

Aus der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe
(Direktor Prof. Dr. Nicolai Maass)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Copy Number Variation (CNV) des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) und das Metastasierungsverhalten von Brustkrebszellen im Mausmodell

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Julia Jasmin Münst
aus Berkheim

Berlin, den 23.01.2021

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Christian Schem

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Alexander Arlt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel den: 07.10.2020

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung.....	1
I.1	Das Mammakarzinom.....	1
I.1.1	<i>Epidemiologie, klinische und molekulare Differenzierung.....</i>	<i>1</i>
I.1.2	<i>Metastasierung des Mammakarzinoms.....</i>	<i>4</i>
I.1.3	<i>RTK (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen).....</i>	<i>5</i>
I.1.4	<i>Die EGFR- Familie (Epidermal Growth Factor Receptor).....</i>	<i>5</i>
I.1.5	<i>Dysregulation des EGFR in malignen Tumoren.....</i>	<i>7</i>
I.1.6	<i>Bestimmung der EGFR-Amplifikation.....</i>	<i>8</i>
I.1.7	<i>Prinzipien der „targeted“ Therapie des EGF-Rezeptors.....</i>	<i>10</i>
I.2	Zielsetzung.....	14
II	Material und Methoden.....	15
II.1	Material.....	15
II.1.1	<i>Sublinien der Mammakarzinomzelllinie MDA 468 für die in vitro Imagingexperimente</i>	<i>15</i>
II.1.2	<i>SCID beige Mäuse.....</i>	<i>17</i>
II.2	Methoden.....	18
II.2.1	<i>Narkotisieren der Mäuse und Injektion der Zellen.....</i>	<i>18</i>
II.2.2	<i>Bildgebung mittels NightOWL.....</i>	<i>19</i>
II.2.3	<i>Statistische Methoden.....</i>	<i>21</i>
III	Ergebnisse.....	23
III.1	Arbeitsplan und Gesamtauswertung der Imaging-Ergebnisse.....	23
III.1.1	<i>Imagegröße.....</i>	<i>25</i>
III.1.2	<i>Intensität.....</i>	<i>27</i>
III.1.3	<i>Korrelation Imagegröße und Intensität.....</i>	<i>28</i>
III.2	Zelltyp-spezifische Auswertung der Imaging-Ergebnisse.....	29
III.2.1	<i>Zelllinie MDA 468 „Bone“.....</i>	<i>29</i>
III.2.2	<i>Zelllinie MDA 468 „Wild type“ (WT).....</i>	<i>29</i>
III.2.3	<i>Zelllinie MDA 468 „Suppressed“ (Supp.).....</i>	<i>30</i>
III.2.4	<i>Zelllinie „BT-20“.....</i>	<i>30</i>
III.3	Verteilung der Tumoren nach anatomischer Lage.....	31
III.4	Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp.....	33
III.4.1	<i>Zusammenfassung Zelllinien und Messunterschiede.....</i>	<i>36</i>
III.5	Darstellung der Tumoren in Bezug zur EGFR-CNV.....	37
IV	Diskussion.....	42

IV.1	Methodenkritik	42
IV.1.1	<i>Tiermodell</i>	42
IV.1.2	<i>Intracardiale Zellinjektion und Images im Bereich „Herz“ und „Lunge“</i>	42
IV.1.3	<i>Images im Bereich „Lymphknoten“</i>	44
IV.2	Diskussion der Ergebnisse	47
IV.3	Fazit und Ausblick.....	52
V	Zusammenfassung	53
VI	Literaturverzeichnis	55
VII	Anhang	61
VII.1	Abkürzungsverzeichnis	61
VII.2	Tabellenverzeichnis	62
VII.3	Abbildungsverzeichnis	62
VII.4	Schreiben über die Zulassung durch die Tierschutzkommission	64
VII.5	Schreiben über die Durchführung des Tierschutzkurses.....	65
VII.6	Danksagung	67
VII.7	Veröffentlichung.....	67

I Einleitung

I.1 Das Mammakarzinom

I.1.1 Epidemiologie, klinische und molekulare Differenzierung

Das *Mammakarzinom* ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau weltweit. Im Jahr 2000 gab es circa 350.000 neue Brustkrebsfälle in Europa. Brustkrebs ist für 26,5 % der Krebserkrankungen und 17,5 % der Krebstodesfälle verantwortlich. Die höchsten Mortalitätsraten wurde in Nord- und Westeuropa beobachtet, wobei das Risiko an Brustkrebs zu erkranken in Westeuropa 60 % höher ist als in Osteuropa [1]. Ab dem 20. – 40. Lebensjahr kommt es zu einem kontinuierlichen Inzidenzanstieg, der zwischen dem 60. – 65. Lebensjahr seinen Gipfel erreicht. Durch die umfassende Aufklärung der Frauen und eine verbesserte Diagnostik nimmt die Anzahl der identifizierten Fälle zu. Gleichzeitig wird jedoch eine Abnahme des Tumorstadiums (TNM) zum Zeitpunkt der Diagnose beobachtet.

Die meisten Brustkrebs-Erkrankungen treten zufällig auf, obwohl 25 % familiär gehäuft auftreten, konnte nur bei einem geringen Anteil von ca. 5 % - 10 % ein Gendefekt für die erbliche Erkrankungen festgestellt werden [2]. Die hierfür stark prädisponierenden Mutationen liegen in den Genen BRCA1, BRCA2 und dem codierenden Gen für das Protein p53. Durch die biochemisch molekulargenetische Forschung wurden zusätzliche Subtypen des Mammakarzinoms beschrieben. Diese haben auch für die Therapie Bedeutung erlangt. Die nach wie vor wichtigste Unterform ist für die Hormonrezeptoren für Östrogene (ER) und Gestagene (PgR) positiv. Der Nachweis für das Vorhandensein der Rezeptoren erfolgt routinemäßig mittels immunhistochemischer Nachweismethoden. Zusätzlich sind die Wachstumsfaktorrezeptoren *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und sein Geschwisterrezeptor *epidermal growth factor receptor 2* (Her2/neu) von therapeutischer Bedeutung [3].

Abhängig vom Alter der Patientinnen sind ca. 70 % – 80 % der Tumoren hormonrezeptorpositiv. In ca. 15 % – 20 % der Mammakarzinome findet sich eine Her2/neu-Überexpression [4]. In jedoch 15 % – 20 % der Fälle werden weder ER noch PR exprimiert, zusätzlich fehlt eine Überexpression des Her2/neu. Diese

Konstellation wird auch als *triple-negative breast cancer* (TNBC) bezeichnet [5]. Das TNBC wird in der Literatur nicht als eindeutige Entität beschrieben, vielmehr fasst es verschiedene Subtypen von hormonrezeptornegativen Mammakarzinomen zusammen. Fast alle TNBC sind EGFR positiv [6].

Darüber hinaus hat sich die Einteilung des Mammakarzinoms, mittels globaler Genexpressionsanalysen (Expressionsarray), etabliert. Es lässt sich in fünf eigenständige Typen, entsprechend der mRNA-Expression, einteilen: *luminal A*, *luminal B*, *Her2-enriched*, *basal-like* und *normal-like (claudin-like)*. Es ergibt sich eine große Schnittmenge mit der Einteilung nach Hormonrezeptor- und Wachstumsfaktorrezeptor-Status. *Luminal A*-Tumoren sind nahezu vollständig Östrogenrezeptor-positiv und sprechen sehr gut auf eine antihormonelle Therapie an. Die TNBC mit EGFR-Expression finden sich zum Großteil in der *basal-like*-Expressionsgruppe wieder.

Tabelle 1: Beschreibung der Mammakarzinom-Subtypen [3]

Subtypen	ER-, PR-, Her2-Status	weitere Marker	Klinik
<i>luminal A/normal-like</i>	ER+/PR+, Her2	niedriger Proliferationsindex	gute Prognose
<i>luminal B</i>	ER+/PR+, Her2+	hoher Proliferationsindex	schlechtere Prognose kleine Tumoren
<i>basal-like</i>	ER-/PR-, Her2- CK5/6+, EGFR+	verringerte Expression der Gene für ER assoziiert mit BRCA1-Mutation	schlechtestes Überleben schlecht differenzierte Karzinome der Drüsengänge
<i>Her2-enriched</i>	ER-/PR-, hohes Her2		erhöhte Rezidivgefahr schlecht differenzierte Karzinome der Drüsengänge

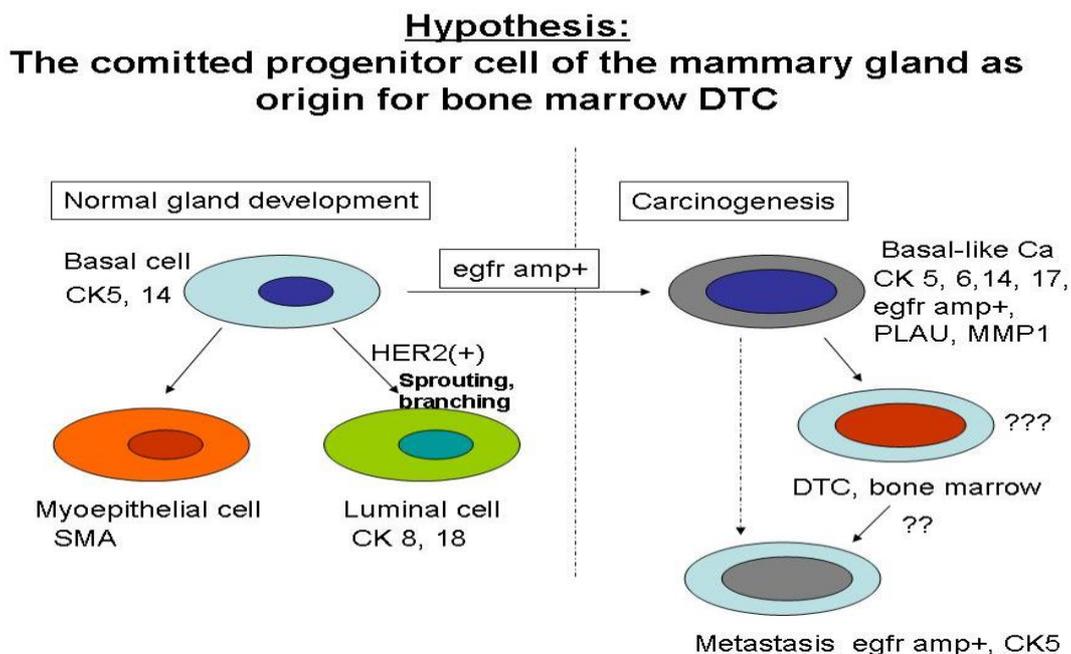
TNBC sind jedoch nicht Synonym zu setzen mit der *basal-like* Gruppe. Auch wenn in Microarray-Datenanalysen die Expression spezifischer mRNA in 91 % der TNBC als *basal-like* identifiziert werden konnten, zeigten 9 % der untersuchten TNBCs ein *normal-like* oder unklassifizierbares Muster. Zusammenfassend lässt sich deshalb sagen, dass die Mehrheit der TNBC einen *basal-like* Phänotypen aufweist, jedoch nicht alle *basal-like* Tumoren der Gruppe der TNBC angehören [7].

Mit den in Tabelle 1 genannten Markern für die *basal-like* Gruppe können diese mit einer Sensitivität von 76 % sowie einer Spezifität von 100 % identifiziert werden [8].

Insgesamt ist die Prognose für Her2-positive Tumoren sowie *basal-like* Tumoren am schlechtesten, wohingegen das Ansprechen auf eine Therapie mit Paclitaxel oder Doxorubicin besonders erfolgsversprechend ist [9][10].

Die Kombination aus der besonders hohen Aggressivität, der schlechten Prognose sowie der ungezielten und sehr toxischen Therapie der TNBC und der *basal-like* Tumoren motiviert zur weiteren Erforschung und Aufschlüsselung der Subtypen des Mammakarzinoms [11]. Eine Subtypen-spezifische, zielgerichtete, weniger toxische Therapie stellt das Ziel der Forschung dar. Hierfür muss das Wissen auf molekularer Ebene in Verbindung mit den klinischen Ergebnissen am Tiermodell gebracht werden, um die Therapie für den Menschen zu optimieren. Zielstruktur stellt hier im Besonderen die Amplifikation des EGFR dar, da diese in der Tumorentwicklung sehr früh auftritt und bei der Tumorprogression bis hin zur Metastasenbildung eine entscheidende Rolle spielt [12]. Die Arbeitshypothese (Abb. 1) geht hierbei davon aus, dass Zellen mit einer EGFR Amplifikation vorwiegend in Basalzellen, so genannten *committed progenitor cells*, entstehen, welche sich über mehrere Entwicklungsstufen zu metastasierungsfähigen Tumorzellen, so genannten *disseminated tumor cells* „DTC“, entwickeln [13].

Abbildung 1: zytogenetisches Evolutionsschema als Grundlage der Arbeitshypothese zur Entstehung von Mammakarzinomzellen mit EGFR Amplifikation (Boecker et al. 2002, Shipitsin & Polyak, 2008)



Im Mausmodell soll deshalb die frühe Dissemination der Karzinomzellen mit unterschiedlichen EGFR-Genkopien mittels bildgebender Verfahren verfolgt werden. Durch linksventrikuläre Injektion werden die Zellen direkt auf den hämatogenen Metastasierungsweg geschickt. Mittels Biolumineszenzmarkierung können das Wachstum, die Lokalisation und die Bildung von manifesten Metastasen subtypenspezifisch bestimmt werden.

I.1.2 Metastasierung des Mammakarzinoms

Der Begriff der Metastasierung bezeichnet einen Prozess, der mit der Freisetzung von Tumorzellen aus dem Primärtumor in die Blut- bzw. Lymphbahnen beginnt. Durch den Transport der Tumorzellen in entfernte Gewebe können dort neue Tumoren, die mit dem Ursprungsgewebe verwandt sind, entstehen. Diese werden als Metastasen bezeichnet. Schätzungen zufolge sind 90 % der Todesfälle bei Patienten mit einem Karzinom durch Metastasen verursacht [14].

Das Mammakarzinom zeigt eine ausgeprägte und frühe Metastasierung, bei 6 % - 10 % der Erkrankten liegt bereits bei Diagnosezeitpunkt eine Fernmetastasierung vor [15]. Die mittlere Überlebenszeit dieser Frauen liegt bei 2 -4 Jahren. Die Haupttodesursache ist auch beim Mammakarzinom nicht der Primärtumor, sondern das Vorhandensein von Metastasen [16].

Die Metastasierung des Mammakarzinoms erfolgt über zweierlei Wege, zum einen über Lymphbahnen, vorwiegend in die regionären Lymphknoten, zum anderen über die Blutbahn in die Organe. Für das Mammakarzinom typische Metastasierungsorte stellen Knochen, Lunge, Leber und Gehirn dar, die Reihenfolge entspricht der absteigenden Häufigkeit. Mortalität und Prognose sind hier direkt mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen vergesellschaftet [17]. Am häufigsten metastasiert das Mammakarzinom in die Knochen, insbesondere in lange Röhrenknochen, Wirbelkörper und Rippen. Ein Mammakarzinom mit bestehenden Knochenmetastasen gilt als unheilbar, was bedeutet, dass eine palliative Therapie angezeigt ist [16].

Besonders für das TNBC ist, dass ca. 5 Jahre nach Diagnosestellung die Rezidiv-Wahrscheinlichkeit, das heißt das Wiederauftreten der Erkrankung, ihren Höhepunkt erreicht, um danach deutlich abzufallen. Im Gegensatz dazu ist das Rezidiv-Risiko bei nicht-TNBC über die Zeit konstant, aber niedriger als beim TNBC [4].

I.1.3 RTK (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen)

Signale in Zell-Netzwerken des menschlichen Körpers werden über unterschiedlichste Signalstoffe, in komplexen Mechanismen der Zell-Kommunikation, vermittelt. Man unterscheidet endokrine, parakrine und autokrine Signalstoffe, die über, auf der Zelloberfläche exprimierte Rezeptoren, Signale von außerhalb der Zelle ins Zellinnere vermitteln können. In der Zelle kann dieser Reiz zu Veränderungen bis in den Zellkern führen. Dieser mehrstufige Prozess beginnt mit der Bindung des Signalstoffs an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Empfängerzelle, was zur Aktivierung des Rezeptors führt. Dieser löst nun eine Art Kettenreaktion an Aktivierung/Inhibition verschiedener Moleküle im Zellinneren aus, was sich z.B. auf die Zellteilung oder Differenzierung der Zelle auswirken kann. Da die Zellmembran in dieser Signalkaskade eine zunächst unüberwindbare Hürde darstellt, benötigt man ein Bindeglied, welches zwischen Extra- und Intrazellularraum vermittelt. Dabei spielen transmembranäre Rezeptoren eine wichtige Rolle, zu denen auch die Gruppe der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) gehört. Sie spielen eine außerordentliche Rolle in zellulären Wachstums- und Differenzierungsprozessen. Mutationen oder Expressionsveränderungen verschiedener RTKs stehen in direktem Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren [18].

I.1.4 Die EGFR- Familie (*Epidermal Growth Factor Receptor*)

Der membranständige epidermale Wachstumsfaktorrezeptor EGFR und sein Ligand, der epidermale Wachstumsfaktor EGF, sind Schlüsselmoleküle von Proliferation und Zellwachstum [19]. Grundlage dieses Mechanismus ist die Regulation des Zellzyklus, mit Übergang von der Ruhephase (G0-Phase) in den Zellteilungszyklus (G1-Phase). Ist die Aktivität des EGFR gesteigert, erleichtert dies den Übergang in die G1-Phase, wodurch kontinuierlich und unkontrolliert wachsende Zellpopulationen entstehen können. Gesteigerte EGFR-vermittelte Replikationsstimuli sind bei vielen soliden Tumoren, unter anderem beim Mamma- und Ovarialkarzinom, beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), beim kolorektalen Karzinom sowie bei Kopf-Hals-Tumoren (SCCNH), bekannt [20].

Die EGFR-Familie lässt sich in 4 verschiedene Tyrosin-Kinase-Rezeptoren einteilen: EGFR (ErbB1 oder Her1), welcher als Erster entdeckt wurde, ErbB2/neu/Her2,

ErbB3/Her3 und ErbB4/Her4. Alle Mitglieder dieser Familie weisen eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine transmembranäre Domäne und eine zytoplasmatische Domäne mit integrierter Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Aktivität auf [21]. Der ErbB3-Rezeptor weist aufgrund einer Mutation in der zytoplasmatischen Domäne keine Tyrosin-Kinase-Aktivität auf. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass ErbB1/Her1 und ErbB2/Her2 eher in proliferierenden und undifferenzierten Geweben zu finden sind, während ErbB3/Her3 und ErbB4/Her4 eher in differenzierten Geweben vorherrschen [22][23].

Die Aktivierung des EGFR durch Bindung eines Liganden führt im ersten Schritt zur Dimerisierung der Rezeptormonomeren. Dabei können entweder zwei EGFR (Homodimer) oder ein EGFR mit einem anderen Rezeptor der Familie (Heterodimer) dimerisieren [24]. Das Resultat der Dimerisierung ist die Aktivierung der intrinsischen Tyrosin-Kinase, welche durch Autophosphorylierung der Tyrosinreste eine Andockstelle für zytoplasmatische Botenproteine, sog. *second messenger*, schafft, um die Signalweiterleitung fortzusetzen. Diese *second messenger* gelangen in den Zellkern und nehmen dort Einfluss auf die Gentranskription. Dies führt unter anderem zur Steigerung der Zellproliferation, zum Umbau des Zytoskeletts, vermehrter Angiogenese, Inhibition der Apoptose sowie Tumormetastasierung. Die wichtigsten Signalwege werden durch Ras-Raf-Mitogen-Aktivierte-Proteinkinase (MAPK), STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), aber auch durch Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und AKT (Proteinkinase B) vermittelt [20]. Nach vollendeter Signalübertragung werden die Rezeptor-Liganden-Komplexe in die Zelle aufgenommen und anschließend entweder recycelt oder abgebaut.

Die Rezeptoren werden in unterschiedlichen Konzentrationen und Kombinationen verschiedener Gewebe exprimiert. Einzig die Zellen des blutbildenden Systems zeigen keine EGFR-Expression. Sowohl bei der Entwicklung als auch im adulten Organismus ist die Funktion der EGFR unentbehrlich. Am besten ist die Funktion der EGF-Rezeptoren während der Brustdrüsenentwicklung beschrieben, wo sie Wachstum und Differenzierung der Milchdrüsengänge fördern sowie zur Laktation beitragen [25][26]. Abnormale Signalübertragung und unkontrollierte Aktivierung des EGFR spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung vieler Krebserkrankungen.

I.1.5 Dysregulation des EGFR in malignen Tumoren

Unter Dysregulation von Rezeptoren versteht man eine Störung der normalen Funktion bzw. der Regulation dieser Funktion. Besonderes Augenmerk ist auf sog. Protoonkogene zu richten, die durch den Einfluss von schädlichen Faktoren wie z.B. ionisierender Strahlung mutieren können und somit zur Steigerung von Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung führen können. In diesem Zusammenhang spricht man auch von *GOF = gain of function*- oder *LOF = loss of function*-Mutationen, die sich im Falle von GOF in einem Funktionsgewinn und im Falle von LOF in einem Funktionsverlust äußern. Bei diesen Mutationen handelt es sich häufig um Punktmutationen, Deletionen, Insertionen oder Amplifikationen. Bei Rezeptoren kann dies zu einer vermehrten oder verminderten Expression oder einer gesteigerten Aktivierung, bis hin zur Autoaktivierung ohne Liganden, führen. Ein weiterer Faktor für eine Funktionssteigerung kann auch das vermehrte Vorhandensein von Liganden, wie z.B. von EGF, sein. Durch Aufhebung des regulatorischen Systems und die dauerhaft erhöhten wachstumsfördernden Signale wird die Zellteilungsrate erhöht und somit die Transformation von gesunden Zellen zu malignen Zellen begünstigt. Da der EGFR an Regulation und Aktivierung des Zellzyklus sowie Zelldifferenzierung beteiligt ist, spielt er eine zentrale Rolle in der Tumorentwicklung. Eine Überexpression oder verstärkte Aktivierung des EGFR führt zu verstärktem Tumorwachstum, Apoptoseinhibition sowie Gefäßneubildung und Gefäßinvasion [27].

Zudem weisen EGFR-exprimierende Tumoren häufig eine Chemotherapie-Resistenz auf. Tumore verschiedenen Ursprungs weisen oft eine Überexpression des EGFR auf, in mindestens 33 % - 50 % der epithelialen Tumoren ist der EGFR dysreguliert [20]. In Tabelle 2 sind die prozentualen Anteile der Tumoren mit EGFR-Überexpression für die einzelnen Tumorarten aufgelistet.

Tabelle 2: Überexpression des EGFR in verschiedenen Tumoren [28]

Tumortyp (%)	Anteil der Tumoren mit EGFR-Expression (%)
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom	40-80
Prostatakarzinom	40-80
Mammakarzinom	82-90
Kolorektales Karzinom	25-77
Pankreaskarzinom	30-89
Ovarialkarzinom	35-70
Hals- und Kopftumoren	90-95

Die EGFR-Expression mit spezifischer Tyrosin-Kinase-Aktivität in Mammakarzinomen wird zwischen 14 % - 90 % angegeben. Dies stellt einen attraktiven Angriffspunkt für neuartige, gezielte, sog. *targeted therapies*, dar [29].

I.1.6 Bestimmung der EGFR-Amplifikation

Zur Bestimmung der EGFR-Amplifikation stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR = *quantitative polymerase chain reaction*) ist eine Vervielfältigungsmethode für bestimmte Sequenzen von Nukleinsäuren, die eine Quantifizierung von DNA-Material erlaubt. Dazu werden spezifische Primer, Nukleotide und Polymerase im Thermocycler inkubiert und dadurch eine komplementäre Nukleinsäure-Matrize erzeugt. Die 3 Teilschritte eines Zyklus beinhalten die Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation der gewünschten Abschnitte. Durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf 95°C werden die Wasserstoffbrücken aufgebrochen, was zur Denaturierung führt. Danach wird bei einer für die jeweiligen Primer optimalen Temperatur zur Anlagerung (*Annealing*) an den komplementären Strang inkubiert. Dabei gibt es jeweils einen Primer komplementär zum 5'- sowie einen Primer komplementär zum 3'-Ende der Matrize, wodurch ein definierter DNA-Abschnitt begrenzt wird. Das Temperaturoptimum ist abhängig von der Sequenz und Länge der Primer, in der Regel liegt sie zwischen 55°C – 65°C. Der dritte Schritt der PCR beinhaltet die Synthese des komplementären Strangs zur Matrize (Elongation) durch die DNA-Polymerase unter Verwendung der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs). Eine

aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq.) isolierte Taq-Polymerase eignet sich besonders gut aufgrund ihrer Hitzestabilität bei einer Arbeitstemperatur von 72°C. Danach wird auf 4°C abgekühlt, um die Reaktion zu stoppen. Diese Reaktionsschritte werden zyklisch wiederholt, was zur exponentiellen Amplifikation der gewünschten Sequenzen führt. Hierbei wird jedoch erst nach Ablauf des Experiments durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente eine Quantifizierung möglich.

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung bietet die Verwendung der Microarray-Technologie. „Microarray“ ist eine Sammelbezeichnung für molekularbiologische Untersuchungssysteme, die eine parallele Analyse vieler Einzelnachweise ermöglichen. Der Vorteil der Microarray-Technologie, im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden der Expressionsanalyse wie z.B. *PCR*, liegt darin, zeitgleich mehrere tausend Gene bzw. das komplette Genom eines Organismus auf Expressionsveränderungen hin untersuchen zu können. Zudem ist für die Untersuchung nur eine sehr geringe Menge an Material notwendig. Mittlerweile wird dieses Verfahren auch zur Subklassifizierung von Tumoren bzw. Tumorzelllinien verwendet, welche Aufschluss über Therapiemöglichkeiten und Prognose der jeweiligen Erkrankung geben kann [30]. Microarrays bestehen aus einem Träger (z.B. Glas oder Kunststoff) auf dem die Proben (z.B. DNA-Fragmente) in kleinen Testfeldern, sog. *spots*, angeordnet und fixiert sind.

In unserem Fall wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Bestimmung der Amplifikationsanzahl durchgeführt. Für die Genexpressionsanalyse wurden *Agilent 4x44k whole genome* Microarrays verwendet. Zur Kalibrierung wurden zunächst 500ng RNA mit *spike-in RNA* versetzt. Durchgeführt wurde die Analyse entsprechend den Herstellerangaben des *one colour spike-in RNA-Kits* (Agilent). Die fluoreszierende Markierung erfolgte mit dem grünen Farbstoff CY-3-CTP. Durch Zugabe von Primern, reverser Transkriptase und Polymerase entstand die markierte cRNA, die anschließend mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) aufgereinigt wurde. Mittels Nanodrop Photometer wurden Fluoreszenz sowie Konzentration der entstandenen cRNA bestimmt. Anschließend wurde die CY-3 markierte cRNA fragmentiert und mit GEHyb Lösung (Agilent) auf den Microarrays hybridisiert. Diese wurden nach Waschung und Trocknung mit einem Agilent Microarray Scanner ausgelesen. So konnte unter Verwendung der *Feature Extraction Software* (Agilent Technologies) eine Quantifizierung der einzelnen *spots* erfolgen.

I.1.7 Prinzipien der „targeted“ Therapie des EGF-Rezeptors

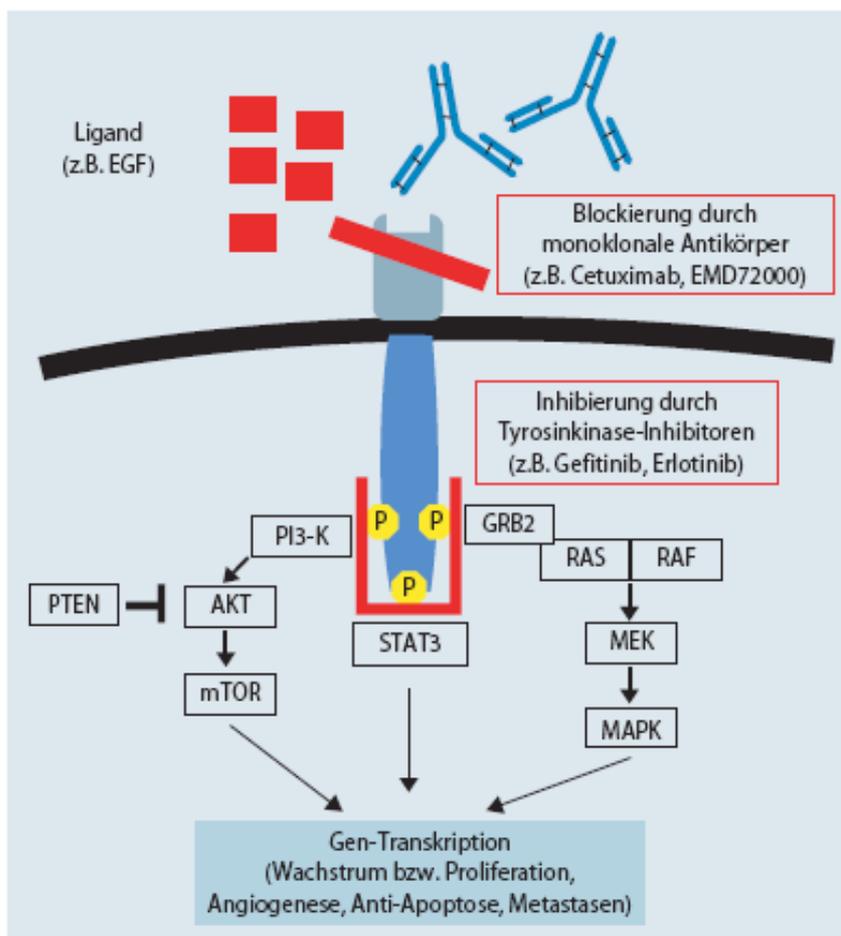
Die zielgerichteten Therapien, sog. *targeted therapies*, richten sich, im Gegensatz zu den klassischen Chemotherapien mit Zytostatika, gegen bestimmte molekulargenetische Zielstrukturen des jeweiligen Tumorgewebes. Hierbei kommen entweder im Labor hergestellte monoklonale Antikörper (Namensendung –mab) oder kleine Moleküle, sog. *small molecules* (Namensendung –mib,–nib), zum Einsatz [31]. Das Prinzip dahinter ist, biologische Strukturen, die das Tumorstadium fördern, gezielt zu blockieren. Hier dienen Moleküle, die bei der Signaltransduktion mitwirken, als geeignete Angriffspunkte. Die Strukturen sollten optimalerweise im Tumorgewebe vermehrt und im gesunden Gewebe kaum vorkommen. Antikörper wirken somit von außen auf die Zelle, indem sie z.B. Rezeptoren für die eigentlichen Liganden durch Besetzung blockieren, die kleinen Moleküle können in die Zelle eindringen und z.B. die Kinase-Domäne in ihrer Autophosphorylierungsfunktion stoppen.

Diese zielgerichteten Therapien können alleine, aber auch in Kombination miteinander sowie mit herkömmlichen Chemo- und Strahlentherapien angewendet werden. Diese Form der Therapie führt nicht zur Heilung, kann aber ein Fortschreiten der Krankheit zunächst stoppen bzw. verlangsamen. Um den Nutzen einer zielgerichteten, personalisierten Therapie abschätzen zu können, werden zunehmend Eigenschaften der Tumorzellen des jeweiligen Patienten auf die Ziele, *targets*, hin untersucht.

Die zielgerichteten Therapien gegen den EGFR richten sich gegen verschiedene Strukturen: zum einen kann die Bindungsstelle des EGFR für EGF durch monoklonale Antikörper blockiert werden, zum anderen kann die Dimerisierung unterbunden werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist der Antikörper Cetuximab. Hierbei handelt es sich um einen chimären (rekombinanten, aus zweierlei Spezies bestehenden) monoklonalen Antikörper des Typs IgG1 gegen die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne des EGFR. Dieser konkurriert mit den natürlichen Liganden um die Bindungsstelle. Dadurch wird eine Weiterleitung des Wachstumssignals unterbunden und zusätzlich, durch den Prozess der antikörpervermittelten Toxizität der T-Lymphozyten (*ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*), eine immunologische Antwort provoziert. Ein weiterer

Antikörper ist Nimotuzumab. Kleine Moleküle hemmen durch Anlagerung an die ATP-Bindungsstelle der zytosomatischen Tyrosinkinase des EGFR die Autophosphorylierung des Rezeptors und damit die Aktivierung der Signaltransduktionskette, weshalb sie auch als TKIs (Tyrosin-Kinase-Inhibitoren) bezeichnet werden [20].

Abbildung 2: Inhibition des EGFR-Dimers (graublau) und der nachfolgenden intrazellulären Signaltransduktion [20]

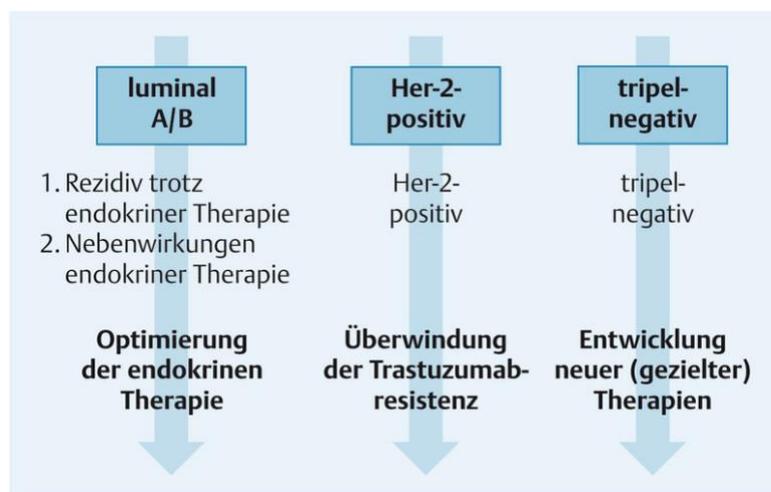


Zugelassene TKIs beim Mammakarzinom sind z.B. Trastuzumab und Lapatinib, weitere TKIs erbrachten in Studien keinen Überlebensvorteil. Gefitinib, Erlotinib oder Sorafenib sind Beispiele für Anti-EGFR TKIs.

In Bezug auf das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass Gefitinib den EGFR hemmt und zu Wachstumshemmung und Apoptose in der Zellkultur führt. Im Tiermodell kam es zur Reduktion der Tumorlast, wenn Gefitinib in Kombination mit anderen Chemotherapeutika verabreicht wird [20]. In Bezug auf die weiteren Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms konnte in neueren Studien ebenfalls

die Wirksamkeit des Angiogenesehemmers Bevacizumab (Anti-VEGF-AK) in Kombination mit anderen Chemotherapeutika nachgewiesen werden [32]. Weitere Zielproteine der *targeted therapy* stellen unter anderem MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) durch Trametinib, PARP (*poly-ADP-ribose-polymerase*) durch Iniparib und CDKs (*cyclin-dependent kinases*) über SNS-032, dar [3]. Anfang 2016 zeigte eine Studie die Wirksamkeit von Anti-Phosphatidylserin-AK und Anti-PD-1-AK, welche am TNBC-Mausmodell untersucht wurde [33]. Die genannten Zielstrukturen sind besonders in TNBC bedeutende Angriffspunkte, da durch den fehlenden Nutzen einer antihormonellen Therapie alternative Therapiestrategien dringend erforderlich sind. Einen Überblick über die Therapieansätze der verschiedenen Mammakarzinom-Subtypen liefert Abbildung 3.

Abbildung 3: Ansätze zur Therapieoptimierung in den einzelnen Mammakarzinom-Subtypen [34]



Jedoch ist auch bei den zielgerichteten Therapien die Entwicklung von Resistenzen ein großes Problem. Gründe hierfür können eine verringerte Bioverfügbarkeit der Substanz, der Verlust der Bindungsfähigkeit durch Mutation der Zielstrukturen, Aktivierung von weiterführenden Signalkaskaden sowie Aktivierung alternativer Signaltransduktionswege sein [34].

Wie Tabelle 2 zeigt, ist die Forschung, insbesondere auf dem Gebiet des EGFR, hochrelevant, da im Hinblick auf mögliche neue Therapien nicht nur Patienten mit Mammakarzinom, sondern auch eine Reihe weiterer Tumorkrankheiten davon profitieren würden.

In den Voruntersuchungen zur Rolle von EGFR-Amplifikationen in der Entstehung von frühen Metastasen des Mammakarzinoms ergab sich der dringende Verdacht,

dass vor allem die Amplifikation des EGFR-Rezeptors eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Mammakarzinoms spielt. In immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche EGFR-Überexpression von über 88 % in undifferenzierten Mammakarzinomen, wohingegen diese in differenzierteren Mammakarzinomen weniger häufig zu finden war. Dies legt den Schluss nahe, dass der EGFR-Signalweg für die Funktion der Stammzellendifferenzierung und der Entstehung von Brustkrebs eine entscheidende Rolle spielt [35]. Die Brustdrüse ist zudem das einzige Organ, welches sich hauptsächlich nach der Geburt/in der Pubertät entwickelt und differenziert. Die zentrale Rolle des EGFR in der Brustdrüsendifferenzierung konnte in Experimenten mit Brustdrüsengewebe von EGFR-knockout Mäusen (-/-) bereits dargestellt werden [36]. Die Amplifikation des EGFR-Gens war sowohl in unmittelbarer Nähe des normalen Brustgewebes zum Primärtumor, im Primärtumor, als auch in den Fernmetastasen der gleichen Patientin nachweisbar [37], [38]. Um die Hypothese der Stammzellendifferenzierung als Ausgangspunkt für die Entstehung des Mammakarzinoms zu untermauern, sollen im Mausmodell verschiedene Klone der Mammakarzinom-Zellen mit unterschiedlicher Anzahl an Genkopien des EGFR-Gens eingesetzt werden. Hierzu werden den Mäusen verschiedene biolumineszierende Klone der Zelllinien MDA-468 sowie BT20 mit unterschiedlicher EGFR-Amplifikation linksventrikulär injiziert und das Tumorstadium bildmorphologisch verfolgt. Die Verwendung von Mäusen stellt hierbei ein beliebtes Arbeitsmodell dar, da sie leicht mit entsprechender genetischer Modifikation und Immundefizienz gezüchtet werden können. Da jedoch die Struktur der regulativen Domäne des menschlichen EGFR-Gens nur in menschlichen Zellen vorkommt, müssen menschliche Zellen, sog. Xenografts verwendet werden. Ziel ist es, Ergebnisse zu erhalten, die der Diagnostik von sehr frühen und somit noch heilbaren Metastasierungsstadien des Mammakarzinoms dienen. So könnten neue Behandlungsmöglichkeiten, speziell auf die unterschiedlichen Mammakarzinom-Subtypen ausgerichtet, etabliert werden. Interessant ist hierbei vor allem, dass über den Nachweis von Tumorzellen im Knochenmark eine frühe Metastasierung bereits detektierbar wäre [39].

I.2 Zielsetzung

Eine subtypen-spezifische, zielgerichtete, weniger toxische Therapie für die besonders aggressiven TNBC und basal-like Mammakarzinome stellt ein wichtiges Ziel der Forschung dar. Eine Zielstruktur bietet hier der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR). Es konnte gezeigt werden, dass Aberrationen des EGFR, in Form von Amplifikationen, sehr früh in der Entwicklung des Mammakarzinoms auftreten und bei der Tumorprogression bis hin zur Metastasenbildung eine wichtige Rolle spielen. Abbildung 1 fasst die Arbeitshypothese, auf der die Experimente meiner Arbeit beruhen, zusammen. Es wird davon ausgegangen, dass sich Zellen mit einer EGFR-Amplifikation, vorwiegend aus Basalzellen der Brustdrüse entstehend, zu so genannten *committed progenitor cells* entwickeln [40]. Aus diesen wiederum entwickeln sich über mehrere Zwischenstufen und weitere Mutationen metastasierungsfähige Tumorzellen. Es gibt experimentelle Daten, die vermuten lassen, dass sie als Surrogate, z.B. im Knochenmark und im peripheren Blut, als so genannte *disseminated tumor cells* „DTC“, nachweisbar sind [41]. In dieser Arbeit sollte deshalb im Mausmodell die frühe Dissemination von Sublinien einer Modelzelllinie des Mammakarzinoms (MDA-MB-468 und BT-20), abhängig von ihrer Anzahl der EGFR-Genkopien (EGFR-CNV), verfolgt werden. Die Arbeitshypothese geht davon aus, dass durch eine unterschiedliche CNV des EGFR das Metastasierungsverhalten der Mammakarzinomzellen beeinflusst wird. Durch linksventrikuläre Injektion gelangten die Zellen direkt auf den hämatogenen Metastasierungswege. Mittels Biolumineszenzmarkierung der Tumorzellen und Emissionsmessung sollten Ausbildung und Lokalisation manifester Metastasen bildmorphologisch nachgewiesen werden.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Sublinien der Mammakarzinomzelllinie MDA 468 für die *in vitro* Imagingexperimente

Die verwendeten Zelllinien gehören zur Gruppe der Triple-negativen Mammakarzinomzellen (TNBC). Das bedeutet, dass weder Estrogen-Rezeptor (ER), Progesteron-Rezeptor (PR), noch Her2/Neu (ErbB-2/EGFR2) exprimiert werden, was zur Namensgebung der *triple negative breast cancer cells* (TNBC) führt. TNBCs kommen in ca. 10 % - 20 % der Fälle bei Brustkrebs vor, vorwiegend bei Jüngeren sowie Patienten aus dem afrikanisch-amerikanischen Raum. TNBC gelten als biologisch aggressiv und metastasierungsfreudig. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen mit metastasierten TNBCs beträgt unter 30 %. Die relativ schlechte Prognose ist jedoch auch dem fehlenden Nutzen einer antihormonellen Therapie geschuldet. Eine der ersten Entdeckungen im Hinblick auf die molekulare Struktur der TNBCs, im Besonderen der *basal-like* Zellen, zeigte die Ähnlichkeit der Mutationsmuster zu denen der autosomal-dominant vererbten familiären „Brustkrebsgene“ BRCA1 und BRCA2 auf. Die *gain of function* Mutationen betreffen vorwiegend DNA-Reparatur-Signalwege und führen zu enormer genomischer Instabilität der Brustkrebszellen [42].

In diesem Fall wurden die humanen Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-468 mit deren Sublinien und die Mammakarzinom-Zelllinie BT-20 verwendet.

Tabelle 3: Herkunft und Eigenschaften der verwendeten humanen Zelllinien

Zelllinie	Subtyp	Histologie	Herkunft	mutierte Gene	Literatur
MDA-MB-468	<i>basal-like</i>	Adenokarzinom der Brust	Pleuraerguss (Metastase)	PTEN RB1 SMAD4 TP53	(Giard, 1973), (ATCC/Sanger Institut, 2004)
BT-20	nicht näher klassifizierte Morphologie	Adenokarzinom der Brust	Brustdrüse (Primärtumor)	CDKN2A PIK3CA TP53	(Moroni M, 2005), (ATCC/Sanger Institut, 2004)

TNBC können in die Gruppen *luminal* oder *basal-like* eingeteilt werden, je nach Expressionsmuster an Zytokeratinen. Die hier verwendete Zelllinie MDA-MB-468 gehört zur Gruppe *basal-like* und besitzt somit eine erhöhte Expressionsdichte an basalen Keratinen, wie z.B. KRT5, 6A, 6B, 14, 16, 17, 23 und 81 [42].

Die Zelllinie MDA-MB-468 Wildtyp „WT“ (ATCC, Manassas, USA) besitzt eine EGFR-Genamplifikation von ca. 30. Sie wurde zusätzlich über ein Jahr mit EGF (Endkonzentration 5 nm/ml) behandelt, wodurch die Sublinie Suppressed „Supp.“ entstand. Diese besitzt eine 30 bis 40-fach geringere EGFR-CN von ca. 2-3 [43]. Die Sublinie „Bone“ stellt einen Klon von „WT“ dar und besitzt ebenfalls eine EGFR-CN von ca. 30. Die Zellen wurden mehrmals aus bereits in den Knochen metastasierten Tumorzellen mittels Collagenase extrahiert, kultiviert und G418 (Geneticin®, Gibco) selektioniert.

Die Zelllinie BT-20 (ATCC, Manassas, USA) besitzt eine EGFR-CN von ca. 10.

Tabelle 4: Übersicht über die EGFR-CN der verwendeten Zelllinien [43]

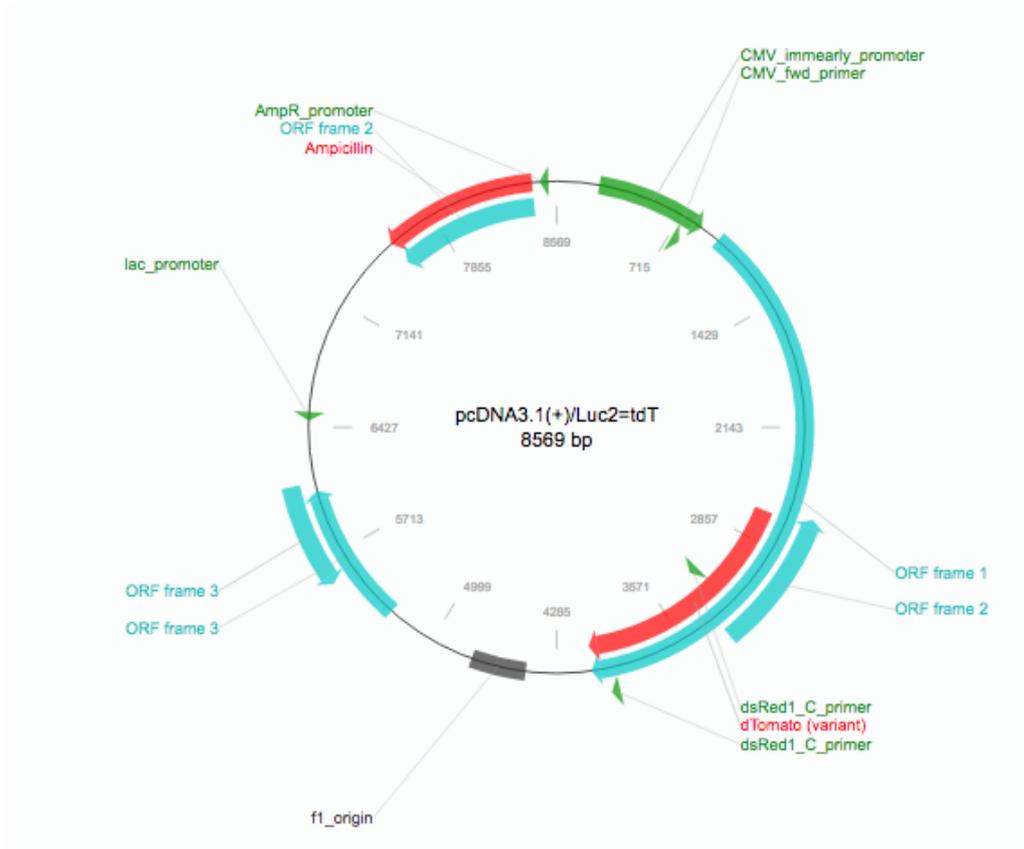
Zelllinie	MDA-MB 468 „bone“	MDA-MB 468 „WT“	MDA-MB 468 „Supp.“	BT-20
EGFR-CN	27	27	2	10
Nummerierung der Zelllinie	1	2	3	4

Zusätzlich waren die Zellen stabil mit einem Fusionsgen, dem Luciferase- und td Tomato Red (Luc2=tdT) -Gen (Dr. Michael H. Bachmann, Dept. of Pediatrics, Stanford University, Stanford, CA), transfiziert (Abb. 4). Hierzu wurde ein virales Plasmid vom Typ pcDNA (+) 3.1. (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) als Vektor verwendet. Dieses besitzt einen CMV-Promotor, *multiple cloning sites (MCS)* als Schnittstellen für Restriktionsenzyme sowie eine Ampicillin-Resistenz [44]. Das td Tomato-Gen kodiert für ein pflanzliches Protein, das bei einer Wellenlänge von ca. 555 nm mit einer Emissionswellenlänge von ca. 580 nm, rot leuchtet [45].

Das aus Insekten der Spezies *Photinus pyralis (firefly)* gewonnene Luciferase-Gen kodiert für das gleichnamige Enzym. Luciferasen wandeln ihr Substrat Luciferin unter Verbrauch von Sauerstoff zu instabilen Produkten, sog. Dioxetanen um, bei deren Zerfall es zu Biolumineszenz mit einem Maximum um 560 nm kommt [46]. Um die

erfolgreich transfizierten Zellen herauszufiltern wurde mittels *FACS-Gerät* (*fluorescence-activated cell sorting*) bei einer Wellenlänge von ca. 580 nm aussortiert und unter G418 Kultur selektioniert.

Abbildung 4: Aufbau des verwendeten Plasmids [44]



Die aufbereiteten Zellkulturen wurden im DMEM-Medium (Invitrogen) mit FCS, L-Glutamin und Penicillin-Streptomycin Mix (Endkonzentration 50 U/ml) kultiviert. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

II.1.2 SCID beige Mäuse

Nach Befürwortung durch die Tierschutzkommission (siehe Anhang) wurden weibliche SCID bg/bg Mäuse (offizielle Nomenklatur: CB17/lcr-Prkdc^{scid}/lcrIcoCrI) bei Charles River (Wilmington, MA, USA) im Alter von fünf bis sechs Wochen bestellt. Eine Mutation im Prkdc Allel auf Chromosom 16, welches für eine Proteinkinase kodiert, führt zu einer insuffizienten Immunabwehr. Es besteht ein Defekt der B- und

T-Zellreihe. Thymus und Lymphknoten sind vorhanden, jedoch nur rudimentär ausgebildet. Alle anderen Zellreihen des Blutes sind normal ausgebildet [47].

Die Mäuse wurden unter keimfreien Bedingungen in Käfigen mit Filter untergebracht, einem 12h Tag/12h Nacht Zyklus ausgesetzt und erhielten die übliche standardisierte Tiernahrung sowie Wasser ad libitum.

Die Mäuse starben nach 8 Wochen durch schmerzlose Euthanasie, um ihnen unnötiges Leiden zu ersparen.

II.2 Methoden

II.2.1 Narkotisieren der Mäuse und Injektion der Zellen

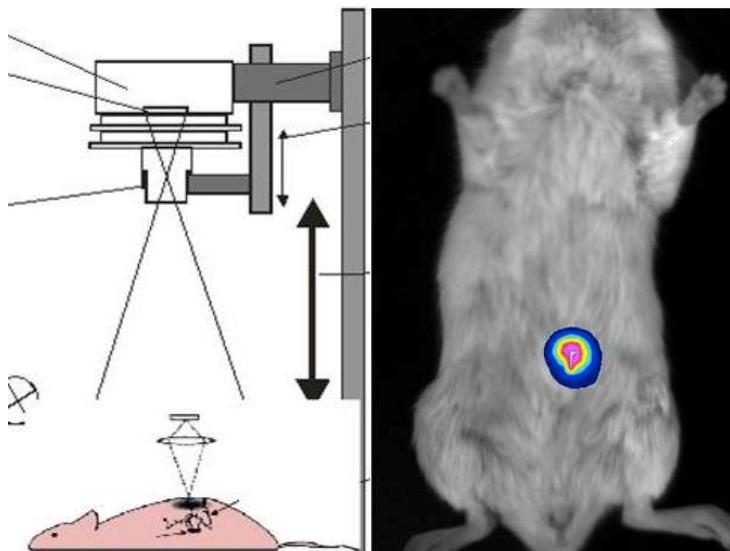
Die Narkose der Mäuse erfolgte i.p. mit 0,5 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss), Medetomidin (Dormitor®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) sowie 5 mg/kg KG Midazolam (Dormicum®, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen). Nach Enthaarung der linken Achselgegend (Veet Enthaarungscreme) wurden die Mammakarzinomzellen unter Ultraschallkontrolle (Vevo 770, Visualsonics Inc., Toronto) in die linke Herzkammer eingebracht. Hierzu wurden $1,4 \times 10^5$ Zellen in 100 µl PBS suspendiert. Nach erfolgreicher Injektion wurde die Narkose s.c. mit 0,5 mg/kg KG Flumazenil (Anexate®, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen), 1,2 mg/kg KG Naloxon (Naloxon Curamed®, CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe) und 2,5 mg/kg KG Atipamezol (Antisedan®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin) antagonisiert.

II.2.2 Bildgebung mittels NightOWL

Vier und acht Wochen nach der Injektion erfolgte die in vivo Bildgebung mittels NightOWL II LB 983 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad). Bei diesem Gerät handelt es sich um einen sog. Luminographen, der sich besonders zur Messung schwacher Lichtemissionen eignet [48]. Das Gerät besteht aus einer Dunkelkammer, in deren Mitte ein Ringlicht installiert ist, sowie einer hochsensitiven, tiefgekühlten CCD-Kamera.

Nach dem Narkotisieren der Tiere (s.o.) wurde 150 mg/kg D-Luciferin Substrat (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) je Maus i.p. injiziert. Die Bildgebung erfolgte in ventraler und dorsaler Lage der Tiere mit einer Anstrahlungsdauer von ca. 3 Minuten.

Abbildung 5: schematische Darstellung der Bildgebung im NightOWL-Gerät [48]



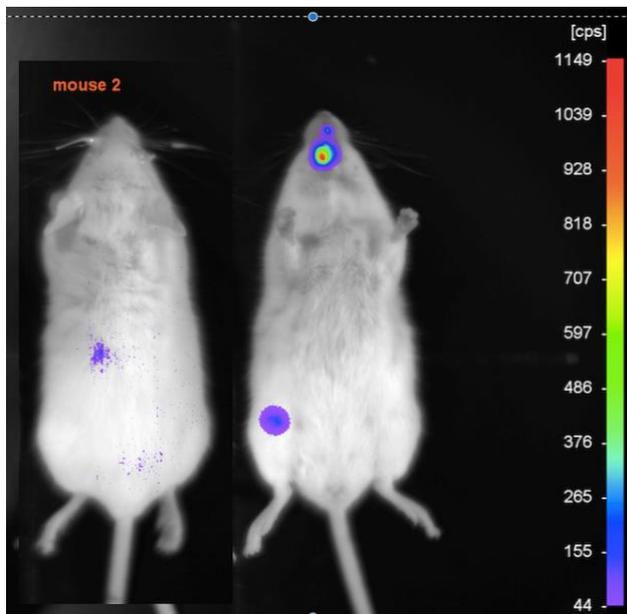
Das Prinzip der Bildgebung beruht auf der Tatsache, dass Luciferase-produzierende Tumorzellen das Substrat Luciferin zu Dioxetanen umwandeln können. Durch die Redoxreaktion, die nur unter dem Vorhandensein von Sauerstoff ablaufen kann, kommt es zur Biolumineszenz.

Zur Auswertung des Biolumineszenz-Signals wurde die Indigo-Software (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) mit automatischer Peak-Suchfunktion verwendet. Gemessen wurde dabei die Intensität des Biolumineszenz-Signals in

Photonen pro Sekunde (ph/s). Hierbei entspricht die Biolumineszenz einem emittierten Licht, das durch eine chemische Reaktion in lebenden Organismen, freigesetzt wird. Diese kann durch den Luminographen detektiert werden.

Als oberer Grenzwert wurde durch Bestimmung der höchsten Intensität ein Wert von 7000, als unterer ein Wert von 25 festgelegt und auf alle Aufnahmen angewendet (Abb. 6). Die dabei gemessene Intensität entspricht der Emission von Biolumineszenz aus lebensfähigen Zellen und wird in Photonen pro Sekunde (ph/s) angegeben. In der Physik wird die Intensität auch als Flächenleistungsdichte beim Transport von Energie bezeichnet.

Abbildung 6: Maus 2 der Zelllinie „WT“ als Beispiel für die Bestimmung der Intensität



II.2.3 Statistische Methoden

In der vorliegenden Arbeit werden 4 verschiedene Mammakarzinomzelllinien auf Unterschiede bezüglich der metrischen Zielgrößen Ausdehnung, mittlere und gesamte Intensität, der anatomischen Lage (8 Kategorien) und des Gewebetyps (3 Kategorien) untersucht.

Aufgrund der geringen Fallzahlen und den nicht normalverteilten Messwerten wurden nicht-parametrische Testverfahren auf Basis von exakten Tests zur Analyse der Unterschiede zwischen den Zelllinien eingesetzt.

Die Zelllinien wurden wie folgt nummeriert: 1 = „bone“, 2 = „wild type“ (WT), 3 = „suppressed“ (Supp.) und 4 = „BT-20“. Diese unterscheiden sich zum Teil in der Anzahl der EGFR-CNV. Eine Übersicht stellt Tab. 4 dar.

Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich der Imagegröße wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests auf Signifikanz geprüft. Der Kruskal-Wallis-Test prüft keine paarweisen Unterschiede zwischen den vier Zelllinien, sondern ist ein globaler Test, mit dem Ziel zu prüfen, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien vorliegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die Berechnung aller möglichen Paarvergleiche verzichtet, da für deren Signifikanzprüfung die vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % adjustiert werden müsste.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der drei ersten Zelllinien wurden diese in einem zweiten Schritt separat auf signifikante Unterschiede geprüft.

Neben der Imagegröße wurde weiterhin die Verteilung von Tumoren in bestimmten Gewebearten auf signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien untersucht. Im Rahmen dieser Analysen wurden auf Basis des erfassten Gewebetyps drei auswertungsrelevante Kategorien (kein Tumor, Knochen, Lymphknoten und Weichgewebe) gebildet (vgl. Tabelle 10).

Die Unterschiede zwischen den Zelllinien wurden für jede definierte Kategorie getrennt mit Hilfe des Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstests untersucht. Auch hier ist die berechnete Signifikanz (p-Wert) eine Gesamtsignifikanz für Unterschiede, über alle vier Zelllinien hinweg. Auf die paarweisen Signifikanzberechnungen wurde, wie beim Kruskal-Wallis-Test, verzichtet.

Das oben beschriebene Analyseverfahren zur Prüfung von Unterschieden zwischen den Zelllinien bezüglich Imagegröße und Verteilung wurden in einer ergänzenden Analyse auch auf die Unterschiede zwischen den EGFR-CNV Kategorien

angewendet. Zu beachten ist, dass diese Analyse nur ergänzenden Charakter hat, da die einzelnen Zelllinien den drei EGFR-CNV Kategorien eindeutig zuordenbar sind.

Die Imagegröße wurde auf Basis der drei metrischen Größen Ausdehnung, Intensität gesamt und der mittleren Intensität erhoben. Die Stärke der Zusammenhänge zwischen diesen Größen wurde mit Hilfe der nicht-parametrischen Spearman-Korrelation untersucht.

Für alle Signifikanztests gilt, statistisch signifikante Unterschiede bzw.

Zusammenhänge sind dann nachweisbar, wenn der berechnete Signifikanzwert (p-Wert) kleiner gleich 0,05 ist. Als Beobachtungseinheit wurden nicht die Mäuse, sondern die einzelnen Messungen definiert. Insgesamt wurden 57 Mäuse untersucht. Von diesen 57 Mäusen traten bei 18 (31,6 %) Mäusen mehrfache Tumormessungen auf. Tumormessungen wurden im Rahmen der statistischen Auswertungen als unabhängige Messungen betrachtet. Insgesamt ergaben sich für die 57 Mäuse 66 Tumormessungen. Bei weiteren 19 (33,3%) Mäusen konnte kein Tumor detektiert werden. Diese Mäuse wurden mit in die Analyse aufgenommen. Im Rahmen der Tumormessungenanalyse wurde für diese Mäuse der Wert „Null“ als Tumormessung definiert. Bei der Analyse der Verteilung der Tumoren wurden diese Mäuse in der Kategorie „kein Tumor“ zusammengefasst. Unter Berücksichtigung der 66 Tumormessungen und der 19 Mäusen ohne Tumor ergibt sich eine Gesamtfallbasis von insgesamt 85 Messungen.

III Ergebnisse

III.1 Arbeitsplan und Gesamtauswertung der Imaging-Ergebnisse

Der Arbeitsplan sah vor, dass in jeweils 12-18 Mäuse Zellen der jeweiligen Zelllinie injiziert wurden. Nach 4 und nach 8 Wochen wurden das Wachstum der Zellen, die Verteilung im Körper der Mäuse und das Metastasierungsverhalten mit dem NightOWL-Gerät über die Lumineszenzemission festgehalten.

Von 60 Mäusen erhielten 18 Mäuse die Zelllinie MDA „*Bone*“ (1), 18 Mäuse die MDA „*wild type*“ (2), 12 Mäuse die MDA „*suppressed*“ (3) und 12 Mäuse die BT-20 (4). Da 3 Mäuse während bzw. nach der Injektion starben, beläuft sich die Anzahl der Versuchstiere insgesamt auf 57. In 19 Fällen konnten keine Emissionen, also kein Tumor detektiert werden, was einem Anteil von 33,33 % entspricht.

Wie in Tab. 5 zu sehen ist, wurden mit den verbliebenen 57 Versuchstieren insgesamt 85 Messungen durchgeführt. Davon konnten bei 66 Messungen Tumoren detektiert werden, was einem Prozentsatz von 77,65 % entspricht. Die Anzahl an auswertbaren Messungen beträgt somit für Zelllinien (1) 27 (87,1%), für Zelllinie (2) 24 (96,0%), für Zelllinie (3) 8 (66,67%) und für Zelllinie (4) 7 (41,18%).

Insgesamt konnten in 19 Fällen keine Emissionen, also kein Tumor detektiert werden, was einem Anteil von 33,33 % entspricht.

Im Folgenden beziehen sich alle Auswertungen auf die Endpunktmessung nach 8 Wochen.

Tabelle 5: Übersicht Fallzahlen, Mäuse, Tumormessungen

Zelllinie		Messungen	Tumoren	Mäuse	Anzahl Tumoren pro Maus				
		Anzahl	Anzahl	Anzahl	0	1	2	3	4
1	MDA „bone“	31 (100%)	27 (87,1%)	18 (100%)	4 (22,22%)	7 (38,89%)	3 (16,67%)	2 (11,11%)	2 (11,11)
2	MDA „wt“	25 (100%)	24 (96,0%)	18 (100%)	1 (5,56%)	10 (55,56%)	7 (38,89%)	0	0
3	MDA „supp.“	12 (100%)	8 (66,67%)	9 (100%)	4 (44,44%)	3 (33,33%)	1 (11,11%)	1 (11,11%)	0
4	BT-20	17 (100%)	7 (41,18%)	12 (100%)	10 (83,33%)	0	0	1 (8,33%)	1 (8,33%)
	Gesamt	85 (100%)	66 (77,65%)	57 (100%)	19 (33,33%)	20 (35,09%)	11 (19,3%)	4 (7,02%)	3 (5,26%)

Die Tab. 5 gibt einen Überblick über die Fallzahlen und Messungen absolut und prozentual. Jede Maus bildet zwischen 0 - 4 Tumore aus. Zelllinie 1 bildet in 4 Fällen (22,22 %) keinen Tumor aus. In 7 Fällen (38,89 %) bildet sie 1 Tumor und in 3 Fällen (16,67 %) 2 Tumore. In jeweils 2 Fällen (11,11 %) können 3 oder 4 Tumore detektiert werden.

Zelllinie 2 bildet nur in 1 Fall (5,56 %) keinen Tumor aus, in 10 Fällen (55,56 %) jedoch 1 Tumor und in 7 Fällen (38,89 %) 2 Tumore. Eine Tumoranzahl von 3 oder 4 kann nicht beobachtet werden.

Zelllinie 3 bildet in 4 Fällen keinen Tumor aus, was bei einer Gesamtanzahl von 9 Mäusen 44,44 % entspricht. In 3 Fällen (33,33 %) wird 1 Tumor ausgebildet, in jeweils 1 Fall 2 oder 3 Tumoren, was einem Prozentwert von 11,11 % entspricht.

Die Zelllinie 4 bildet in 83,33 % keinen Tumor aus. Bei einer Gesamtanzahl von 12 Mäusen entspricht dies 10 Fällen. 2 Mäuse bildeten jeweils 3 und 4 Tumore aus, was einem Prozentwert von 8,33 % entspricht.

III.1.1 Imagegröße

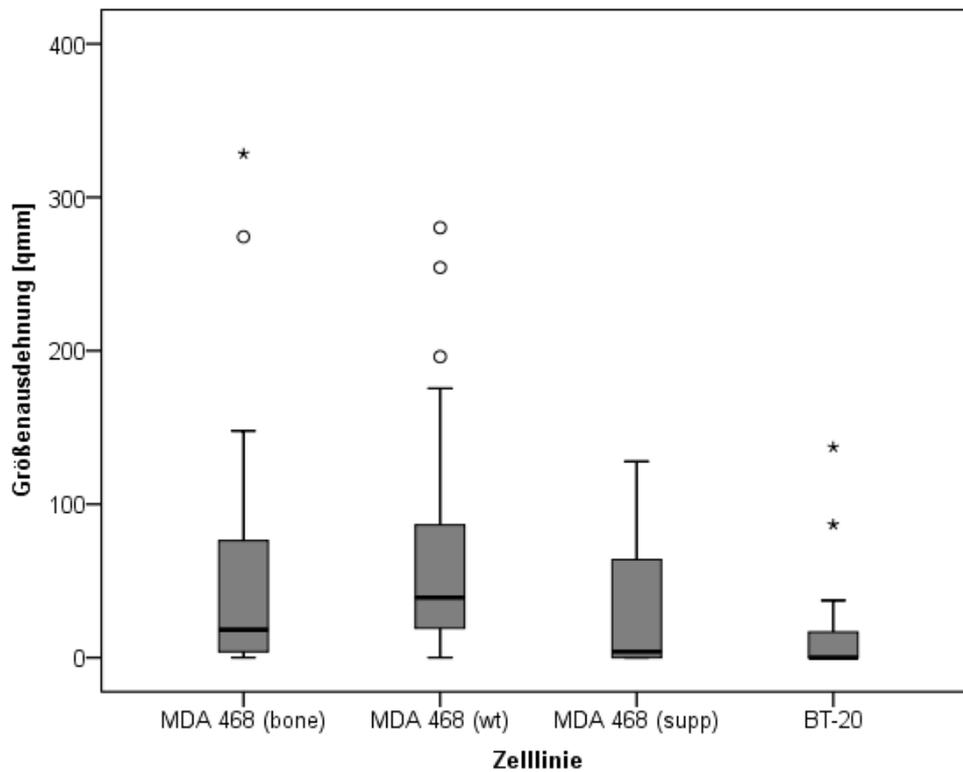
Tabelle 6: Imagegröße und Zelllinien

		Gesamt	Zelllinie			
			1	2	3	4
Kruskal Wallis Test p = 0,001			MDA 468 „bone“	MDA 468 „wt“	MDA 468 „supp.“	BT-20
Imagegröße mm ²	Mittelwert	48,09	52,94	70,10	31,01	18,95
	Standardabweichung	69,18	77,65	77,56	45,55	38,01
	Median	18,23	18,23	39,18	3,80	0,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum messbar	0,52	0,52	1,57	0,95	1,25
	Maximum	328,34	328,34	280,19	127,92	137,17
	N	85	31	25	12	17

Zwischen den Zelllinien sind statistisch signifikante Unterschiede bezüglich der Imagegröße nachweisbar ($p = 0,001$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$), dargestellt in Tab. 6 und Abb. 7. Diese Unterschiede sind im Wesentlichen auf die Zelllinie 4 (Abb. 7) zurückzuführen. Für die Zelllinien 1-3 wurden in einer ergänzenden Analyse Unterschiede separat geprüft, mit dem Ergebnis, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar sind ($p = 0,075$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 68$).

Im Rahmen der erhobenen Daten können damit keine signifikanten Unterschiede zwischen den MDA-Zelllinien nachgewiesen werden, auch wenn der Median der Zelllinie 3 mit 3,8 deutlich niedrigere Werte aufweist, als bei den Zelllinien 1 und 2. Die maximale Größenausdehnung liegt bei 328,34 mm². Der kleinste zu messende Tumor betrug 0,52 mm². Im Mittel liegt das Image eines Tumors bei 48,09 mm² mit einer Standardabweichung von 69,18.

Abbildung 7: Imagegröße und Zelllinie



Die in Abb. 7 zeigt die Verteilung der Imagegröße aller Messungen. Ein signifikanter Unterschied besteht im Vergleich zur Zelllinie 4, die Zelllinien 1 und 2 zeigen Ausreiser mit einem maximalen Wert der Imagegröße von 328,34 mm² für die Zelllinie 1 und einem maximalen Wert der Imagegröße von 280,19 mm² für die Zelllinie 2.

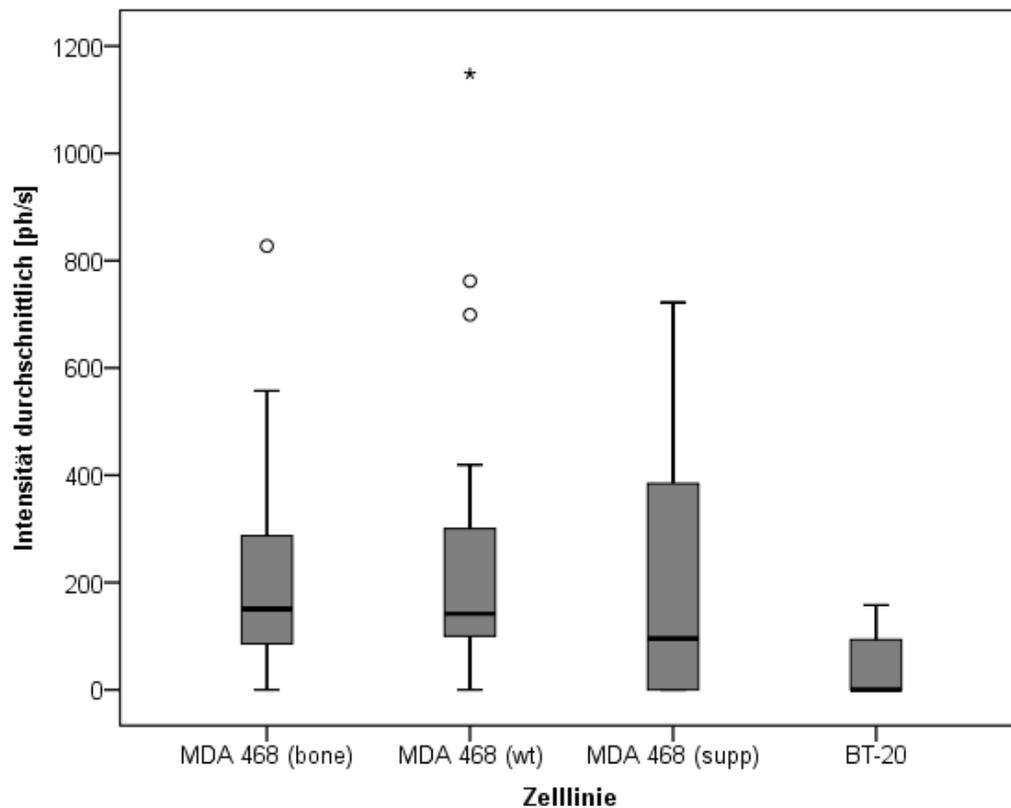
III.1.2 Intensität

Tabelle 7: mittlere Intensität und Zelllinien

Kruskal Wallis Test p = 0,000		Zelllinie				
		Gesamt	1	2	3	4
			MDA 468 „bone“	MDA 468 „wt“	MDA 468 „supp.“	BT-20
mittlere Intensität ph/s	Mittelwert	188,55	208,52	251,57	209,64	44,59
	Standardabweichung	220,13	190,99	264,82	264,78	57,22
	Median	113,91	150,51	141,60	95,67	0,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum messbar	73,01	73,01	76,54	79,76	76,01
	Maximum	1.148,12	827,30	1.148,12	721,72	157,74
	N	85	31	25	12	17

Zwischen den Zelllinien (Tab. 7) sind für die mittlere Intensität signifikante Unterschiede nachweisbar ($p = 0,000$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$). Auch hier werden die wesentlichen Unterschiede durch die Zelllinie 4 (BT-20) hervorgerufen. Für die 3 MDA-Zelllinien wurden in einer ergänzenden Analyse die Unterschiede separat geprüft, ohne den Nachweis signifikanter Unterschiede ($p = 0,513$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 68$). Der p-Wert liegt mit 0,513 deutlich über dem vorgegebenen Alpha von 0,05. Auch hier fällt der deutlich niedrigere Median von 95,67 bei Zelllinie 3, im Vergleich zu den Zelllinien 1 und 2, auf. Insgesamt konnte eine maximale durchschnittliche Intensität von 1.148,12 ph/s detektiert werden. Die kleinste noch messbare durchschnittliche Intensität betrug 73,01 ph/s. Der Mittelwert liegt bei 188,55 ph/s mit einer Standardabweichung von 220,13.

Abbildung 8: mittlere Intensität und Zelllinie



Die Abb. 8 zeigt die Verteilung der durchschnittlichen Intensitäten aller Messungen. Die Zelllinien 1 und 2 zeigen Ausreiser mit Werten von maximal 827,30 ph/s für Zelllinie 1 und 1.148,12 ph/s für die Zelllinie 2.

III.1.3 Korrelation Imagegröße und Intensität

Tabelle 8: Korrelation zwischen Imagegröße und Intensität

Spearman-Rho		Imagegröße mm ²	Intensität gesamt ph/s	mittlere Intensität ph/s
Imagegröße mm ²	Korrelationskoeffizient	1,000	0,974	0,865
	Sig. (2-seitig)		0,000	0,000
	N	85	85	85
Intensität gesamt ph/s	Korrelationskoeffizient	0,974	1,000	0,941
	Sig. (2-seitig)	0,000		0,000
	N	85	85	85
mittlere Intensität ph/s	Korrelationskoeffizient	0,865	0,941	1,000
	Sig. (2-seitig)	0,000	0,000	
	N	85	85	85

In einem zweiten Schritt werden die Zusammenhänge zwischen den Parametern Imagegröße, Gesamt- und mittlere Intensität untersucht.

Wie in Tab. 8 zu erkennen ist, zeigt sich ein starker Zusammenhang zwischen der Imagegröße und der Intensität, sowohl in Betrachtung der mittleren ($Rho = 0,865$) sowie der gesamten ($Rho = 0,974$) Intensität. Aufgrund des fast perfekten Zusammenhangs zwischen Imagegröße und der gesamten Intensität wird im Rahmen der Tumorgößenanalyse nur die Imagegröße und die mittlere Intensität betrachtet und auf eine separate Analyse der gesamten Intensität verzichtet.

III.2 Zelltyp-spezifische Auswertung der Imaging-Ergebnisse

III.2.1 Zelllinie MDA 468 „Bone“

Wie in der Tab. 5 zu sehen ist, hat die Zelllinie 1 mit einer Fallzahl von 18 in 4 Fällen (22,22 %) keinen Tumor ausgebildet. In 7 Fällen und damit 38,89 % der Fälle wurde 1 Tumor ausgebildet. 11,11 % der Mäuse haben in je 2 Fällen 3 oder 4 Tumore entwickelt. Bei einer Gesamtanzahl von 87,1 % auswertbaren Messwerten und absolut 31 Messwerten ist dieser Anteil erheblich.

Die Imagegröße zeigt im Mittel einen Wert von 52,94 mm² und liegt damit an zweiter Stelle hinter der Zelllinie 2. Die Standardabweichung beträgt 77,65. Hier wird eine mittlere Intensität von 208,52 ph/s gemessen mit einem messbaren Minimum von 73,01 und einem Maximum von 827,30 ph/s (Tab. 7).

III.2.2 Zelllinie MDA 468 „Wild type“ (WT)

Wie Tab. 5 zu entnehmen ist, bildet Zelllinie 2 mit insgesamt 17 Tumoren die größte Tumoranzahl aus. In einem Fall bzw. 5,56 % wurde kein Tumor ausgebildet. In 10 Fällen bzw. 55,56 % haben die Mäuse 1 Tumor, in 7 Fällen bzw. 38,89 % 2 Tumore ausgebildet. Es konnten 24 von 25 Messungen ausgewertet werden (96,0 %). Mit einer durchschnittlichen Imagegröße von 70,10 mm² pro Tumor und einer Standardabweichung von 77,56 bildet die Zelllinie 2 die größten Tumore aus. Die mittlere Intensität in Tab. 7 beträgt 251,57 ph/s. Das messbare Minimum und Maximum liegen bei Werten von 78,54 und 1.148,12 ph/s.

III.2.3 Zelllinie MDA 468 „Suppressed“ (Supp.)

Die absolute Fallzahl der Zelllinie 3 beläuft sich auf 9, wie in den Tab. 5 dargestellt. Die Messwert-Anzahl von 12, bei 66,7 % verwendbarer Daten liefert das Ergebnis, dass in 4 Fällen bzw. 44,44 % kein Tumor, in 3 Fällen bzw. 33,33 % der Fälle 1 Tumor ausgebildet wird, in jeweils einem Fall bzw. 11,11 % der Fälle jedoch 2 oder 3 Tumore ausgebildet werden. Eine Tumoranzahl von 4 Tumoren pro Maus wird nicht erreicht. Die Imagegröße der Tumore im Mittel liegt bei 31,01 mm² mit einer geringen Standardabweichung von 45,55, wobei der geringe Median von 3,8 auffällt. Sie bildet unter den MDA Zelllinien die zweitkleinsten Tumore aus. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien zeigt die Zelllinie 3 die größte Differenz zwischen messbarem Minimum und Maximum in der mittlere Intensität, in Tab. 7 aufgezeigt. Das Minimum liegt bei 79,76 und das Maximum bei 721,72 ph/s.

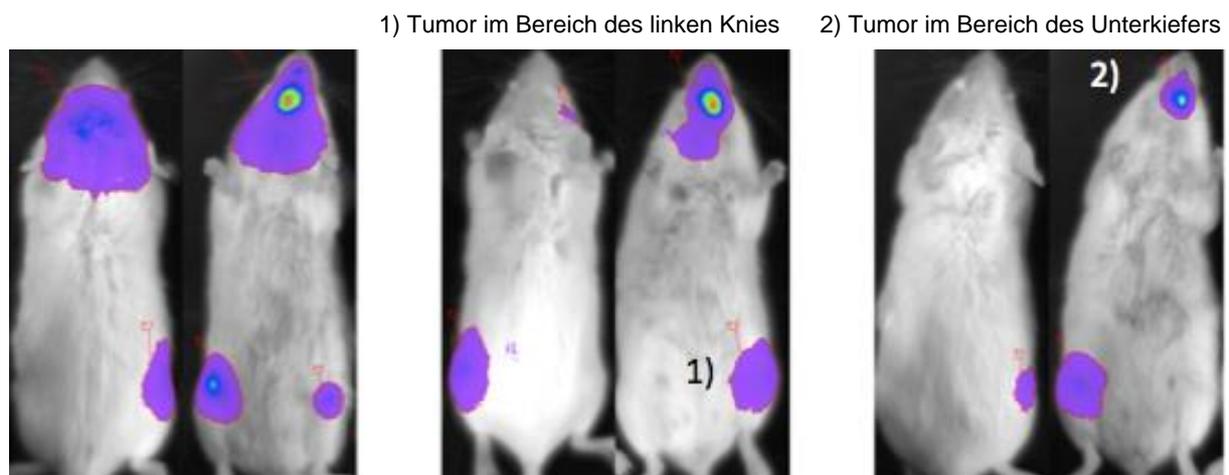
III.2.4 Zelllinie „BT-20“

Leider haben wir in der Versuchsreihe mit den BT-20 Mäusen einen auswertbaren Messwertanteil von nur 41,18 %, bei insgesamt 17 Messergebnissen. In nur 7 von 17 Messungen konnten Tumoren detektiert werden. In 10 Fällen bzw. 83,33 % konnte kein Tumor nachgewiesen werden. In 2 Fällen bzw. 8,33 % wurden 3 oder 4 Tumore pro Maus ausgebildet. Dies ist bei der großen Anzahl an nicht detektierbaren Tumoren kritisch zu betrachten. Die Zelllinie BT-20 bildet mit einer Imagegröße von durchschnittlich 18,95 mm² die kleinsten Tumore aus. Hervorzuheben ist hier die ebenfalls geringe Standardabweichung von 38,01. Die mittlere Intensität beträgt 44,59 ph/s sowie minimal messbar 76,01 und maximal 157,74 ph/s.

III.3 Verteilung der Tumoren nach anatomischer Lage

Die Verteilung der Tumoren kann unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet werden. Die anatomische Verteilung bezieht sich auf die in der Bildgebung abgebildeten Körperregionen der Mäuse und entspricht einer Projektion der detektierten Areale, unter dem Luminographen, auf die Körperoberfläche der Maus. Hierbei wird durch eine Vorder- und eine Rückseitenaufnahme ein zweidimensionales Bild erzeugt. Tritt z.B. ein Tumor im Bereich des Knies auf, bezeichnen wir die anatomische Lage als „Knie“, wohingegen ein Auftreten im Bereich der Schulter als „Schulter“ bezeichnet wird, wie Abb. 9 exemplarisch darstellt.

Abbildung 9: exemplarische Darstellung der Tumorbildung der Zelllinie 2 in der Biolumineszenz Bildgebung in der 4. Woche



In Tab. 9 sieht man die Aufschlüsselung der Verteilung der Tumoren anhand der einzelnen, wie vorher beschriebenen Zelllinien 1 - 4, nach anatomischer Lage, in Prozentwerten. Die anatomische Lage wurde anhand der Projektion der anatomischen Strukturen in der Luminographie nach deren wahrscheinlichstem Ursprung gewählt und umfasst 8 Kategorien sowie „kein Tumor“. Die Kategorie Lymphknoten bezeichnet alle Areale, die nicht eindeutig einer anderen anatomischen Struktur zuordenbar sind. Im Kapitel Diskussion wird näher auf die Problematik eingegangen, da SCID beige Mäuse nur rudimentär ausgebildete Lymphknoten besitzen. Deshalb ist fraglich, ob Lagebezeichnung und Gewebestruktur übereinstimmen. Die Bezeichnung soll für den Ergebnisteil vorerst beibehalten werden. Die Lokalisation „Schädel“ bezeichnet ein Auftreten des Tumors im Bereich

der Schädelkalotte. Die zusätzliche Bezeichnung „Gehirn“ konnte gewonnen werden, indem direkt nach der Euthanasie der Maus der Schädel eröffnet wurde und die luminographische Bildgebung am eröffneten Schädel ein Signal im Bereich des Gehirns zeigte.

Tabelle 9: Verteilung der Tumoren nach anatomischer Lage

		Gesamt	Zelllinie			
			1	2	3	4
			MDA 468 „bone“	MDA 468 „wt“	MDA 468 „supp.“	BT-20
kein Tumor	%	22,4%	12,9%	4,0%	33,3%	58,8%
	N	19	4	1	4	10
Gehirn	%	2,4%	3,2%		8,3%	
	N	2	1		1	
Herz	%	8,2%	6,5%	4,0%		23,5%
	N	7	2	1		4
Lymphknoten	%	38,8%	51,6%	44,0%	50,0%	
	N	33	16	11	6	
Knie	%	9,4%	12,9%	16,0%		
	N	8	4	4		
Lunge	%	10,6%		24,0%		17,6%
	N	9		6		3
Schulter	%	4,7%	9,7%		8,3%	
	N	4	3		1	
Schädel	%	1,2%	3,2%			
	N	1	1			
Wirbelsäule	%	2,4%		8,0%		
	N	2		2		
Gesamt	%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	N	85	31	25	12	17

Die in Tab. 9 aufgetragenen Werte zeigen eine auffallende Häufung der Tumoren im Bereich der Hals-Lymphknoten der Zelllinien 1 bis 3. Mit Prozentanteilen für „Lymphknoten“ von 51,6 % für Zelllinie 1, 44,0 % für Zelllinie 2 sowie 50,0 % der Zelllinie 3, macht diese Gruppe den größten Anteil an ausgebildeten Tumoren aus mit insgesamt 38,8 %.

Den zweitgrößten Anteil nimmt die Gruppe „kein Tumor“ ein, mit 22,4 %. Hierbei haben 12,9 % der Zelllinie 1, 4,0 % der Zelllinie 2, 33,3 % der Zelllinie 3 und 58,8% der Zelllinie 4 keinen Tumor ausgebildet. Die Lokalisation „Lunge“ bildet die dritthäufigsten Tumoren aus mit insgesamt 10,6 %. Hierbei konnten in 24,0 % der

Zelllinie 2 und in 17,6 % der Zelllinie 4 Tumoren detektiert werden, die Zelllinien 1 und 3 bildeten keine Tumoren im Bereich der Lunge aus.

Die Lokalisation „Herz“ mit insgesamt 8,2 % ist ebenso wie die Lokalisation „Lunge“ kritisch zu betrachten und wird im Kapitel Diskussion besprochen. Die Zelllinie 4 bildet mit 23,5 % auffallend viele Tumoren im Bereich „Herz“ aus gefolgt von 6,5 % für Zelllinie 1 und 4,0 % für Zelllinie 2.

Im Folgenden werden die Lokalisationen im Bereich der Knochen beschrieben, welche sich in die Kategorien „Knie“, „Schulter“, „Schädel“ und „Wirbelsäule“ aufteilen.

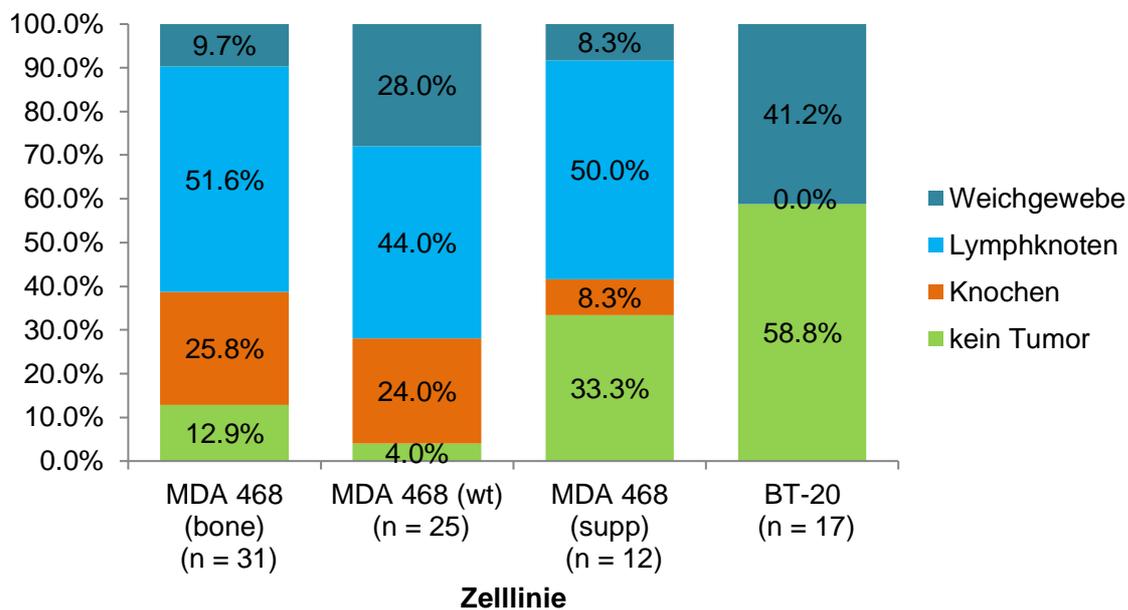
Die Gruppe „Knie“ bildet den größten Anteil an Tumoren im Bereich der Knochen mit insgesamt 9,4 % aus. Zelllinie 1 bildete in 12,9 % und Zelllinie 2 in 16,0 % Tumoren im Bereich des Knies aus. Bei den Zelllinien 3 und 4 konnte dies nicht beobachtet werden.

Die Kategorie „Schulter“ hat einen Anteil von insgesamt 4,7 %. Zelllinie 1 bildete in 9,7 % und Zelllinie 3 in 8,3 % Knochentumoren im Bereich der Schulter aus. Die Lokalisation „Wirbelsäule“ trägt nur einen geringen Anteil zu den Knochentumoren bei mit insgesamt 2,4 %. Wirbelsäulentumoren traten nur bei Zelllinie 2 auf mit einem Anteil von 8,0 %. Ebenso trat nur ein Tumor (3,2 %) bei Zelllinie 1 im Bereich des Schädels auf, welcher einen gesamten Anteil von 1,2 % ausmacht. In einem weiteren Fall konnte die Lokalisation „Schädel“ als „Gehirn“ spezifiziert werden, da nach Eröffnung der Schädelkalotte ein Signal im Bereich des Gehirns detektierbar war.

III.4 Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp

Die Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp, dargestellt in Abb. 10, umfasst die großen 3 Kategorien „Knochen“, „Lymphknoten“, „Weichgewebe“ sowie „kein Tumor“. Diese fassen die vorherige Kategorisierung nach anatomischer Lage teilweise zusammen. Die Kategorien „Herz“ und „Lunge“, werden zur Gruppe der „Weichgewebe“ gezählt. Diese Kategorisierung wird im Kapitel Diskussion eingehend besprochen, da hier von Fehlinjektionen ausgegangen werden muss (siehe Abschnitt 4.1.2).

Abbildung 10: Verteilung der Tumoren anhand des Gewebetyps



In den Zelllinien 1-3 zeigt sich eine überproportionale Häufung an Tumoren im Bereich der „Lymphknoten“, die Zelllinie 4 bildet keine Tumoren im Bereich der „Lymphknoten“ aus. Zelllinie 1 steht mit 51,6 % an erster Stelle, gefolgt von Zelllinie 3 mit 50,0 % und Zelllinie 2 mit 44,0 %.

Wie zu erwarten, zeigt die Zelllinie 1 mit 25,8 % den größten Anteil an Tumoren im Bereich der Knochen. Darauf folgen die Zelllinien 2 mit 24,0 % und Zelllinie 3 mit 8,3 % an Tumoren im Bereich der Knochen. Die Gruppe „Weichgewebe“ bildet eine spezielle Untergruppe der Gewebetypen, da hier eine große Variabilität und Unterschiedlichkeit von Gewebearten herrscht.

Die Gruppe der „Weichgewebe“ umfasst 41,2 % der Tumoren der Zelllinie 4 und alle Tumoren die ausgebildet wurden, was im Umkehrschluss bedeutet, dass diese Zelllinie keine Tumoren im Bereich der Knochen ausgebildet hat. Die Zelllinien 1-3 bilden im Vergleich einen geringen Anteil an Tumoren im Bereich der „Weichgewebe“ aus, Zelllinie 1 in 9,7 %, Zelllinie 2 in 28,0 % und Zelllinie 3 in 8,3 % der Fälle.

Tabelle 10: Auswertung Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp

Chi-Quadrat-Test p = 0,000		Zelllinie				
		Gesamt	MDA 468 (bone)	MDA 468 (wt)	MDA 468 (supp)	BT-20
kein Tumor	Prozent	22,4%	12,9%	4,0%	33,3%	58,8%
	Anzahl	19	4	1	4	10
Chi-Quadrat-Test p = 0,069		Zelllinie				
		Gesamt	MDA 468 (bone)	MDA 468 (wt)	MDA 468 (supp)	BT-20
Knochen	Prozent	17,6%	25,8%	24,0%	8,3%	0,0%
	Anzahl Tumoren	15	8	6	1	0
Chi-Quadrat-Test p = 0,001		Zelllinie				
		Gesamt	MDA 468 (bone)	MDA 468 (wt)	MDA 468 (supp)	BT-20
Lymphknoten	Prozent	38,8%	51,6%	44,0%	50,0%	0,0%
	Anzahl Tumoren	33	16	11	6	0
Chi-Quadrat-Test p = 0,040		Zelllinie				
		Gesamt	MDA 468 (bone)	MDA 468 (wt)	MDA 468 (supp)	BT-20
Weichgewebe	Prozent	21,2%	9,7%	28,0%	8,3%	41,2%
	Anzahl Tumoren	18	3	7	1	7
	N	85	31	25	12	17

Die Auswertung nach Gewebetyp (Tab. 10) ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Zelllinien für den Fall „kein Tumor“ mit $p = 0,000$ im Chi-Quadrat-Test. Dies ist hauptsächlich induziert durch die Zelllinie 4, mit einem Anteil von 58,8 % „kein Tumor“.

Betrachtet man das Auftreten von Tumoren im Bereich der Knochen zeigt sich im Chi-Quadrat Test mit $p = 0,069$ ($n = 85$) kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien, obwohl die Zelllinien 1 und 2 deutlich mehr Knochentumore ausbilden als die Zelllinien 3 und 4. Trotzdem hebt sich die Zelllinie 4 von den anderen Zelllinien ab, da diese keine Tumoren im Bereich der Knochen ausbildet.

In Bezug auf die Prävalenz von Tumoren im Bereich der Lymphknoten zeigen die 3 MDA-Zelllinien eine große Ähnlichkeit mit einem Prozentanteil von 44,0 % – 51,6 %. Die Zelllinie 4 hebt sich deutlich von den anderen Zelllinien ab da hier ebenfalls kein Tumor im Bereich der Lymphknoten detektierbar war. Die Unterschiede sind mit $p = 0,001$ im Chi-Quadrat-Test ($n = 85$) signifikant.

Deutlich erhöht zeigt sich hingegen die Prävalenz für Tumoren im Bereich der Weichgewebe für Zelllinie 4 mit 41,2 %. Die MDA-Zelllinien unterscheiden sich nur geringfügig. Die Unterschiede zwischen den Zelllinien 1-4 sind insgesamt knapp signifikant (p -Wert = 0,040, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$).

Insgesamt zeigt sich auch hier eine Tendenz zur Ähnlichkeit zwischen den Zelllinien 1-3 und einer Abhebung der Zelllinie 4.

III.4.1 Zusammenfassung Zelllinien und Messunterschiede

Tabelle 11: Zusammenfassung Zelllinien

	Zelllinie			
	1	2	3	4
	MDA 468 „bone“	MDA 468 „wt“	MDA 468 „supp.“	BT-20
Mäuse gesamt	18	18	9	12
ohne Tumor	4 (22,2%)	1 (5,6%)	4 (44,4%)	10 (83,3%)
Ein Tumor	7 (38,9%)	10 (55,6%)	3 (33,3%)	0 (0%)
> 1 Tumor	7 (38,9%)	7 (38,9%)	2 (22,2%)	2 (16,7%)
Durch. Anz. Tumoren, Tumor ja	1,9	1,4	1,6	3,5
Durch. Anz. Tumoren, alle	1,5	1,3	0,89	0,58
Messungen				
Anzahl Tumoren	27	24	8	7
Anzahl Messungen	31	25	12	17
Tumorgröße				
Mediane Imagegröße	18,2	39,2	3,8	0,0
Mediane durchschnittliche Intensität	150,5	141,6	95,7	0,0
Gewebetyp				
kein Tumor	12,9%	4,0%	33,3%	58,8%
Knochen	25,8%	24,0%	8,3%	0,0%
Lymphknoten	51,6%	44,0%	50,0%	0,0%
Weichgewebe	9,7%	28,0%	8,3%	41,2%

Insgesamt lassen sich deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien erkennen. Die Zelllinien 1-3 zeigen ein relativ homogenes Verhalten in Bezug zu Anzahl der Tumoren, Imagegröße und Verteilung nach Gewebetyp. Tumoren im Bereich der Lymphknoten und Knochen überwiegen und die Anzahl an Mäusen, die keinen Tumor ausgebildet haben, ist gering.

Die Zelllinien 4 hebt sich davon deutlich ab mit signifikanten Unterschieden in Bezug zu Tumorbildung, Verteilung nach Gewebetyp und Tumorgröße: es werden in der Mehrzahl der Fälle keinen Tumoren ausgebildet, werden Tumoren detektiert, finden diese sich im Bereich der Weichgewebe und nicht im Bereich der Knochen.

III.5 Darstellung der Tumoren in Bezug zur EGFR-CNV

Tabelle 12: Auswertung Imagegröße und EGFR-CNV

Kruskal Wallis Test p = 0,001		EGFR-CNV			
		Gesamt	2	10	27
Imagegröße mm ²	Mittelwert	48,09	31,01	18,95	60,60
	Standardabweichung	69,18	45,55	38,01	77,38
	Median	18,23	3,80	0,00	36,24
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maximum	328,34	127,92	137,17	328,34
	N	85	12	17	56

Die Auswertung der verschiedenen EGFR-CNV für die einzelnen Zelllinien (Tab. 12) hat in Bezug zur Imagegröße signifikante Unterschiede ergeben ($p = 0,001$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$). Diese Unterschiede werden im Wesentlichen durch die EGFR-CN 10 der Zelllinie 4 induziert (Tab. 4). Für die beiden EGFR-CN 2 und 27 wurde in einer ergänzenden Analyse die Unterschiede separat geprüft, mit dem Ergebnis, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar sind ($p = 0,072$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$).

In den erhobenen Daten kann somit kein signifikanter Unterschied zwischen den EGFR-CN bzw. den Zelllinien 1-3 nachgewiesen werden, obwohl der Median der Imagegröße von Zelllinie 3 3,8 beträgt und sich damit deutlich von Zelllinie 1 und 2 abhebt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen zur Analyse der Zelllinien. Die Abb. 11 stellt diese Unterschiede graphisch dar.

Abbildung 11: graphische Darstellung Imagegröße und EGFR-CNV

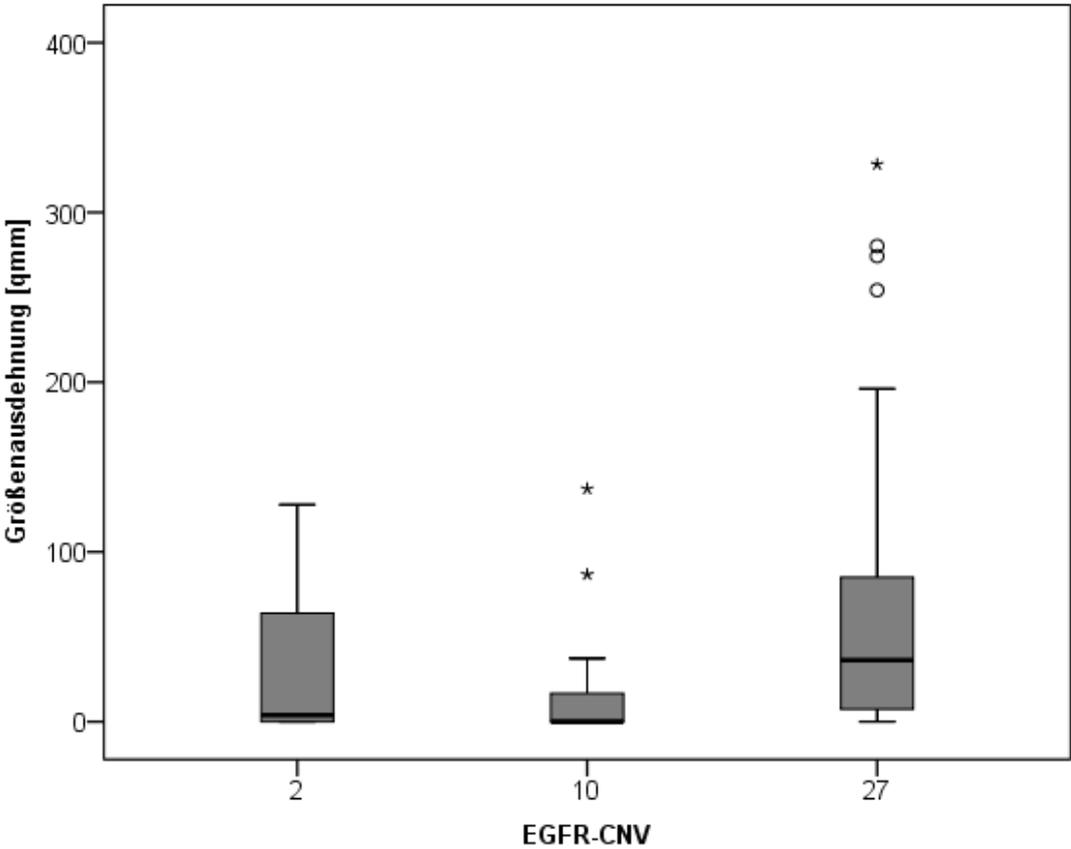


Tabelle 13: Auswertung mittlere Intensität und EGFR-CNV

Kruskal Wallis Test p = 0,000		EGFR-CNV			
		Gesamt	2	10	27
Mittlere Intensität ph/s	Mittelwert	188,55	209,64	44,59	227,74
	Standardabweichung	220,13	264,78	57,22	225,75
	Median	113,91	95,67	0,00	145,64
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maximum	1.148,12	721,72	157,74	1.148,12
	N	85	12	17	56

Die Auswertung bezüglich der mittleren Intensität und der EGFR-CNV (Tab. 13) zeigt signifikante Unterschiede mit $p = 0,000$ im Kruskal-Wallis-Test ($n = 85$). Auch hier werden die wesentlichen Unterschiede durch die Zelllinie 4 induziert. Für die Zelllinien 13-3 wurde in ergänzenden Analysen die Unterschiede separat geprüft, mit dem Ergebnis, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisbar sind ($p = 0,274$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$). Bei genauer Betrachtung zeigt auch hier Zelllinie 3 einen niedrigeren medianen Intensitätswert, diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Abb. 12 stellt diese Unterschiede graphisch dar.

Abbildung 12: graphische Darstellung der mittleren Intensität und EGFR-CNV

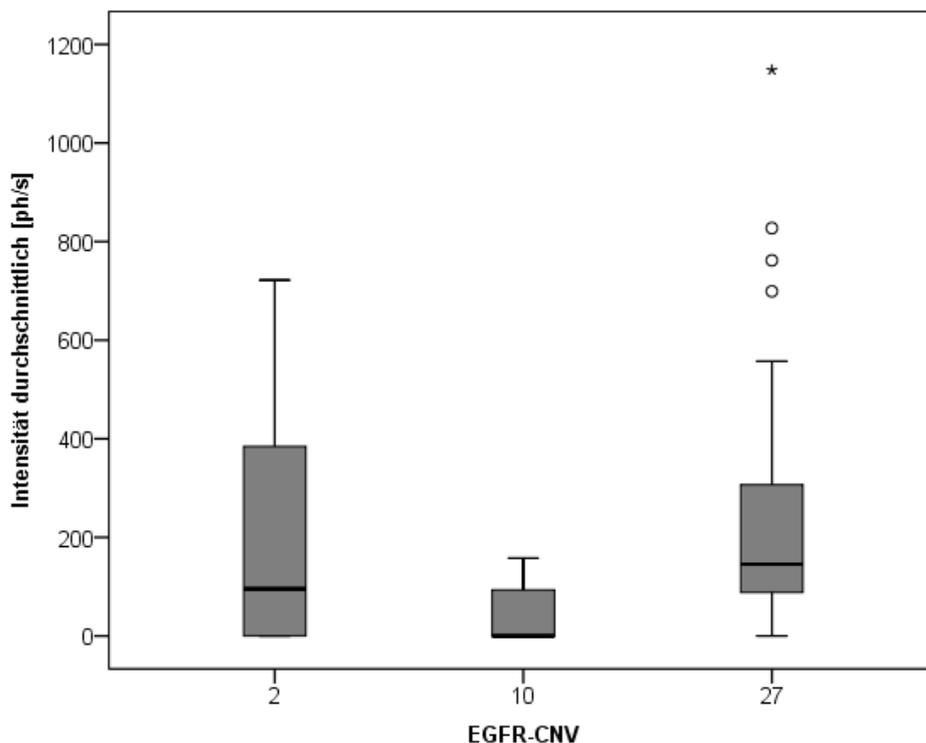


Tabelle 14: Auswertung Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp und EGFR-CNV

Chi-Quadrat-Test $p = 0,000$			EGFR-CNV		
		Gesamt	2	10	27
kein Tumor	Prozent	22,4%	33,3%	58,8%	8,9%
	Anzahl Tumoren	19	4	10	5
Chi-Quadrat-Test $p = 0,027$			EGFR-CNV		
		Gesamt	2	10	27
Knochen	Prozent	17,6%	8,3%	0,0%	25,0%
	Anzahl Tumoren	15	1	0	14
Chi-Quadrat-Test $p = 0,000$			EGFR-CNV		
		Gesamt	2	10	27
Lymphknoten	Prozent	38,8%	50,0%	0,0%	48,2%
	Anzahl Tumoren	33	6	0	27
Chi-Quadrat-Test $p = 0,076$			EGFR-CNV		
		Gesamt	2	10	27
Weichgewebe	Prozent	21,2%	8,3%	41,2%	17,9%
	Anzahl Tumoren	18	1	7	10
	N	85	12	17	56

Die Auswertung zwischen der Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp und EGFR-CNV (Tab. 14) hat signifikante Unterschiede zwischen der Ausbildung von Tumoren bzw. „kein Tumor“ erbracht ($p = 0,000$, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$). Das Auftreten von Tumoren im Bereich der Knochen war ebenfalls signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen EGFR-CNV ($p = 0,027$, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$) sowie das Auftreten von Tumoren im Bereich der Lymphknoten ($p = 0,000$, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$). Induziert wurden die Unterschiede über alle Kategorien durch die EGFR-CN von 10, der Zelllinie 4 entsprechend. Das Auftreten von Tumoren im Bereich der Weichgewebe war zwischen den EGFR-CNV nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,076$, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$). Die graphische Darstellung in Abb. 13 zeigt deutlich die Unterschiede im Auftreten von Tumoren in Bezug zur EGFR-CNV. Zwischen den MDA-Zelllinien kann eine erhöhte Wahrscheinlichkeit zum Auftreten von Knochenmetastasen bei steigender EGFR-CNV beobachtet werden. Dies trifft nicht für die Zelllinie 4 zu. Vergleicht man die EGFR-CNV von 27 und 2 fällt auf, dass in den meisten Fällen Tumoren im Bereich der Lymphknoten auftreten (2 = 50,0 %, 27 = 48,2 %). Vergleicht man diese Häufung nun mit dem Auftreten von Tumoren im Bereich der Knochen der MDA-Zelllinie, zeigt sich eine deutliche Steigerung bei steigender EGFR-CN von 8,3 % für EGFR-CN von 2 und 25,0 % bei EGFR-CN von

27. Die Zelllinie BT-20 zeigt hier ein vollkommen anderes Verhalten und bildet weder Tumoren im Bereich der Knochen noch im Bereich der Lymphknoten aus.

Abbildung 13: Darstellung Gewebetyp und EGFR-CNV

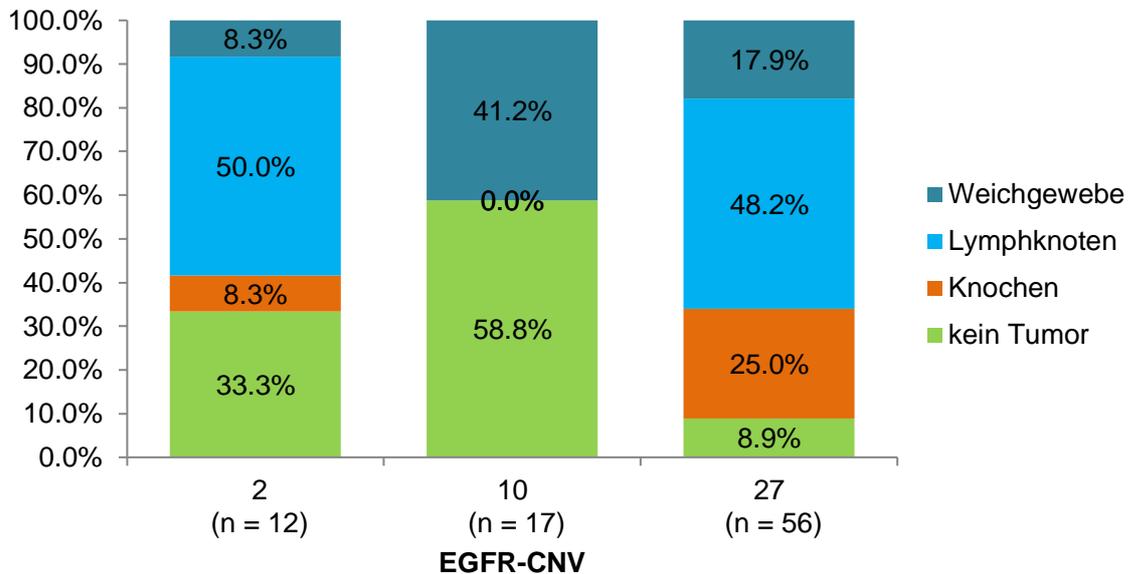


Tabelle 15: Auswertung Anzahl der Tumoren in Bezug zur EGFR-CNV

Kruskal Wallis Test $p = 0,059$		EGFR-CNV			
		Gesamt	2	10	27
Tumor Anzahl	Mittelwert	1,74	1,60	3,50	1,65
	Standardabweichung	0,95	0,89	0,71	0,88
	Median	1,00	1,00	3,50	1,00
	Minimum	1,00	1,00	3,00	1,00
	Maximum	4,00	3,00	4,00	4,00
	N	38	5	2	31

Die Anzahl an Tumoren beträgt im Mittel insgesamt 1,74 mit einer Standardabweichung von 0,95. Stellt man diese in Bezug zur EGFR-CNV (Tab. 15), zeigt sich bei einem knapp nicht signifikanten $p = 0,059$ im Kruskal Wallis Test ($n = 66$) eine Tendenz: je höher die EGFR-CNV, desto höher ist die Anzahl an ausgebildeten Tumoren. Klammert man hierbei die Zelllinie 4 mit einer EGFR-CNV von 10 aus, wird der Zusammenhang noch deutlicher. Im Diskussionsteil wird näher auf die Problematik der Zelllinie 4 eingegangen.

IV Diskussion

IV.1 Methodenkritik

IV.1.1 Tiermodell

Aufgrund von Interspeziesunterschieden sind die an Tiermodellen untersuchten Sachverhalte nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar. Die Verwendung von humanen Brustkrebszellen lässt zwar auf das Verhalten der Krebszellen im menschlichen Organismus schließen und stellt sicherlich einen großen Vorteil dar, sollte aber in weiteren Studien auf die Übertragbarkeit auf das humane metastasierte Mammakarzinom hin überprüft werden. Zudem sollte beachtet werden, dass aufgrund von ethischen Aspekten nur kleine Fallzahlen im Tierexperiment möglich sind, was auch im Falle unserer Ergebnisse, mit den aufgetretenen Verlusten, kritisch zu beachten ist.

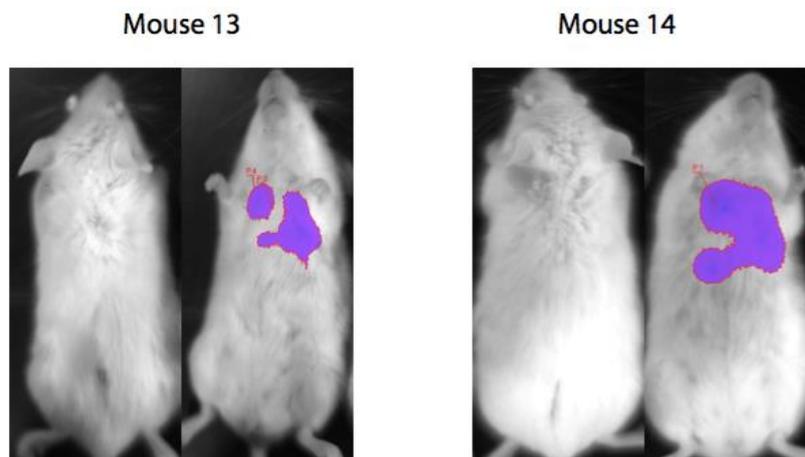
IV.1.2 Intracardiale Zellinjektion und Images im Bereich „Herz“ und „Lunge“

Die Injektion der Mammakarzinomzellen in den linken Ventrikel der Mäuse erfolgte unter sonografischer Kontrolle. Hierbei wird die Tumorzellpassage durch das Blut während der hämatogenen Metastasierung simuliert. Diese entspricht jedoch nicht dem Vorgang der Metastasierung ausgehend von einem Primärtumor, mit Absiedlung von metastasierenden Tumorzellen ins Gefäßsystem. Im Hinblick auf die Häufung von Tumoren im Bereich des Herzens und der Lunge, mit einer Tendenz zur Tumorausbildung im Bereich der linken Thoraxseite, muss von einer teilweisen Fehlinjektion ausgegangen werden. Die Darstellung in Abb. 14 zeigt exemplarisch die Akzentuierung der linken Thoraxseite sowie die Projektion der Metastasen auf das Herz bzw. die linke Lunge. Zum einen könnte es bei der intracardialen Zellinjektion zur direkten Durchstechung des Herzens mit Penetration des linken Lungenflügels gekommen sein, was zur Ausbildung der Lungenmetastasen geführt haben könnte, zum anderen könnte es zum Einstich in das Herzmuskelgewebe gekommen sein mit Verschleppung und Festsetzung von Mammakarzinomzellen im Stichkanal. Wie in Tab. 9 dargestellt, betrifft dies die Zelllinien 1, 2 und 4 mit einem Gesamtanteil von „Herz“ mit 8,2 % und „Lunge“ mit 10,6 %. Betrachtet man die einzelnen Zelllinien genauer, zeigt sich ein relativ geringer Anteil an vermutlichen

Fehlinjektionen bei den Zelllinien 1 und 2. Zelllinie 4 hat mit einem Anteil an „Herz“ von 23,5 % und „Lunge“ von 17,6 % den höchsten Anteil an der Fehlinjektionsquote. Die Zelllinie 2 mit einem Anteil von 4,0 % „Herz“ und 24,0 % „Lunge“, weist die zweithöchste Rate an fehlinjizierten Zellen auf. Kritische Werte zeigt auch Zelllinie 1 mit einem Anteil von 6,5 % „Herz“. Zelllinie 3 zeigt kein Auftreten von Tumoren im Bereich von Herz und Lunge.

Würde sich die Vermutung bestätigen, wären 100% der messbaren Tumoren der Zelllinie 4 Fehlinjektionen, mit einer absoluten Anzahl von 2/12 Injektionen und 7/17 Messungen (Tab. 5). Die übrigen 10 Mäuse bildeten keine Tumoren aus. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich jedoch keine definitive Aussage dazu treffen, da die Bildgebung eine reine Projektion der Tumoren auf die Körperoberfläche der Mäuse darstellt. Für eine genauere Lokalisation der Metastasen müsste das in Projektionslinie gelegene Gewebe schichtweise abgetragen werden oder eine mehr als zweidimensionale Bildgebung zur Verifizierung der anatomischen Lage erfolgen. Zur endgültigen Sicherung des Ergebnisses sollte in einer histologischen Aufarbeitung die Entität eindeutig geklärt werden.

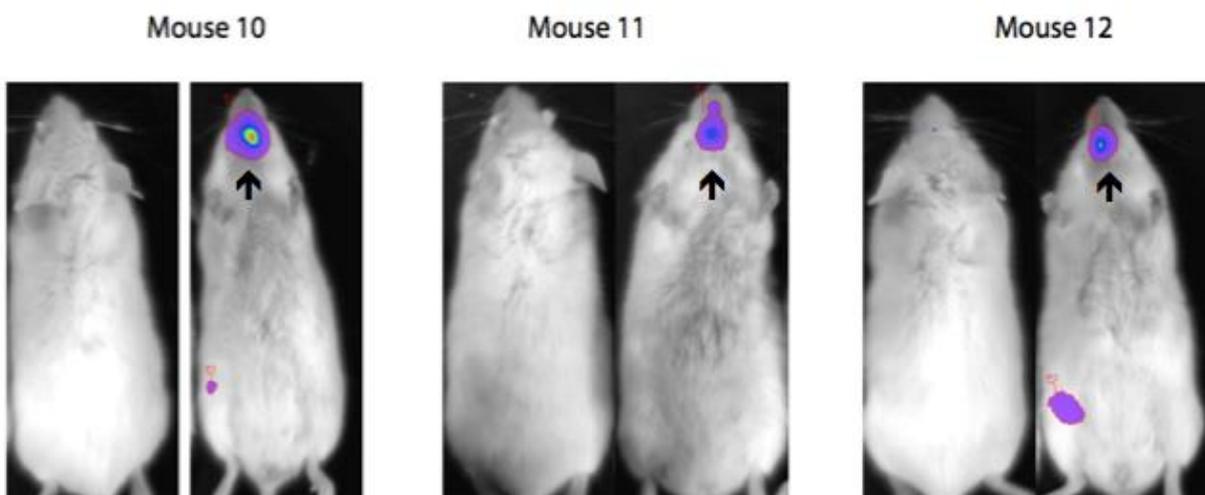
Abbildung 14: zweidimensionale Bildgebung mittels NightOWL-Luminographen nach 4 Wochen der Zelllinie 2



IV.1.3 Images im Bereich „Lymphknoten“

In der Bildgebung mittels NightOWL-Gerät kann lediglich eine Projektion der fluoreszierenden Areale auf der Körperoberfläche der Mäuse dargestellt werden. Ohne weitere chirurgische Maßnahmen oder eine dritte Ebene in der Bildgebung ist eine genauere Lokalisation der Tumoren bzw. des betroffenen Gewebes nicht möglich (siehe Kapitel 4.1.2.). Die anfängliche Annahme, bei den fluoreszierenden Arealen im Bereich des Unterkiefers handele es sich um nodales bzw. lymphatisches Gewebe, musste im Verlauf der Auswertung revidiert werden. Da die SCID beige Maus nur rudimentär ausgebildete Lymphknoten besitzt, kann hier nicht von einem derart ausgeprägten Lymphknotenbefall durch Tumorzellen ausgegangen werden, wie in Abb. 15 erkennbar. Die SCID beige Maus besitzt zwar sehr wenig follikuläres Lymphknotengewebe, aufgrund der Immundefizienz und der fehlenden Lymphozyten befinden sich jedoch keine Zellen in den Follikeln [49]. Da die Kategorie „Lymphknoten“ im Gesamten 38,8 % aller detektierten Tumoren beträgt (Tab. 9), kann dieser Anteil nicht vernachlässigt werden.

Abbildung 15: exemplarische Darstellung der Tumore im Bereich des Unterkiefers (Pfeil) bei Mäusen der Zelllinie 2 in der 4. Woche

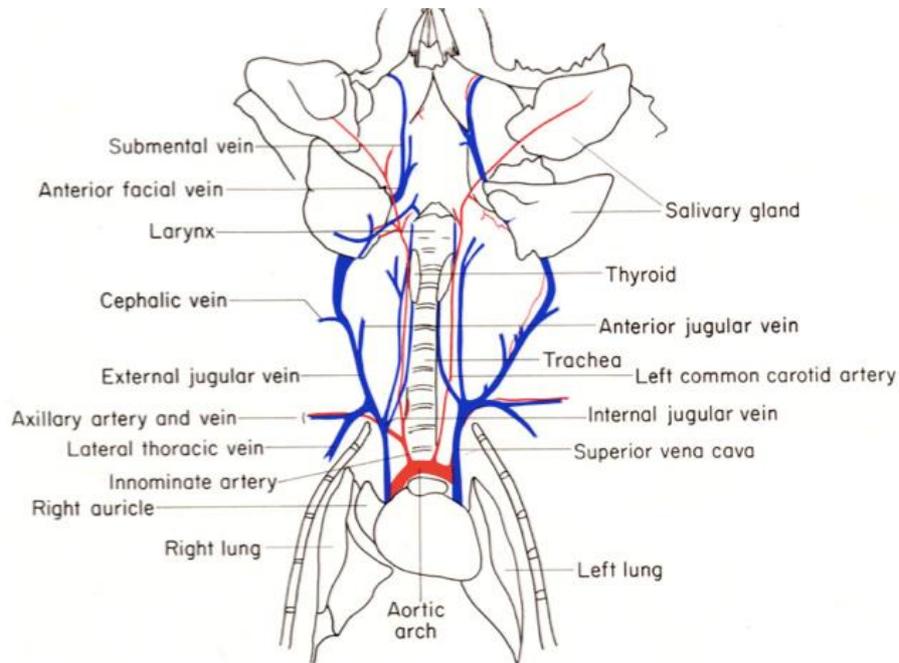


In Abb. 16 ist die genaue Gefäßversorgung im Halsbereich von Mäusen dargestellt [50]. Auffallend sind die enorme Dichte an Blutgefäßen zum Unterkiefer (Mandibula) führend sowie der Abgang der Gefäße direkt vom Aortenbogen. Somit erhärtet sich

der Verdacht, es könnte sich um Tumoren im Bereich des Unterkieferknochens, also der Mandibula handeln. Young Sun Hwang et al. hat 2015 bereits beschrieben, dass es bei intracardial applizierten MDA-MB-231^{Luc+} Brustkrebszellen in den meisten Fällen zu einer mandibulären Ansiedelung von Tumorzellen kommt. Auch hierbei wurde eine Bildgebung, ähnlich der des NightOWL-Geräts, zur Detektion von Fluoreszenz angewendet, welche ein vergleichbares Bild lieferte. In CT-Analysen und histologischer Aufarbeitung besagter Areale konnten, 6 Wochen nach Injektion, osteolytische Tumorherde im Bereich des Unterkiefers nachgewiesen werden [51]. Speziell TNBC siedeln drei Mal häufiger im Bereich des Unterkiefer an als jeder andere bösartige Tumor [52]. Warum dieser Bereich für eine Ansiedelung von Tumorzellen, insbesondere beim Mammakarzinom, prädisponiert ist, bleibt weiterhin fraglich. Die Ansiedlung im Mausmodell kann am ehesten durch die Kombination aus guter Blutversorgung und erhöhter Belastung im Bereich der Kieferknochen während des Kauens (Nagetiere) erklärt werden.

Eine Studie von B. Söder et al. geht von einem Zusammenhang zwischen Parodontitis und dem Auftreten von Brustkrebs mit Tumorwachstum im Unterkiefer aus [53]. Eine andere Herangehensweise haben G. Kumar et al. beschrieben. Sie gehen von einer Anziehung der Tumorzellen durch eine erhöhte Teilungsrate von rotem Knochenmark aus. Dieses wird im Unterkiefer bei Erwachsenen vor allem in den hinteren Anteilen gefunden. Jedoch besitzt auch das Weichgewebe im Mundraum eine große Anzahl an kleinsten Blutgefäßen, welche ein Wachstum von Tumorzellen im Bereich der Mundschleimhaut begünstigen würden. Proliferation und Inflammation stellen somit Reize, bzw. begünstigende Bedingungen für eine mögliche Ansiedlung von Tumorzellen dar [54].

Abbildung 16: Darstellung der Blutgefäße des Halses in Mäusen [50]



100. Blood vessels of the neck.

In Zusammenschau der oben erhobenen Interpretationen und Ergebnisse, behalten wir den Terminus „Lymphknoten“ bei, da nicht sichergestellt werden kann, wo der Ursprung der Tumoren liegt. Eine kritische Hinterfragung ist jedoch gerechtfertigt und weitere Studien sollten folgen, um die Frage nach Ansiedelung von Tumorzellen in Mundhöhle bzw. Unterkiefer zu klären, um etwaige Mechanismen besser verstehen zu können.

IV.2 Diskussion der Ergebnisse

In den Tierversuchen wurden 4 unterschiedliche Zelllinien humaner Mammakarzinomzellen verwendet, wobei 1-3 Abkömmlinge der MDA-Zelllinie darstellen und Zelllinie 4 des BT-20-Klons angehört. Dies stellt eine gute Ausgangslage für die Anwendbarkeit der Experimente beim Menschen dar. Nach intracardialer Injektion der Mammakarzinomzellen konnte die Detektion der manifesten Tumoren mittels Biolumineszenzmessung mit dem NightOwl-Gerät erfolgen. Hierdurch war eine quantitative sowie qualitative Auswertung des Tumorwachstums nach 8 Wochen möglich, was Rückschlüsse auf das Metastasierungsverhalten von Mammakarzinomzellen zulässt.

Die in 60 Mäusen injizierten 4 unterschiedlichen Zelllinien führten bei 57 Mäusen (3 starben) zu insgesamt 85 auswertbaren Messungen. Davon konnte in 66 Messungen Tumorgewebe detektiert werden, was einem Prozentsatz von 77,65 % entspricht. Es wurden maximal 4 Tumoren pro Maus ausgebildet. 35,09 % der Mäuse haben 1 Tumor, 12,3 % der Mäuse 2, 7,02 % 3 Tumoren und 5,26 % 4 Tumoren ausgebildet. Insgesamt bildet Zelllinie 4 weniger häufig Tumoren aus. In 83,33 % der Fälle konnte kein Tumor detektiert werden (Tab. 5). Auffallend ist die Häufung von Tumoren bei der Zelllinie 4 mit 3 mit 4 Tumoren in 2 von 10 Mäusen. Betrachtet man die Verteilung nach anatomischer Lage (Tab. 9), handelt es sich um Tumoren der Lokalisation „Herz“ und „Lunge“, welche bereits im Unterpunkt 4.1.2 diskutiert wurden. Da hier von Fehlinjektionen ausgegangen werden muss, wäre ein neuer Versuch mit einer größeren Fallzahl sowie einer ggf. verbesserten Injektionstechnik durchzuführen. Streng genommen können diese Ergebnisse der Zelllinie 4 daher nicht verwertet werden.

Die Auswertung der Imagegröße der einzelnen Tumoren ergibt einen signifikanten Zusammenhang im Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,001$, $n = 85$) wie in Tab. 6 dargestellt. Diese Unterschiede werden im Wesentlichen durch die Zelllinie 4 induziert (Abb. 7). Eine ergänzende, separate Analyse der Zelllinien 1-3 ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,075$, Kruskal-Wallis-test, $n = 68$). In Bezug zur EGFR-CNV zeigt sich ebenfalls ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Imagegröße und EGFR-CNV ($p = 0,001$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$). Auch hier werden die Unterschiede wieder durch die Zelllinie 4 mit einer EGFR-CNV von 10 induziert. Auch wenn in der Analyse der Zelllinien 1-3 kein signifikanter Unterschied

zwischen Imagegröße und EGFR-CNV dargestellt werden konnte ($p = 0,072$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 68$) zeigt sich eine deutliche Tendenz: je höher die EGFR-CNV, desto wahrscheinlicher wird ein größerer Tumor detektiert.

Auch die gemessene Intensität in ph/s zeigt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien mit Ursprung in der Zelllinie 4 ($p = 0,000$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$). Die separate Analyse der Zelllinien 1-3 ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Intensität ($p = 0,513$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 68$).

Trotzdem zeigt Zelllinie 3 einen deutlich niedrigeren Median von 95,67 im Vergleich zu Werten zwischen 141,60 – 150,51 der Zelllinien 1 und 2 (Tab. 7). Die Auswertung der Intensität verglichen mit der EGFR zeigt insgesamt ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p = 0,000$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 85$). Die ergänzende Analyse der MDA-Zelllinien erbrachte kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0,274$, Kruskal-Wallis-Test, $n = 68$). Jedoch zeigt sich wieder die Tendenz zu einer höheren Intensität bei steigender EGFR-CNV.

Korreliert man nun Imagegröße und Intensität (Tab. 8), zeigt sich ein starker Zusammenhang zwischen den beiden Parametern mit $Rho = 0,865$ für die mittleren Intensität und $Rho = 0,974$ für die gesamte Intensität.

Die Verteilung der Tumore nach anatomischer Lage, in 8 unterschiedliche Kategorien aufgeteilt, zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien. Es zeigt sich eine Häufung der Tumoren im Bereich der „Lymphknoten“ der Zelllinien 1-3 mit einem Gesamtanteil von 38,8 %. Zelllinie 4 bildet keine Tumoren in diesem Bereich aus. Zelllinie 1 bildet in 51,6 %, Zelllinie 2 in 44,0 % und Zelllinie 3 in 50,0 % Tumoren im Bereich der „Lymphknoten“ aus. Auf die Problematik der Lymphknotenmanifestation im Bereich des Halses wurde bereits im Unterpunkt 4.1.3 eingegangen. Den zweitgrößten Anteil nimmt die Gruppe „kein Tumor“ ein mit insgesamt 22,4 %.

Hierbei haben 12,9 % der Zelllinie 1, 4,0 % der Zelllinie 2, 33,3 % der Zelllinie 3 und 58,8% der Zelllinie 4 keinen Tumor ausgebildet. Die Lokalisationen „Lunge“ mit 10,6 % und „Herz“ mit insgesamt 8,2 % wurden bereits im Unterpunkt 4.2.1 besprochen.

Die Tumoren im Bereich der Knochen umfassen hauptsächlich die Kategorien „Knie“ mit insgesamt 9,4 % und „Schulter“ mit 4,7 % wobei eine Häufung dieser Lokalisation in den Zelllinien 1 und 2 zu beobachten ist.

Die Aufschlüsselung der Verteilung nach Gewebetyp umfasst die 3 Kategorien „Knochen“, „Lymphknoten“, „Weichgewebe“ und fassen die vorherigen Kategorien teils zusammen (Abb. 10). Die Zelllinien 1-3 zeigen eine deutliche Häufung an

Tumoren im Bereich der „Lymphknoten“, Zelllinie 4 bildet dort keine Tumoren aus. Zelllinie 1 - 3 bildet zwischen 44,0 – 51,6 % Tumoren im Bereich der Lymphknoten aus. Zelllinie 1 bildet, wie zu erwarten, mit 25,8 % den größten Anteil an Tumoren im Bereich der Knochen aus. In absteigender Reihenfolge bilden die Zelllinien 2 und 3 weniger Tumoren und Zelllinie 4 keine Tumoren im Bereich der Knochen. Die Kategorie „Weichgewebe“ umfasst 41,2 % der Tumoren der Zelllinie 4, auf diese Problematik wurde bereits in Kapitel 4.1.2 eingegangen.

Die Auswertung bezüglich der Verteilung nach Gewebetyp zeigt deutliche Unterschiede auf (Tab. 14). Ein signifikanter Unterschied konnte sowohl für „kein Tumor“ ($p = 0,00$, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$), „Lymphknoten“ ($p = 0,001$, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$) sowie „Weichgewebe“ ($p = 0,040$, Chi-Quadrat-Test, $n = 85$) gefunden werden. Die Kategorie „Knochen“ zeigt mit $p = 0,069$ (Chi-Quadrat-Test, $n = 85$) ein nicht signifikantes Ergebnis, jedoch bilden die Zelllinien 1 und 2 deutlich mehr Tumoren im Bereich der Knochen aus als die Zelllinien 3 und 4. Diese Ergebnisse korrelieren zudem mit der Auswertung der Verteilung nach Gewebetyp und der EGFR-CNV. Für die Kategorien „kein Tumor“, „Knochen“ und „Lymphknoten“ konnten signifikante Unterschiede aufgezeigt werden, das vermehrte Auftreten von Tumoren im Bereich der Knochen bei steigender CNV war zudem signifikant mit $p = 0,027$ (Chi-Quadrat-Test, $n = 85$).

Hervorzuheben ist hier somit die Tendenz zur Ausbildung von Tumoren im Bereich der Lymphknoten und Knochen der MDA-Zelllinien mit steigender EGFR-CNV. Dies trifft nicht für die Zelllinie 4 zu.

Die Tumoranahl pro Maus (Tab. 15) in Bezug zur EGFR-CNV ergibt einen knapp nicht signifikanten Wert im Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,059$) mit deutlicher Tendenz zur höheren Tumoranahl pro Maus mit steigender EGFR-CNV. Klammert man hier Zelllinie 4 mit EGFR-CNV von 10 aus, wird der Zusammenhang noch deutlicher. Diese Ergebnisse werden auch durch Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Agelou et al. gestützt. Unter Verwendung der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 mit unterschiedlicher EGFR-CNV zeigte sich eine deutliche Steigerung der Signaltransduktionswege, insbesondere in *basal-like/stem cell type* Mammakarzinom-Subpopulationen, welche eine Erklärung für dessen ausgeprägte Heterogenität, gesteigertes Metastasierungsverhalten und Tumorzellüberleben liefern. Insbesondere die Steigerung der Signaltransduktion über den MAP-Kinase- und den PI3-Kinase-Signalweg konnte experimentell nachgewiesen werden [55].

Da das Mammakarzinom in 30 % der Fälle metastasiert ist und in ca. 70 % der Fälle meist osteolytische Knochenmetastasen ausbildet, lohnt es sich, die Signaltransduktionswege und Tumorzellbiologie, speziell in Knochenmetastasen, näher zu betrachten.

Für Tumorzellen stellt die Metastasierung in den Knochen ein optimales Prinzip dar: durch gute Vaskularisierung wird der Transport über die Blutbahn in den Knochen erleichtert, zudem befindet sich im Knochenmark ein optimales Angebot an Nährstoffen und Zytokinen, die dem weiteren Tumorwachstum dienen.

Durch die Interaktion zwischen Osteoklasten, Osteoblasten, Immunzellen und Mammakarzinomzellen entsteht ein *Circulus vitiosus* aus gegenseitiger Aktivierung und Tumorzellwachstum: durch vermehrte Aktivierung der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark hin zur osteoklastischen Differenzierung kommt es über gesteigerte Resorption von Knochen zur weiteren Freisetzung Osteoklasten-aktivierender Zytokine, wie z.B. TGF-beta, PTH-rp, Interleukin 8 und 11 [56]. In Studien konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Inhibition des EGFR-Signalwegs in Knochenmarkszellen und Tumorwachstumshemmung nachgewiesen werden [57].

Eine Überexpression von EGFR konnte unter anderem ebenfalls bei kolorektalen Karzinomen, Glioblastomen, Nierenzellkarzinomen, Lungenzellkarzinomen sowie Kopf-Hals-Tumoren detektiert werden [5]. Einen Überblick liefert Tabelle 2 zu Beginn der Arbeit.

Speziell beim *head neck cancer* (HNC) konnte ein direkter Zusammenhang zwischen EGFR-CNV und Tumorentstehung aufgezeigt werden. Insbesondere in fortgeschrittenen Stadien mit ausgeprägter Metastasierung konnte eine zielgerichtete Therapie mit Cetuximab oder Gefitinib die progressionsfreie Zeit sowie das Gesamtüberleben verlängern [58], [59].

Jedoch stößt auch beim fortgeschrittenen *head and neck squamous cell carcinoma* (HNSCC) die aktuelle zielgerichtete Therapie an ihre Grenzen. In aktuellen Studien liefert die Therapie mit Cetuximab teilweise enttäuschende Ergebnisse. Ursächlich ist auch hier die große Heterogenität des HNSCC. Die Einteilung in *basal like* HNSCC und *non-basal* HNSCC konnte jedoch zeigen, dass *basal-like* HNSCC mit gesteigerter EGFR-CNV, besser auf eine Anti-EGFR-Therapie mit z.B. Cetuximab, Afatinib und Gefitinib, ansprechen als *non-basal* HNSCC-Tumoren [60].

Abschließend lässt sich sagen, dass trotz EGFR-CNV und daraus resultierender gesteigerter Signaltransduktionswege eine alleinige Inhibition des EGFR nicht ausreichend bzw. zielführend ist. Die Vergleiche mit anderen Tumorentitäten zeigen die Problematik großer Heterogenität zwischen den Subtypen der Tumorzellen auf. Eine verbesserte molekulare Diagnostik und Tumor-Profilierung sollten zur maximal zielgerichteten Therapieform genutzt werden, wobei die Forschung um den EGFR die Grundlage für weitere Signalwege und Zielstrukturen darstellt.

IV.3 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich mit steigender EGFR-CNV die Tumorausbreitung bzw. das Metastasierungsverhalten zunimmt. Die dargestellten Tumoren zeigen tendenziell eine höhere Tumorzahl, eine gesteigerte Imagegröße und somit eine Zunahme des Volumens sowie eine vermehrte Metastasierung im Bereich der Knochen. Dies korreliert gut mit dem aggressiven klinischen Bild der TNBC und der damit einhergehenden schlechteren Prognose [61].

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuchsreihe auf das Metastasierungsverhalten am Menschen übertragbar sind, sollten weitere Versuche mit einer größeren Anzahl an Versuchstieren geplant werden. Zudem sollte die Injektion der Zellen überprüft und ggf. eine Tumorbildung im Bereich von Herz und Lunge wiederholt kritisch hinterfragt bzw. histologisch validiert werden.

Auch die Tumorbildung im Bereich der „Lymphknoten“ der Unterkieferregion bei Mäusen sollte in einem separaten Studiendesign untersucht werden, um eine eventuelle Übertragbarkeit auf den Menschen oder tieferegreifende Pathomechanismen besser verstehen zu können.

Zudem konnte eine Studie von K. C. Day et al. in Cancer Research 2017 zeigen, dass auch beim Prostatakarzinom eine Überexpression von EGFR und HER2 mit einer Metastasierung vorwiegend in den Bereich der Knochen sowie einem deutlich aggressiveren klinischen Verhalten einhergehen. Speziell konnte eine EGFR-Expression in CTCs = *circulating tumor cells* von Prostatakarzinometastasen nachgewiesen werden. Diese Entdeckungen lassen hoffen, dass auch andere Tumorentitäten auf diese Weise mit verbesserten therapeutischen Möglichkeiten und damit verbesserter Prognose einhergehen.

Bezogen auf die Therapie des aggressiven und bis heute nur unzureichend behandelbaren TNBC lässt sich festhalten, dass durch die Ergebnisse dieser Arbeit die EGFR-gerichteten Therapieoptionen unterstützt werden und zu weiteren Studien Anlass geben. Ziel wäre es in zukünftigen *in-vivo*-Experimenten weitere Untersuchungen und Ergebnisse auf dem Boden dieser Grundlagenforschung zu erbringen.

V Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau und stellt eine sehr heterogene Gruppe von Karzinomen dar. Um die Bedeutung der unterschiedlichen EGFR-Amplifikationen im Hinblick auf das Metastasierungsmuster genauer zu untersuchen, wurden am Mausmodell Untersuchungen mit unterschiedlichen Sublinien der Mammakarzinomzelllinie sowie einer Kontrollzelllinie durchgeführt. Die Zelllinien unterscheiden sich in der Anzahl ihrer EGFR-CNV. Es wurden 60 weibliche SCID beige Mäuse 3 verschiedene Sublinien der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-468 und der Zelllinie BT-20 injiziert. Die Injektionen erfolgten ultraschallgesteuert intracardial in die linke Herzkammer, wodurch die Mammakarzinomzellen direkt auf den hämatogenen Metastasierungsweg gelangten. Nach 4 sowie nach 8 Wochen erfolgte die bildmorphologische Kontrolle des Tumorwachstums. Die Detektion der Tumorzellen im NightOWL-Luminographen war durch die spezifische Luciferase-Reaktion der gentechnisch veränderten Tumorzellen möglich.

Die morphologischen Daten der Images wurden einerseits auf Tumoranzahl, Imagegröße, mittlere und gesamte Intensität hin untersucht. Andererseits wurde die Verteilung der Tumoren nach anatomischer Lage (8 Kategorien) sowie nach Gewebetyp (3 Kategorien) aufgeschlüsselt. Die Auswertung erfolgte anhand der bildmorphologischen Daten nach 8 Wochen in Bezug auf die verschiedenen Zelllinien sowie der EGFR-CNV.

Aufgrund der geringen Fallzahlen und nicht normalverteilten Messwerte wurden nicht-parametrische Testverfahren auf Basis von exakten Tests zur Analyse der Unterschiede zwischen den Zelllinien eingesetzt. Die Zelllinien wurden wie folgt nummeriert: 1 = „bone“, 2 = „wild type“ (WT), 3 = „suppressed“ (Supp.) und 4 = „BT-20“.

Anhand der 57 überlebenden Mäuse konnten 85 auswertbare Messungen gewonnen werden. Davon konnte bei 66 Messungen bzw. in 77,65 % ein Tumor detektiert werden.

Es wurden maximal 4 Tumoren pro Maus ausgebildet, die Zelllinie 4 bildet in 83,33 % keine Tumoren aus. Die Auswertung der Imagegröße sowie der mittleren und gesamten Intensität zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Zelllinien sowie in Bezug zur EGFR-CNV, im Wesentlichen induziert durch Zelllinie 4.

Des Weiteren zeigt sich eine starke Korrelation zwischen Imagegröße und Intensität der Tumoren. Ergänzende Analysen zwischen den Zelllinien 1-3 konnten kein signifikantes Ergebnis liefern, deuten jedoch auf folgende Zusammenhänge hin: mit steigender EGFR-CNV zeigen sich die Imagegröße und Intensität der Tumoren sowie die Tumoranzahl pro Maus progredient.

Die Tumorlokalisation nach anatomischer Lage zeigt starke Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien mit starker Häufung von Tumoren im Bereich der Lymphknoten sowie im Bereich der Knochen, insbesondere der Zelllinien 1 und 2. Dies korreliert mit einer hohen EGFR-CNV. Die Aufschlüsselung der Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp, mit den Kategorien „kein Tumor“, „Lymphknoten“ sowie „Weichgewebe“, ergab zusätzlich statistisch signifikante Ergebnisse bezüglich der Unterschiede zwischen den Zelllinien sowie in Bezug zur EGFR-CNV. Lediglich die Kategorie „Knochen“ erbrachte keine signifikanten Ergebnisse, jedoch konnte auch hier die Tendenz zur Ausbildung von Tumoren im Bereich der Knochen mit steigender EGFR-CNV dargestellt werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass sich eine Änderung der EGFR-CNV auf die Tumorausbreitung bzw. das Metastasierungsverhalten auswirkt.

Abschließend stellen die Ergebnisse eine Grundlage für weitere Untersuchungen und in-vivo-Experimente dar, die für das TNBC zu neuen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen führen könnten.

VI Literaturverzeichnis

- [1] J. E. Tyczynski, F. Bray, and D. M. Parkin, "BREAST CANCER IN EUROPE," vol. 2, 2002.
- [2] A. C. Antoniou and D. F. Easton, "Models of genetic susceptibility to breast cancer," *Oncogene*, vol. 25, no. 43, pp. 5898–5905, Sep. 2006.
- [3] J.-Q. Chen and J. Russo, "ERalpha-negative and triple negative breast cancer: molecular features and potential therapeutic approaches.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1796, no. 2. pp. 162–75, 2009.
- [4] S. J. Dawson, E. Provenzano, and C. Caldas, "Triple negative breast cancers: Clinical and prognostic implications," *Eur. J. Cancer*, vol. 45, no. SUPPL. 1, pp. 27–40, 2009.
- [5] C. K. Anders and L. A. Carey, "Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer.," *Clin. Breast Cancer*, vol. 9 Suppl 2, no. Suppl 2, pp. S73-81, 2009.
- [6] H. Masuda, D. Zhang, C. Bartholomeusz, H. Doihara, G. N. Hortobagyi, and N. T. Ueno, "Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer.," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 136, no. 2, pp. 331–45, Nov. 2012.
- [7] E. A. Rakha *et al.*, "Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous?," *Breast Cancer Res.*, vol. 9, no. 6, p. 404; author reply 405, 2007.
- [8] T. O. Nielsen *et al.*, "Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal- Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma," *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 919, pp. 5367–5374, 2004.
- [9] J. S. Parker *et al.*, "Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes," *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, no. 8, pp. 1160–1167, Mar. 2009.
- [10] R. Rouzier *et al.*, "Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 16, pp. 5678–5685, Aug. 2005.
- [11] L. A. Carey *et al.*, "Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study," *JAMA*, vol. 295, no. 21, p. 2492, Jun. 2006.
- [12] Z. Li *et al.*, "Increased risk of local recurrence is associated with allelic loss in normal lobules of breast cancer patients.," *Cancer Res.*, vol. 62, no. 4, pp.

- 1000–3, Feb. 2002.
- [13] M. Yu, S. Stott, M. Toner, S. Maheswaran, and D. A. Haber, “Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization.,” *J. Cell Biol.*, vol. 192, no. 3, pp. 373–82, Feb. 2011.
- [14] C. Sonnenschein and A. M. Soto, “The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique.,” *J. Biosci.*, vol. 38, no. 3, pp. 651–63, Sep. 2013.
- [15] C. Allemani *et al.*, “Breast cancer survival in the US and Europe: A CONCORD high-resolution study,” *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 5, pp. 1170–1181, Mar. 2013.
- [16] B. Weigelt, J. L. Peterse, and L. J. van ’t Veer, “Breast cancer metastasis: markers and models.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. August, pp. 591–602, 2005.
- [17] K. J. Davies and K. J., “The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma.,” *Int. J. Breast Cancer*, vol. 2014, p. 839094, Mar. 2014.
- [18] B. N. Kholodenko, O. V Demin, G. Moehren, and J. B. Hoek, “Quantification of short term signaling by the epidermal growth factor receptor.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 42, pp. 30169–81, Oct. 1999.
- [19] S. Yano *et al.*, “Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition.,” *Anticancer Res.*, vol. 23, no. 5A, pp. 3639–50.
- [20] Prof. Brandt B. and D. W., *Molekulare Therapie in der Hämatologie/Onkologie*, 1. Auflage. Uni-Med-Verlag AG Bremen, 2004.
- [21] C. M. Perou *et al.*, “Molecular portraits of human breast tumours.,” *Nature*, vol. 406, no. 6797, pp. 747–752, 2000.
- [22] R. S. Muraoka-Cook, S.-M. Feng, K. E. Strunk, H. S. Earp, and III, “ErbB4/HER4: role in mammary gland development, differentiation and growth inhibition.,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 13, no. 2, pp. 235–46, Jun. 2008.
- [23] A. A. Memon, B. S. Sorensen, P. Meldgaard, L. Fokdal, T. Thykjaer, and E. Nexø, “The relation between survival and expression of HER1 and HER2 depends on the expression of HER3 and HER4: a study in bladder cancer patients.,” *Br. J. Cancer*, vol. 94, no. 11, pp. 1703–9, Jun. 2006.
- [24] Y. Yarden and M. X. Sliwkowski, “Untangling the ErbB signalling network.,”

- Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 2, no. 2, pp. 127–137, Feb. 2001.
- [25] C. Jhappan *et al.*, “Targeting expression of a transforming growth factor beta 1 transgene to the pregnant mammary gland inhibits alveolar development and lactation.,” *EMBO J.*, vol. 12, no. 5, pp. 1835–45, May 1993.
- [26] F. E. Jones, T. Welte, X. Y. Fu, and D. F. Stern, “ErbB4 signaling in the mammary gland is required for lobuloalveolar development and Stat5 activation during lactation.,” *J. Cell Biol.*, vol. 147, no. 1, pp. 77–88, Oct. 1999.
- [27] P. Seshacharyulu, M. P. Ponnusamy, D. Haridas, M. Jain, A. K. Ganti, and S. K. Batra, “Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy.,” *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 16, no. 1, pp. 15–31, Jan. 2012.
- [28] P. M. Harari, “Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 11, no. 4, pp. 689–708, Dec. 2004.
- [29] C. L. Arteaga, “Epidermal Growth Factor Receptor Dependence in Human Tumors: More Than Just Expression? LEARNING OBJECTIVES,” *Oncologist*, vol. 7, pp. 31–39, 2002.
- [30] T. R. Golub *et al.*, “Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring.,” *Science*, vol. 286, no. 5439, pp. 531–7, Oct. 1999.
- [31] M. R. Green, “Targeting Targeted Therapy,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 350, no. 21, pp. 2191–2193, May 2004.
- [32] F. André and C. C. Zielinski, “Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents,” *Ann. Oncol.*, vol. 23, no. SUPPL. 6, 2012.
- [33] M. J. Gray *et al.*, “Phosphatidylserine-targeting antibodies augment the anti-tumorigenic activity of anti-PD-1 therapy by enhancing immune activation and downregulating pro-oncogenic factors induced by T-cell checkpoint inhibition in murine triple-negative breast cancers.,” *Breast Cancer Res.*, vol. 18, no. 1, p. 50, May 2016.
- [34] C. Liedtke, *Neue Konzepte in der zielgerichteten systemischen Therapie des Mammakarzinoms*. U. M. Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Münster: Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York, 2010.
- [35] H. Tsuda *et al.*, “Frequent KIT and epidermal growth factor receptor overexpressions in undifferentiated-type breast carcinomas with ‘stem-cell-like’ features,” *Cancer Sci.*, vol. 96, no. 6, pp. 333–339, Jun. 2005.

- [36] J. F. Wiesen, P. Young, Z. Werb, and G. R. Cunha, "Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development.," *Development*, vol. 126, no. 2, pp. 335–44, Jan. 1999.
- [37] H. Buerger *et al.*, "Length and loss of heterozygosity of an intron 1 polymorphic sequence of egfr is related to cytogenetic alterations and epithelial growth factor receptor expression.," *Cancer Res.*, vol. 60, no. 4, pp. 854–7, Feb. 2000.
- [38] S. Ichihara *et al.*, "The impact of epidermal growth factor receptor gene status on gefitinib-treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer," *Int. J. Cancer*, vol. 120, no. 6, pp. 1239–1247, 2007.
- [39] J. L. Mansi *et al.*, "Micrometastases in bone marrow in patients with primary breast cancer: evaluation as an early predictor of bone metastases.," *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).*, vol. 295, no. 6606, pp. 1093–6, Oct. 1987.
- [40] K. Agelopoulos, H. Buerger, and B. Brandt, "Allelic imbalances of the egfr gene as key events in breast cancer progression--the concept of committed progenitor cells.," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 8, no. 5, pp. 431–445, Aug. 2008.
- [41] J. Hannemann *et al.*, "Quantitative High-Resolution Genomic Analysis of Single Cancer Cells," *PLoS One*, vol. 6, no. 11, p. e26362, Nov. 2011.
- [42] B. D. Lehmann *et al.*, "Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies," *J. Clin. Invest.*, vol. 121, no. 7, pp. 2750–2767, Jul. 2011.
- [43] Sönke-Meyer-Staeckling, "Untersuchungen zur Struktur eines Amplikons im Intron 1 des humanen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors: Erstmutation in der Mammakarzinom-Entstehung," Hamburg, 2009.
- [44] M. R. Patel *et al.*, "Longitudinal, Noninvasive Imaging of T-Cell Effector Function and Proliferation in Living Subjects," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 24, pp. 10141–10149, Dec. 2010.
- [45] Clontech, "tdTomato — Our Brightest Red Fluorescent Protein," vol. 22, no. October, p. 2008, 2008.
- [46] L. F. Greer and A. A. Szalay, "Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review," *Luminescence*, vol. 17, no. 1, pp. 43–74, Jan. 2002.
- [47] A. Cox *et al.*, "A New Standard Genetic Map for the Laboratory Mouse," *Genetics*, vol. 182, no. 4, pp. 1335–1344, Aug. 2009.

- [48] Tiwari, "Molecular Imaging North Competence Center (MOIN CC) in Kiel, Germany," 2014. [Online]. Available: <http://www.moincc.de/>. [Accessed: 08-Aug-2017].
- [49] C. River, "technical sheet The CB17 / lcr-Prkdc scid / lcrLcoCrl Mouse :," *Charles River*, 1991.
- [50] M. J. Cook, *The Anatomy of the Laboratory Mouse*, by Margaret J. Cook | *The Online Books Page*. Surrey, 1965.
- [51] Y. S. HWANG *et al.*, "Validating of the pre-clinical mouse model for metastatic breast cancer to the mandible," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 23, no. 1, pp. 3–8, 2015.
- [52] J. Jia, X.-M. Chen, Z.-J. Sun, and W.-F. Zhang, "Mandibular metastasis of nephroblastoma: a rare case," *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 35, no. 12, pp. 1160–1161, Dec. 2006.
- [53] B. Söder, M. Yakob, J. H. Meurman, L. C. Andersson, B. Klinge, and P.-Ö. Söder, "Periodontal disease may associate with breast cancer," *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 127, no. 2, pp. 497–502, Jun. 2011.
- [54] G. Kumar and B. Manjunatha, "Metastatic tumors to the jaws and oral cavity.," *J. Oral Maxillofac. Pathol.*, vol. 17, no. 1, pp. 71–5, Jan. 2013.
- [55] K. Agelopoulos *et al.*, "Selective regain of egfr gene copies in CD44+/CD24-/low breast cancer cellular model MDA-MB-468," *BMC Cancer*, vol. 10, no. 1, p. 78, Dec. 2010.
- [56] M. Akhtari, J. Mansuri, K. A. Newman, T. M. Guise, and P. Seth, "Biology of breast cancer bone metastasis," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 7, no. 1, pp. 3–9, 2008.
- [57] X. Lu and Y. Kang, "Epidermal growth factor signalling and bone metastasis," *Br. J. Cancer*, vol. 102, no. 3, pp. 457–461, 2010.
- [58] S. Citro, A. Bellini, C. Miccolo, L. Ghiani, T. E. Carey, and S. Chiocca, "Synergistic antitumour activity of HDAC inhibitor SAHA and EGFR inhibitor gefitinib in head and neck cancer: a key role for $\Delta Np63\alpha$," *Br. J. Cancer*, vol. 120, no. 6, pp. 658–667, Mar. 2019.
- [59] A. Guidi, C. Codecà, and D. Ferrari, "Chemotherapy and immunotherapy for recurrent and metastatic head and neck cancer: a systematic review," *Med. Oncol.*, vol. 35, no. 3, p. 37, Mar. 2018.
- [60] S. Job *et al.*, "Preferential Response of Basal-Like Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines to EGFR-Targeted Therapy Depending on EREG-

Driven Oncogenic Addiction,” *Cancers (Basel)*., vol. 11, no. 6, p. 795, Jun. 2019.

- [61] S. J. Dawson, E. Provenzano, and C. Caldas, “Triple negative breast cancers: Clinical and prognostic implications,” *Eur. J. Cancer*, vol. 45, pp. 27–40, Sep. 2009.

VII Anhang

VII.1 Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
Abb.	Abbildung
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
Prkdc	Protein Kinase DNA activated catalytic polypeptide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FCS	fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
EGF(R)	epidermal growth factor (receptor)
VEGF(R)	vascular epidermal growth factor (receptor)
DTC	disseminated tumor cells
CN	copy number
cRNA	complementary RNA (komplementäre RNA)
i.p.	intraperitoneal
s.c.	subcutan
KRT	Keratin
BRCA	<i>breast cancer Gen</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1 gen</i>
SMAD4	<i>mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)</i>
TP53	Tumorsuppressorgen 53
CDKN2A	cyclin-dependent kinase Inhibitor 2A
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform</i>
ph/s	Photonen pro Sekunde
CMV	Cytomegalievirus
SCCNH	Squamous Cell Carcinoma Neck Head

VII.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Beschreibung der Mammakarzinom-Subtypen [3].....</i>	<i>2</i>
<i>Tabelle 2: Überexpression des EGFR in verschiedenen Tumoren [28].....</i>	<i>8</i>
<i>Tabelle 3: Herkunft und Eigenschaften der verwendeten humanen Zelllinien.....</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 4: Übersicht über die EGFR-CN der verwendeten Zelllinien [43].....</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 5: Übersicht Fallzahlen, Mäuse, Tumormessungen</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 6: Imagegröße und Zelllinien.....</i>	<i>25</i>
<i>Tabelle 7: mittlere Intensität und Zelllinien</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 8: Korrelation zwischen Imagegröße und Intensität.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 9: Verteilung der Tumoren nach anatomischer Lage</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 10: Auswertung Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 11: Zusammenfassung Zelllinien.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 12: Auswertung Imagegröße und EGFR-CNV</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 13: Auswertung mittlere Intensität und EGFR-CNV.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 14: Auswertung Verteilung der Tumoren nach Gewebetyp und EGFR-CNV.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 15: Auswertung Anzahl der Tumoren in Bezug zur EGFR-CNV.....</i>	<i>41</i>

VII.3 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: zytogenetisches Evolutionsschema als Grundlage der Arbeitshypothese zur Entstehung von Mammakarzinomzellen mit EGFR Amplifikation (Boecker t al. 2002, Shipitsin & Polyak, 2008)</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 2: Inhibition des EGFR-Dimers (graublau) und der nachfolgenden intrazellulären Signaltransduktion [20]</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 3: Ansätze zur Therapieoptimierung in den einzelnen Mammakarzinom-Subtypen [34].....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 4: Aufbau des verwendeten Plasmids [44]</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 5: schematische Darstellung der Bildgebung im NightOWL-Gerät [48].....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 6: Maus 2 der Zelllinie „WT“ als Beispiel für die Bestimmung der Intensität</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 7: Imagegröße und Zelllinie.....</i>	<i>26</i>
<i>Abbildung 8: mittlere Intensität und Zelllinie.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 9: exemplarische Darstellung der Tumorbildung der Zelllinie 2 in der Biolumineszenz Bildgebung in der 4. Woche.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 10: Verteilung der Tumoren anhand des Gewebetyps</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 11: graphische Darstellung Imagegröße und EGFR-CNV.....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 12: graphische Darstellung der mittleren Intensität und EGFR-CNV.....</i>	<i>39</i>
<i>Abbildung 13: Darstellung Gewebetyp und EGFR-CNV.....</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 14: zweidimensionale Bildgebung mittels NightOWL-Luminographen nach 4 Wochen der Zelllinie 2</i>	<i>43</i>

Abbildung 15: exemplarische Darstellung der Tumore im Bereich des Unterkiefers (Pfeil) bei Mäusen der Zelllinie 2 in der 4. Woche 44

Abbildung 16: Darstellung der Blutgefäße des Halses in Mäusen [50] 46

VII.4 Schreiben über die Zulassung durch die Tierschutzkommission

Ministerium für Energiewende,
Landwirtschaft, Umwelt
und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt
und ländliche Räume | Postfach 71 51 | 24171 Kiel

Herrn
Prof. Dr. Burkhard Brandt
Institut für klinische Chemie
Arnold-Heller-Str. 3 (Haus 17)
24105 Kiel

Ihr Antrag vom: 07.12.2012
Eingang 28.03.2013

Mein Zeichen: V 311- 72241.121-39 (62-4/13)

Dr. Michaela Sekulla
Michaela.Sekulla@MELUR.landsh.de
Telefon: 0431 988-4948
Telefax: 0431 988-5246

nachrichtlich:
Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

2. Mai 2013

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Sehr geehrter Herr Prof. Rose-John,

gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206), zuletzt geändert durch Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950), erteile ich Ihnen die Genehmigung, im Rahmen des Versuchsvorhabens

*„Die Bedeutung von EGFR- Genkopieveränderungen
bei der frühen Metastasierung des Mammakarzinoms“*

zu Versuchszwecken Eingriffe und Behandlungen an Tieren vorzunehmen.

Die Genehmigung ist mit folgenden Nebenbestimmungen verbunden:

1. Es dürfen bis zu 126 Mäuse verwendet werden.
2. Die Genehmigung ist bis zum 31. Mai. 2016 befristet.
Sie kann auf formlosen, hinreichend begründeten Antrag um ein Jahr verlängert werden, sofern keine wesentlichen Änderungen der Genehmigungsvoraussetzungen eingetreten sind.
3. Leiter des Versuchsvorhabens:
Herr Prof. Dr. Burkhard Brandt

Dienstgebäude Mercatorstraße 3, 5, 7, 24106 Kiel | Adolf-Westphal-Str. 4, 24143 Kiel | Telefon 0431 988-0 | Telefax 0431 988-7239 |
poststelle@melur.landsh.de | www.schleswig-holstein.de | E-Mail-Adressen: Kein Zugang für elektronisch signierte oder verschlüsselte
Dokumente. Das Landeswappen ist gesetzlich geschützt.

VII.5 Schreiben über die Durchführung des Tierschutzkurses



Teilnahmebestätigung über das Einführungsseminar "Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung" - Theorieteil -

Sehr geehrte Frau / sehr geehrter Herr

Julia Münst

hiermit bestätigen wir Ihnen die Teilnahme am Theorieteil des Einführungsseminars, bei dem folgende Punkte behandelt wurden:

- Einführung
- Ziele und Inhalte
- Relevante Gesetze (TierSchG, TierSchVerV etc.)
- Versuchsplanung und Biometrie, Genetik und Zucht
- Hygiene und Infektionskrankheiten
- tierschutzgerechtes Töten
- relevante physiologische Grundlagen der Labornager und von Fischen

Mit freundlichen Grüßen
Kiel, den 04.09.2014

Prof. Dr. G. Schultheiß
TSchB / Tierhausleitung
CAU zu Kiel

Das Präsidium
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- für Tierschutzbeauftragte -
Prof. Dr. med. vet. Gerhard Schultheiß
Telefon (0431) 880-1005
Olshausenstraße 40 - D 24088 Kiel

Teilnahmebestätigung über das Einführungsseminar "Tierschutz und Versuchstiere in der Forschung" - Praxisteil -

Sehr geehrte Frau / sehr geehrter Herr

Julia Münst

hiermit bestätigen wir Ihnen die Teilnahme am Praxisteil des Einführungsseminars, bei dem folgende Punkte behandelt wurden:

- Handling von Versuchsnagern
- Durchführung gängiger Applikationstechniken (s.c., i.p., i.v., p.o.)
- Anwendung einer Injektionsnarkose
- Probengewinnung (z.B. Blut)
- Tötungsverfahren

Mit freundlichen Grüßen
Kiel, den 18.09.2014



Prof. Dr. G. Schultheiß
TSchB / Tierhausleitung
CAU zu Kiel

Das Präsidium
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- Der Tierschutzbeauftragte -
Prof. Dr. med. vet. Gernard Fickelmann
Tel. (49) 431 880-2200
E-Mail: g.fickelmann@cau.de

VII.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Brandt für die wertvollen Tipps sowie die konstruktive Kritik während der Versuche sowie beim Abfassen der Arbeit. Danke auch für die Geduld, die Arbeit über die lange Zeit hinaus zu begleiten und fertigzustellen.

Herrn Prof. Dr. med. Schem danke ich für die Überlassung des Themas der Dissertation.

Dank gilt auch Rob Tower sowie Henrik Braun für die Betreuung und Durchführung der Tierversuche.

Mein herzlichster Dank gilt ebenfalls Herrn Wierer bei der Hilfe zur statistischen Auswertung der Daten.

Abschließend bedanke ich mich im Besonderen bei meinen Eltern, Freunden, Arbeitskollegen und Bekannten für die tatkräftige Unterstützung und Ermunterung während der Arbeit.

VII.7 Veröffentlichung

Vorstellung eines Posters zum Thema „EGFR-Rezeptor Amplifikation und Metastasierungsverhalten von Brustkrebszellen im Mausmodell“ auf dem 2. Thüringer Tag der Gynäkologie am 07.09.2019 in Weimar unter der Leitung von Dr. Herrmann, Leiter der Gynäkologie und Geburtshilfe in Weimar.