18	10/98	T2 N1(8/16) M0, G3, ER/PR pos., duktal

Von jeder Patientin wurde Nativgewebe vom Primärtumor und ggf. axillären Lymphknotenmetastasen bei -70°C gelagert. Jede Probe wurde durch Schnellschnitt hinsichtlich des Tumorgehalts kontrolliert. Weiterhin gibt es von allen Patientinnen formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Material (Primärtumor, normales Drüsengewebe, Lymphknotenmetastase). Das histologisch verifizierte normale Mammaparenchym (= Referenzgewebe) stammt von Patientinnen, welche eine Reduktionsplastik erhielten.

Für vergleichende Expressionsstudien von Tumorgewebe und normalem Mammaepithel werden möglichst homogene Zellpopulationen benötigt. Der Reinheitsgrad sollte mindestens bei 90% liegen [18]. In Anlehnung an Publikationen anderer Arbeitsgruppen [9] wurde von uns eine Zellaufreinigungsmethode etabliert, die es erlaubt, Zellpopulationen mit mehr als 90% Reinheit herzustellen: Zunächst wird das Gewebe durch mechanische Desintegration (MediMachine, Dako, Hamburg) zu einer Einzelzellsuspension zerkleinert. Nach Passage durch einen Filter (Porengröße 40–50µm) erfolgt die Aufreinigung normaler Epithelzellen oder von Tumorzellen mittels des monoklonalen Antikörpers HEA 125 (mAB gegen Epitheliales Glycoprotein, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) über immunomagnetisches Purgung (MACS – Magnetic Cell Sorting System, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Der Reinheitsgrad dieser aufgereinigten Zellpopulation wird anschließend über das FACScan-Flow-Zytometer (Becton-Dickenson, Jan Jose, USA) quantifiziert. Die Qualitätskontrolle der aufgereinigten Zellsuspension erfolgt nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung am Lichtmikroskop. Die Gesamt-RNA von primären Mammakarzinomen und aufgereinigten normalen Drüsenparenchymzellen der Kontrollpatientinnen wurde durch die Guanidinium-Isothiocyanat-Methode [2] in Kombination mit Affinitäts-Reinigungsschritten isoliert. Anschließend erfolgte eine cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription unter Verwendung des Nukleotids (α-³²P)-dATP zur radioaktiven Markierung. Verfahren wurde hierbei entsprechend dem Protokoll des Herstellers der Array-Membranen (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Die so markierten Sonden wurden in einer Konzentration von 1 × 10⁶ dpm/ml mit den in einer Hybridisierungslösung (Clontech) be-

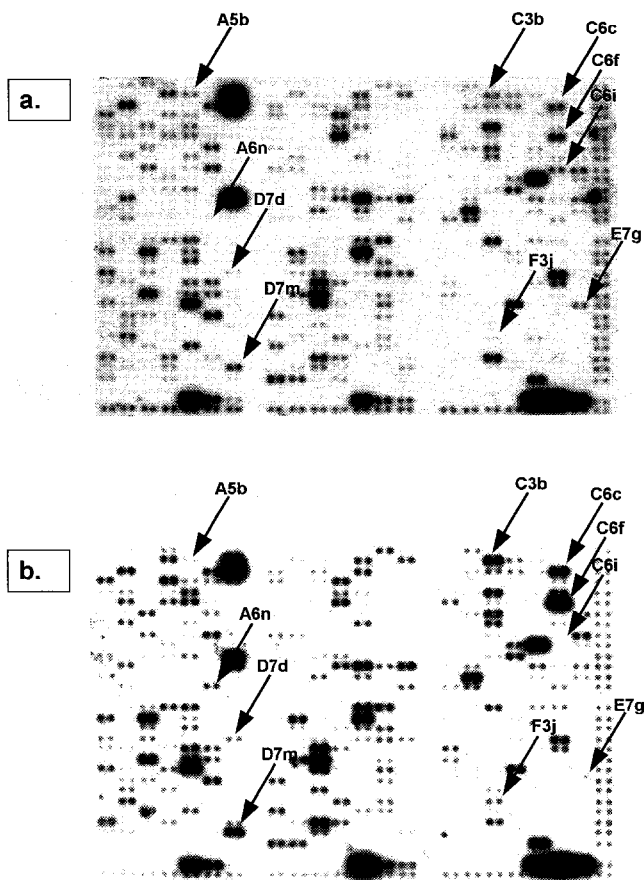


Abb. 2 Autoradiographie der Array-Hybridisierung zweier Mammakarzinomproben. Je ein Array zeigt das Hybridisierungsergebnis einer Mammakarzinomprobe (**a** Tumorprobe #9, **b** Tumorprobe #11). Ein exprimiertes Gen ist als punktförmiges Signal zu erkennen. Zur Kontrolle ist jedes Gen zweimal nebeneinander als Doublette aufgetragen. Im Vergleich dieser beiden Autoradiogramme gegeneinander finden sich in #9 Genexpressionsreduktionen gegenüber #11 an Position A5b = MEK1 (MAP-Kinase-Kinase) C6i = FGFR 1 (fibroblast growth factor receptor 1), E7g = EphrinB2 (eph-related receptor tyrosine kinase ligand 5). Demgegenüber lassen sich beispielhaft in dem Tumormaterial von #11 im Vergleich zu #9 Gegenüberexpressionen an Position A6n = cytokeratin 14, C3b = SOD1 (superoxiddismutase), C6c = IGFBP2 (insulin like growth factor binding protein 2), C6f = IGFBP5 (insulin like growth factor binding protein 5), D7d = VEGF-B (vascular endothelial growth factor B), D7m = VEGFR-1 (vascular endothelial growth factor receptor 1), F3j = EGR-1 (early growth response protein 1) nachweisen (funktionelle Anordnung des Arrays siehe Abb. 1). Die entsprechenden differenziell exprimierten Gene sind durch Pfeile markiert.

findlichen Array-Membranen inkubiert. Nach der Hybridisierung (Ausbildung von DNA-Doppelsträngen bestehend aus radioaktiver cDNA und immobilisierter Zielsequenz) über Nacht, wurden die Nylonmembranen in $0,1 \times \text{SSC}/0,5\% \text{ SDS}$ bei 68°C gewaschen und anschließend auf Röntgenfilmen exponiert. Die Autoradiographien wurden daraufhin densitometrisch gemessen und die Rohdaten mittels der Imaging-Software ImageQuant (Molecular Dynamics) ausgewertet, in Spreadsheet-Programme transferiert und über Kalibrierungsmarker normalisiert.

Für alle Experimente wurden Atlas™ Human Cancer cDNA Expression Arrays von Clontech (Palo Alto, CA, USA) eingesetzt. Die auf diesem Array befindlichen Gene (cDNA-Klone) sind zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, wie in Abb. 1 dargestellt. Jeder Atlas™ cDNA Expression Array beinhaltet 588 immobilisierte Gene auf einer positiv geladenen Nylonmembran. Zur Kontrolle ist jedes Gen direkt nebeneinander doppelt aufgetragen. Auf jedem Array sind weiterhin neun konstitutiv exprimierte Gene als Positivkontrollen (Tubulin, β -Aktin, G3 PDH, etc.) sowie Plasmid- und Bakteriophagen-DNA als Negativkontrollen immobilisiert.

Ergebnisse

Zur Analyse von Genexpressionsmustern wurde radioaktive cDNA aus 16 humanen Mammakarzinomen und Referenzgewebe gegen cDNA-Array-Systeme mit 588 Genen hybridisiert. Durch das in Material und Methoden beschriebene Zellaufreinigungsverfahren standen uns 91–96%ige homogene Zellpopulationen (Tumorprobe bzw. normales Drüsenparenchym) zur Verfügung. Abb. 2 zeigt die Hybridisierungsmuster zweier Mammakarzinomproben (**a** und **b**). Wie in Material und Methoden beschrieben, ist zur Kontrolle jedes Gen doppelt auf jedem Array aufgetragen. Exprimierte Gene lassen sich daher anhand zweier benachbarter Punkte (Dots) auf dem Röntgenfilm identifizieren. Die Stärke der Genexpression ist annähernd proportional zum Schwärzungsgrad. Der Vergleich der Expressionsmuster von Mammakarzinomen bzw. der Vergleich der Expressionsmuster von Mammakarzinomen zu normalem Mammaparenchym (= Referenzgewebe) zeigte, dass nur ein relativ kleiner Teil der analysierten Gene differenziell exprimiert wird. Bei einem willkürlichen cut-off mit einem Expressionsunterschied ≥ 5 fach liegt der Anteil differenziell exprimierter Gene im Vergleich Tumor/Tumor bei 1,5% bzw. im Vergleich Tumor/Referenzgewebe bei 6,4%. Wird eine differentielle Genexpression erst bei einem Expressionsunterschied von ≥ 20 als signifikant erachtet, liegt der Anteil von differenziell exprimierten Genen bei 0,3% (Tumor/Tumor) und 0,9% (Tumor/Referenzgewebe). Bei allen Prozentangaben handelt es sich um Mittelwerte. Um versuchsbedingte Schwankungen zu vernachlässigen, wurde in den vorliegenden Auswertungen der cut-off willkürlich bei einem ≥ 5 fachen Genexpressionsunterschied festgelegt. Bei diesem cut-off konnte im Vergleich von affinitätsgereinigten normalen Mammaepithelzellen mit verschiedenen Mammakarzinomen etwa 30 differenziell exprimierte Gene nachgewiesen werden. In Tab. 2 werden beispielhaft 19 dieser Gene dargestellt. Es zeigt sich, dass einzelne Faktoren von einer Vielzahl der Mammakarzinome überexprimiert werden, z. B. LRP (low density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor – in 11 von 18 Tumorproben) oder Biglycan (10 von 18 Tumoren). Andere Faktoren werden nur von wenigen Mammakarzinomen differenziell exprimiert, z. B. das c-erbB2 lässt sich mit einem Schwellenwert ≥ 5 fach nur bei 3 der 18 Tumorproben nachweisen. Abb. 3 gibt eine Ausschnittsvergrößerung der Array-Hybridisierungsexperimente in Bezug auf c-erbB2 (Abb. 3a) und STAT1 (Signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta; Abb. 3b) wieder: Dargestellt sind drei verschiedene Mammakarzinome mit unterschiedlicher c-erbB2- und STAT1-Expression. Zur Abschätzung der relativen Genexpressionshöhe von c-erbB2 wurde das Hybridisierungssignal des Erythropoetin-Rezeptors (EPO-R) markiert (Abb. 3a). Die relative Expressionshöhe des STAT1- und des STAT5 B – Transkriptionsfaktors lässt sich über das Hybridisie-

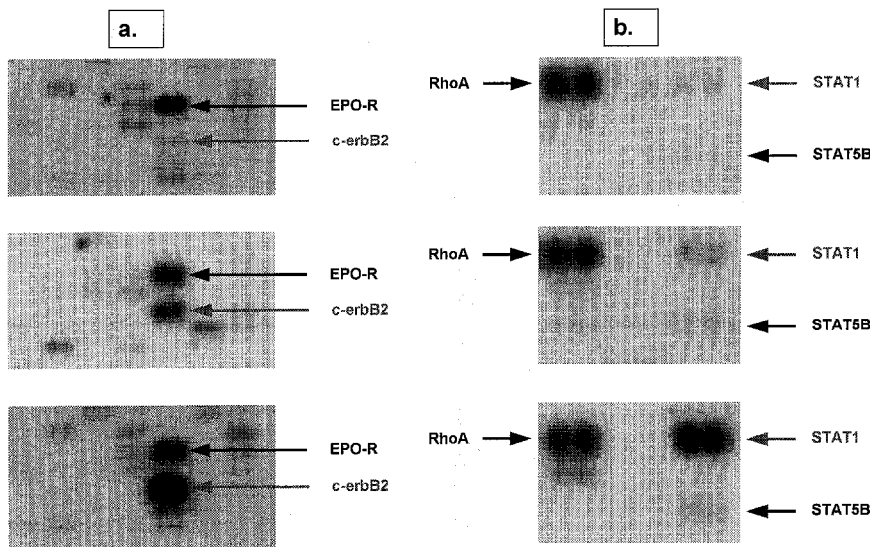


Abb. 3 Detektion der c-erbB2- und STAT1-Überexpression in primären Mammakarzinomen mittels cDNA-Array-Hybridisierungen. Abb. 3a zeigt die Überexpression des Onkogens c-erbB2 in zwei von drei dargestellten Tumoren. In Abb. 3b ist die Überexpression des Transkriptionsfaktors STAT1 in einem Tumor gezeigt. Zur Abschätzung der relativen Expressionshöhen sind die Hybridisierungssignale des EPO-Rezeptors (Abb. 3a) und des RhoA-Gens (Abb. 3b) markiert.

runnungssignal des RhoA-Gen ermitteln (Abb. 3b). Es finden sich aber nicht nur verstärkte Genexpressionen, sondern auch reduzierte Genexpressionssignale. Wie in Tab. 2 ersichtlich, wird z.B. MMP-17 (Matrix Metalloproteinase), in 11 Mammakarzinomproben im Vergleich zum Normalgewebe in der semi-quantitativen Auswertung bis zu 21fach geringer exprimiert.

Der Vergleich Primärtumor gegen axilläre Lymphknotenmetastase (Tab. 1 u. 2) der Tumorproben #9 vs. #10 und #11 vs. #12 zeigt ein sehr ähnliches Expressionsprofil der Proben #9 und #10, wohingegen sich die axilläre Metastase #12 von ihrem Primärtumor #11 deutlich unterscheidet.

Diskussion

Die vorliegende Studie stellt eine neue molekularbiologische Untersuchungsmethode vor, die es ermöglicht, komplexe Profile von Genexpressionen darzustellen und semiquantitativ auszuwerten. Mittels dieser neuen Technik, der cDNA-Array-Hybridisierung, sollen in Zukunft individuelle Risikoprofile bei Tumorpatienten erstellt – hier am Beispiel des Mammakarzinoms aufgezeigt –, bzw. Chemotherapieresistenzen identifiziert werden. Eingesetzt wurden kommerziell erhältliche cDNA-Arrays mit 588 humanen Genen. Eine Limitation dieser Technologie, dass nur bereits identifizierte Gene analysiert werden können, wird bald in den Hintergrund treten, da für die Mehrzahl der humanen Gene schon ausreichende Teilsequenzen bekannt sind. Eine weitere Einschränkung der Technik, so wie sie hier angewendet wurde, ist, dass z.B. Punktmutationen oder Regulationen auf der Ebene der zellulären Proteine nicht detektiert werden. Andererseits sollten auf Grund der komplexen Vernetzung der zellulären Signalwege solche Ereignisse zu Veränderungen der Genexpression führen, die sich durch Arraysysteme nachweisen lassen.

In der Optimierungsphase sind bereits Makro-Array-Systeme mit bis zu 45 000 Expressionssignalen. Wie in Tab. 2 ersichtlich, ist eine Auswertung der anfallenden Daten bereits bei einem Array mit „nur“ 588 Genen kompliziert, weitaus komplexer stellt sich dies bei den Makro-Array-Systemen dar. Mittels computeranalytischer Auswertungen der Array-Rohdaten las-

sen sich Proben auf Grund homologer Genexpressionsmuster ordnen und graphisch darstellen [6]. Die ersten Hybridisierungsergebnisse dieser High-Density-Arrays mit 45 000 humanen EST-Klonen (Expressed Sequence Tag) zeigen in unserem Labor beim Vergleich von Mammakarzinomproben, dass rund 100 Gene differenziell exprimiert werden (Manuskript in Vorbereitung). Dies entspricht einem Anteil von ca. 0,2% aller Gene und korreliert mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie an einem größeren Mammakarzinomkollektiv: Bei einem Expressionsunterschied ≥ 20 fach zeigen sich bei Anwendung des Atlas™ Human Cancer cDNA Expression Arrays im Vergleich von Tumor gegen Tumor 0,3% der Gene differenziell exprimiert, bzw. im Vergleich Tumor gegen Referenzgewebe 0,9%. Somit gleichen sich die Genexpressionsmuster verschiedener Mammakarzinome zu nahezu 99% und die einzelnen Tumoren unterscheiden sich zum Referenzgewebe bzw. auch untereinander nur durch einzelne Faktoren. In Tab. 2 sind beispielhaft 19 dieser Faktoren bei einem Vergleich von 16 primären Mammakarzinomen und 2 jeweiligen axillären Lymphknotenmetastasen dargestellt: neben bereits beim Mammakarzinom ausführlich beschriebenen Onkogenen (c-erbB2, EGFR) und Invasionsmarkern (UPA) finden sich auch differenziell exprimierte Genprodukte, über welche bisher nur wenige publizierte Daten vorliegen (z.B. STAT1, MMP-9, LRP). Ein bekanntes Onkogen stellt c-erbB2 dar, welches bei ca. 25% aller Mammakarzinome überexprimiert wird und bei c-erbB2-Positivität einen schlechteren klinischen Verlauf aufweist [7,17]. Eine c-erbB2-Überexpression wurde in unserem Kollektiv bei 3 von 16 primären Mammakarzinomen (19%) nachgewiesen. Der Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (epidermal growth factor receptor), ein ebenfalls an größeren Mammakarzinomkollektiven untersuchter Marker, wurde in 2 von 16 (12,5%) Mammakarzinomproben überexprimiert (Tab.2) und korreliert mit den in der Literatur angegebenen EGFR-Positivitätsraten [8]. Wenn bisher auch nur ein kleines Kollektiv von Tumorproben (n = 16) mittels cDNA-Array-Hybridisierung untersucht wurde, so decken sich die hier vorgestellten Expressionsergebnisse, von bereits an größeren Kollektiven untersuchten Genen mit den Angaben der Literatur und die cDNA-Array-Hybridisierung erscheint als zuverlässige Untersuchungsmethode.

Tab. 2 Quantitative Auswertung der Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Array-Hybridisierung verschiedener Mammakarzinome (Tumorproben #1 – #18) im Vergleich zu normalem Mamdrüsenparenchym

Beschreibung	Tumorprobe																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
STAT 1				6		9	50		16	12	21							
c-erbB2								5	5									10
EGFR						5		11										
Biglycan			8	13	26	34	20		9	8	13		5			16		
Kollagen Typ XVIII alpha						5	8											
Thrombospondin 2 Prekursor					10	30					7				6			
MMP-9						40	10											
UPA				5			9											
VEGF/VPF							6						6					
CK14		21	-7		5		6	-9	-7	-7		-7	-6	-7		-5		-7
CK18	-27	-8	-6															-7
CK19	-12	-11	-6										-63	-5				-6
CK7		-9	-16			-5		-8	5	-10		-5		-55	-23			-17
CK8	-18		-16					-8					-20	-7				-9
MMP-17	-14	-6	-14	-10	-9	5	-21	-14					-12	-5	-9			-8
Plakoglobin	-25			-10		-9						-9	-7	-23	-11	-16		
HDGF											5							
Vimentin						5												5
LRP		35	8	12	20	34	15		9	7	13					6	14	

STAT1	signal transducer and activator of transcription 1-alpha/beta
c-erbB2	ERBB2 receptor protein-tyrosine kinase
EGFR	epidermal growth factor receptor
MMP	matrix metalloproteine
UPA	urokinase-type plasminogen activator precursor
VEGF/VPF	heparin-binding vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor
CK	cytokeratin
HDGF	hepatoma-derived growth factor
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor

Im Folgenden werden beispielhaft neue potenzielle Marker in Bezug zum Mammakarzinom diskutiert. STAT-Proteine (signal transducers and activators of transcription) sind latente zytoplasmatische Transkriptionsfaktoren und werden über verschiedene Zelloberflächenmoleküle aktiviert und unterstützen z. B. den antiproliferativen Effekt von Interferon [15,16]. Johnson et al. [10] konnten zeigen, dass östrogenabhängige MCF-7 Mammakarzinomzellen ein langsames Wachstum aufwiesen als die Kontrollzellkultur, wenn FGF (fibroblast growth factor) dem Medium zugesetzt wurde. Dieser inhibitorische Effekt von FGF resultiert aus der Phosphorylierung von STAT1. In unserem Mammakarzinomkollektiv wiesen 5 Tumorproben eine bis zu 50fache STAT1-Überexpression im Vergleich zu normalem Drüsengewebe auf.

Weitere potenzielle Marker sind die Matrix Metalloproteinasen (MMP), welche in humanen Karzinomen exprimiert werden und eine Rolle in der Tumorinvasion und Metastasierung spielen sollen [3]. Die MMP-Aktivität kann durch TGF-beta1 (transforming growth factor beta1) reduziert werden. Duivenvoorden et al. [3] zeigten bei verschiedenen Tumorzelllinien einen Verlust der TGF-beta1-Aktivität auf MMP und schluss-

folgerten, dass durch die Überexpression von MMP eine Verschiebung der Osteoklasten/Osteoblasten zu Gunsten der Osteoklasten stattfindet und dies zur Knochendestruktion führt. In einer anderen Studie an 81 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom [14] korrelierten erhöhte MMP-9-mRNA-Level mit dem Nachweis von Gefäßinvasionen, Tumornekrose, negativem PR-Status und invers mit der Gesamtüberlebensrate. In unserer Untersuchung weisen zwei Karzinomproben eine erhöhte MMP-9-Expression auf und 11 Karzinome zeigen im Vergleich zum benignen Drüsenparenchym einen MMP-17-Genexpressionsverlust. Ob und welche klinische Bedeutung dies hat, wird an einem größeren Kollektiv untersucht.

Ein häufig differenziell exprimiertes Gen ist auch LRP (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 precursor), welches in der vorliegenden Studie bei 11 von 18 Mammakarzinomproben überexprimiert wurde. Biologisch handelt es sich um ein multifunktionelles Membranrezeptorprotein für die Endozytose von verschiedenen Liganden, welche in die Regulation der Proteasen- und Zytokinaktivität involviert sind [13]. Die bisherigen Untersuchungen wurden ausschließlich an ver-

schiedenen Tumorzelllinien durchgeführt. Entgegen einer Studie von Kancha et al. [11], welche LRP-Expressionsverluste der invasiven Ha-ras-transfektierten Mammakarzinomzelllinie MCF-10 A im Vergleich zu der nicht-invasiven Tumorzelllinie nachweisen konnten, zeigen sich bei unseren humanen Mammakarzinomzellen ausschließlich LRP-Überexpressionen.

Zusammengefasst lassen sich mit der neuen Technologie der cDNA-Array-Hybridisierung Genexpressionsdaten von bereits beschriebenen, aber auch von weitestgehend unbekanntem Markern, beim Mammakarzinom nachweisen. Die untersuchten Expressionsergebnisse von bekannten Markern (z.B. c-erbB2) stimmen mit den Literaturangaben überein, so dass die Ergebnisse der unbekanntem Genprodukte als zuverlässig angesehen werden können. Somit haben diese Marker das Potenzial als neue prognostische und/oder prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom, nach Untersuchung an größeren Kollektiven, etabliert zu werden.

Der Vorteil und das Neue der vorgestellten cDNA-Array-Hybridisierungen liegt aber vorrangig in der multiplexen Genexpressionsanalyse (hier 588 Gene). Somit steht nicht mehr, wie bisher, der Einzelmarker in Korrelation zum klinischen Verlauf im Vordergrund der wissenschaftlichen Untersuchungen, sondern die Erstellung eines Genexpressionsprofils aus einer Vielzahl von Genprodukten (z.Z. max. 45 000 Expressionssignalen). Es ist durch die Massen-Genexpressionsanalyse, z.B. mittels der cDNA-Array-Hybridisierung, erstmals möglich, die zellulären interaktiven Regulationsmechanismen (Genüberexpression oder -verlust) auf RNA-Ebene parallel darzustellen. Der Vergleich verschiedener Mammakarzinomproben lässt erkennen, dass ihre Genexpressionsmuster sehr ähnlich sind und sich nur bezüglich einiger weniger Faktoren unterscheiden. Die Analyse einer größeren Zahl von Proben sollte es ermöglichen, Korrelationen von klinischen Parametern und bestimmten Expressionsmustern zu erstellen.

Literatur

- ¹ Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer. 6th International Conference St. Gallen, February 25 – 28 (1998) unpublished data
- ² Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18 (24): 5294 – 5299
- ³ Duivenvoorden WC, Hirte HW, Singh G. Transforming growth factor beta 1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17 (1): 27 – 34
- ⁴ Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 352: 930 – 942
- ⁵ Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1998; 351: 1451 – 1467
- ⁶ Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 8; 95 (25): 14 863 – 14 868
- ⁷ Göhring U-J, Scharl A, Ahr A. Der Stellenwert der immunhistochemischen Bestimmung von Rezeptoren, Gewebsproteasen, Tumorsuppressorproteinen und Proliferationsmarkern als Prognoseindikatoren beim primären Mammakarzinom. *Geburtsh u Frauenheilkd* 1996; 56: 177 – 183
- ⁸ Göhring UJ, Aslan-Schadwinkel Y, Scharl A. Expression of the p 185 neu oncoprotein indicates an unfavorable prognosis in small,

node negative breast cancer without systemic adjuvant treatment. *Geburtsh u Frauenheilkd* 1993; 53 (9): 625 – 629

- ⁹ Hildebrandt M, Mapara MY, Korner IJ, Bargou RC, Moldenhauer G, Dorken B. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency. *Exp Hematol* 1997; 25 (1): 57 – 65
- ¹⁰ Johnson MR, Valentine C, Basilico C, Mansukhani A. FGF signaling activates STAT1 and p21 and inhibits the estrogen response and proliferation of MCF-7 cells. *Oncogene* 1998; 16 (20): 2647 – 2656
- ¹¹ Kancha RK, Stearns ME, Hussain MM. Decreased expression of the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in invasive cell clones derived from human prostate and breast tumor cells. *Oncol Res* 1994; 6 (8): 365 – 372
- ¹² Kaufmann M. Recent results in cancer research. Berlin: Springer-Verlag, 1996; 140: 77 – 87
- ¹³ Li Y, Wood N, Donnelly P, Yellowlees D. Cell density and oestrogen both stimulate alpha 2-macroglobulin receptor expression in breast cancer cell T-47D. *Anticancer Res* 1998; 18 (2A): 1197 – 1202
- ¹⁴ Pacheco MM, Mourao M, Mantovani EB, Nishimoto IN, Brentani MM. Expression of gelatinases A and B, stromelysin-3 and matrilysin genes in breast carcinomas: clinico-pathological correlations. *Clin Exp Metastasis* 1998; 16 (7): 577 – 585
- ¹⁵ Richter JK, Lange CA, Manning NG, Ovwen G, Powell R, Horwitz KB. Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity. *J Biol Chem* 1998; 273 (47): 31 317 – 31 326
- ¹⁶ Schaber JD, Fang H, Xu J, Grimley PM, Rui H. Prolactin activates Stat1 but does not antagonize Stat1 activation and growth inhibition by type I interferons in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998; 58 (9): 1914 – 1919
- ¹⁷ Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER2/neu oncogene. *Science* 1987; 235: 177 – 182
- ¹⁸ Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276 (5316): 1268 – 1272

Dr. med. André Ahr

Universitäts-Frauenklinik

Theodor-Stern-Kai 7

60590 Frankfurt

E-mail: Ahr@em.uni-frankfurt.de