

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Diedrich

**Expression der mRNA und des Proteins des
Rekombinationsfaktors Rad51 beim Mammakarzinom**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Britta Hebenbrock

aus Hamburg

Lübeck 2009

1. Berichterstatterin : Priv.-Doz. Dr. med. Dorothea Fischer

2. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Stefan Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2009

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 30.09.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1.	Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom	6
1.1.1.	Nodalstatus, peritumorale Lymph- und Hämangiosis	7
1.1.2.	Tumorgröße	7
1.1.3.	Alter der Patientin	7
1.1.4.	Zellmorphologische Kriterien: Grading	7
1.1.5.	Hormonrezeptorstatus	7
1.1.6.	Her2/neu-Rezeptorstatus	8
1.2.	Neue Ansätze zur Indikationsstellung der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms	8
1.3.	Der Rekombinationsfaktor Rad51	10
1.4.	Fragestellung	13
2.	Material und Methoden	14
2.1.	Patientenmaterial	14
2.1.1.	Paraffinmaterial aus Operationspräparaten	14
2.1.2.	Kryokonserviertes Frischgewebe aus Operationspräparaten	15
2.1.3.	Klassifizierung der untersuchten Mammakarzinome	16
2.2.	Immunhistochemie	16
2.2.1.	Geräte und Reagenzien	16
2.2.2.	Lösungen und Puffer	17
2.2.3.	Antikörper	17
2.2.4.	Färbeprotokoll	18
2.2.5.	Kontrollen für unspezifische Färbungen	19
2.2.6.	Auswertung der gefärbten Präparate	20
2.3.	mRNA-Nachweis	21
2.3.1.	Geräte und Reagenzien	21
2.3.2.	RNA-Isolierung	21
2.3.3.	cDNA-Synthese	22
2.3.4.	Realtime PCR	23
2.3.5.	Auswahl der Referenzgene	24
2.3.6.	Auswahl der Primer	25
2.3.7.	Statistische Analyse	27
3.	Ergebnisse	28
3.1.	Immunhistochemischer Nachweis von Rad51 in Mammakarzinomgewebe und in gesundem Gewebe der Brust	28

3.1.1. Vergleich der Rad51 Proteinexpression in Tumorgewebe und gutartigem Brustgewebe	30
3.1.2. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit klinischen Parametern	32
3.1.2.1. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit der Expression des Her2/neu Rezeptors	32
3.1.2.2. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit der Tumorgröße	33
3.1.2.3. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit dem Tumorgrading	33
3.1.2.4. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit dem Tumortyp	34
3.1.2.5. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit dem Sexualsteroidrezeptorstatus und dem Nodalstatus	34
3.2. Expression der Rad51-mRNA	35
3.2.1. Relative Quantifizierung	35
3.2.2. Ermittlung von Effizienzen der PCR-Reaktionen	35
3.2.3. Gelelektrophoretische Überprüfung von Größen der erhaltenen Amplifikate	36
3.2.4. Schmelzkurvenanalyse	37
3.2.5. Rad51 mRNA-Expression in Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Brustgewebe	38
3.2.5.1. delta ct - Methode	38
3.2.5.2. Analyse mit dem REST-XL Programm	39
3.2.6. Expression der Rad51 mRNA koordiniert mit den klinischen Tumordaten	40
3.2.6.1. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Tumorgrading	42
3.2.6.2. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit der Tumorgröße	42
3.2.6.3. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Sexualsteroid- Rezeptorstatus	43
3.2.6.4. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Her2/neu Status	44
3.2.6.5. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Nodalstatus	45
3.2.7. Suche nach Rad51 Splicevarianten im untersuchten Kollektiv	45
3.3. Korrelation von Rad51 Protein- und mRNA-Nachweisen	46
4. Diskussion	48
4.1. Nachweis einer erhöhten Proteinexpression von Rad51 in Tumorgewebe der Brust	48
4.2. Nachweis einer erhöhten mRNA-Expression von Rad51 in Tumorgewebe der Brust	50
4.3. Bewertung der verwendeten Methoden	51
4.3.1. Immunhistochemie	51
4.3.2. RNA-Isolierung und Realtime-RT-PCR	52
4.4. Mögliche Ursachen und Folgen einer Rad51-Überexpression	52
4.5. Vergleich der Rad51 Protein- und mRNA-Expression	53

4.6.	Ausblick	54
5.	Zusammenfassung	56
6.	Literatur	57
7.	Anhang	65
	Erklärung über die Genehmigung der Untersuchungen von der Ethikkommission	65
	Abbildungsverzeichnis	68
	Tabellenverzeichnis	69
8.	Danksagung	71
9.	Lebenslauf	72

1. Einleitung

1.1. Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren beim Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau in Deutschland. Es erkranken jährlich etwa 57.000 Frauen. Die Inzidenz wird in Nord- und Westeuropa mit 70-120/100.000 Frauen angegeben. Jede achte bis zehnte Frau erkrankt somit im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom.

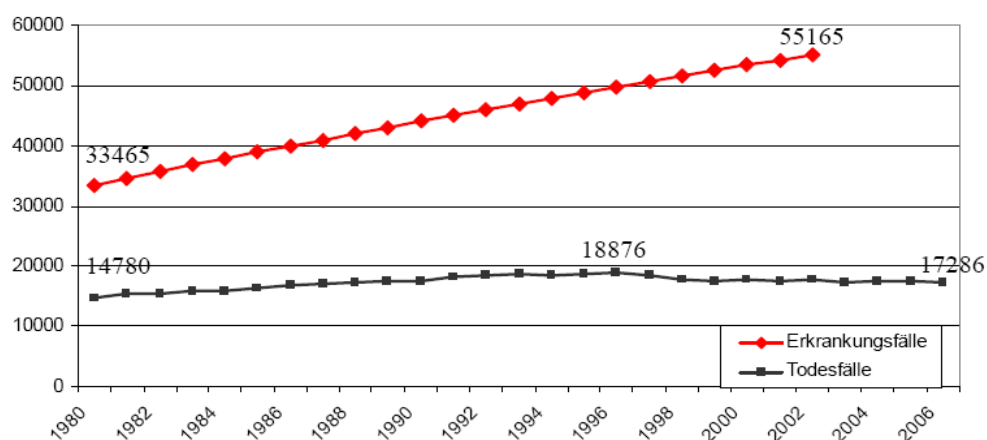


Abb.1: Absolute Fallzahlen jährlicher Neuerkrankungen und Todesfälle an Brustkrebs für Frauen in Deutschland (Grafik aus dem epidemiologischen Krebsregister NRW (Kraywinkel K, 2007))

In Deutschland sterben ca. 17.000 Frauen pro Jahr an Brustkrebs. Dieser stellt die häufigste Todesursache zwischen dem 35. und 45. Lebensjahr dar (Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Robert-Koch-Institut, 2008). Bei ansteigender Brustkrebsinzidenz in Europa und den USA konnte seit Anfang der 90er Jahre ein deutlicher Rückgang der Mortalität festgestellt werden. So sank die Brustkrebsmortalität in den USA zwischen 1989 und 1995 um durchschnittlich 1,6 % pro Jahr. In der Europäischen Union nahm die Sterberate zwischen 1988 und 1996 um insgesamt 7 % ab (Levi F, 2001). Die Reduktion der Sterblichkeit ist neben der verbesserten Früherkennung insbesondere auf die konsequent durchgeführte adjuvante Therapie zurückzuführen. Bei der Festlegung der adjuvanten Therapie des frühen Mammakarzinoms werden aktuell folgende Prognosekriterien berücksichtigt: Der Nodalstatus, die Tumorgroße, das Alter der Patientin, das histopathologische Grading und der Status der Rezeptoren für Östrogen und Progesteron sowie des Her2/neu-Rezeptors (Friedrichs et al., AGO Leitlinien, 2009, Kreienberg et al., S3 Leitlinie, 2008).

1.1.1. Nodalstatus, peritumorale Lymph- und Hämangiosis

Nach wie vor ist der axilläre Lymphknotenstatus der wichtigste Prognosefaktor neben der Lymphangiosis und der Gefäßinvasion. Der Nodalstatus stellt ein Maß für die Invasion axillärer Lymphknoten durch Tumorzellen dar. Für die Planung der adjuvanten Therapie nach primärer Tumorresektion werden nodalpositive und nodalnegative Patientinnen unterschieden. Eine Frau, bei der die axillären Lymphknoten Tumorbefall aufweisen, hat ein höheres Rezidivrisiko mit einer ungünstigeren Prognose (Friedrichs et al., AGO Leitlinien, 2009, Kreienberg et al., S3 Leitlinie, 2008).

1.1.2. Tumorgröße

Die Tumorgröße besitzt im Verhältnis zu den anderen genannten Markern die geringste prognostische Aussagekraft (Pereira et al., 1995), was an der verbesserten therapeutischen Kontrolle des lokalen Tumorwachstums liegen mag. Dieser Faktor ist aber im Rahmen der Mammadiagnostik sonographisch und mammographisch objektiv zu beurteilen und gilt auch gemäß den aktuellen Leitlinien (Friedrichs et al., AGO Leitlinien, 2009, Kreienberg et al., S3 Leitlinie, 2008) weiterhin als prognostisches Instrument.

1.1.3. Alter der Patientin

Das Alter von unter 35 Jahren zum Zeitpunkt der Primärdiagnose ist als ein zusätzlicher Risikofaktor akzeptiert und beeinflusst erheblich die Entscheidung für eine adjuvante Chemotherapie (Friedrichs et al., AGO Leitlinien, 2009, Kreienberg et al., S3 Leitlinie, 2008).

1.1.4. Zellmorphologische Kriterien: Grading

Das histologische Grading bezeichnet den Differenzierungsgrad der Tumorzellen anhand morphologischer Parameter.

- G 1: gut differenziert
- G 2: mäßig differenziert
- G 3: schlecht differenziert.

Die Klassifizierung G 3 geht mit einer schlechteren Prognose einher und gilt allein als Entscheidungskriterium für eine Chemotherapie (Friedrichs et al., AGO Leitlinien, 2009, Kreienberg et al., S3 Leitlinie, 2008).

1.1.5. Hormonrezeptorstatus

Der Nachweis eines positiven Östrogen- und/oder Progesteronrezeptors spielt eine wesentliche Rolle als prädiktiver Faktor für das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie. Da bei negativem Rezeptorstatus die Therapie mit dem

Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen oder einem Aromatasehemmer nicht greift, ist dann eine zytostatische Therapie indiziert. Hormonrezeptor-negative Tumore zeigen zudem ein höheres Ansprechen auf Chemotherapie (Meslin et al., 2007, Schmidt M et al., 2007, v. Minckwitz et al., GeparTrio Studie 2006).

1.1.6. Her2/neu-Rezeptorstatus

Her2/neu (human epidermal growth factor 2) ist ein membranständiger Wachstumsfaktorrezeptor an der Zelloberfläche, der bei 20-25 % der Mammakarzinome überexprimiert wird. Seit 2005 gilt ein positiver Her2/neu Status international als anerkannter prognostischer und prädiktiver Faktor beim primären Mammakarzinom (Jänicke et al., Konsens St. Gallen 2005). Seit 2006 ist der humane monoklonale Antikörper Trastuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie für die adjuvante Therapie des frühen Mammakarzinoms zugelassen (European Medicines Agency (EMA), 2006).

Abhängig von der Zuordnung der Tumore gemäß obiger Kriterien in Hoch-, Mittel- und Niedrigrisikogruppen und dem operativen Vorgehen sind folgende Therapieoptionen indiziert:

- endokrine Therapie
- Chemotherapie
- Her2 Antikörpertherapie
- Strahlentherapie

Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren dienen dazu, die Patientinnen zu identifizieren, die von einer bestimmten Therapie profitieren. Oft entscheidet das Vorliegen nur eines der genannten Risikofaktoren über die Indikation zur adjuvanten Chemotherapie. Wären weitere Selektionsparameter vorhanden, könnte vermieden werden, dass viele der Patientinnen sich evtl. unnötigerweise einer mit möglicherweise starken Nebenwirkungen einhergehenden Therapie unterziehen.

1.2. Neue Ansätze zur Indikationsstellung der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms

Große Anstrengungen werden unternommen, um zusätzlich zu den oben genannten Prognosekriterien neue Marker zu etablieren, die Mammakarzinome exakter klassifizieren. Mit Hilfe dieser Marker sollen gezielte Therapien entwickelt werden können. Ein Beispiel ist uPA, ein Urokinasetyp-Plasminogenaktivator und dessen Inhibitor PAI-1 (Jänicke et al. 2000, 2001), die als fakultative Marker zur Risikoeinschätzung gelten

(Friedrichs et al., AGO Leitlinien, 2009). Die Bestimmung ist bisher nur in wenigen Laboratorien etabliert, da sie in Frischgewebe durchgeführt werden muss und sehr aufwendig ist. Dem Proliferationsmarker Ki-67 (Stuart-Harris et al., 2008) und dem Tumorsuppressor p53 (Hollstein et al. 1991, Thames et al. 2002) wird eine wesentliche Bedeutung bei der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms zugemessen. Die Datenlage reichte jedoch bislang nicht dazu aus, dass sich diese Marker im klinischen Einsatz etabliert haben. Ihre Bestimmung erfolgt derzeit insbesondere in translationalen Therapiestudien. Untersuchungen von Mammakarzinomen auf molekularer Ebene geben Hinweise auf zusätzliche Prognosekriterien, die dazu beitragen könnten, eine individuell auf die jeweilige Patientin abgestimmte Therapie zu entwickeln. Laura J van't Veer et al. konnten zeigen, dass die Abschätzung der Prognose junger Brustkrebspatientinnen anhand einer Microarray-basierten Analyse des Genexpressionsmusters exakter ist als die Einteilung gemäß der St. Gallen Kriterien (van't Veer et al., 2002, van de Vijer et al., 2002). Über eine Beobachtungszeit von fünf Jahren erwies sich bei 295 Brustkrebspatientinnen die Risikoeinschätzung zur Entwicklung von Fernmetastasen anhand des Genprofils den bisher gültigen Prognosekriterien als überlegen. Aktuell stehen zwei Verfahren zur Untersuchung des Genexpressionsmusters zur Verfügung, die eine individuelle Prognose für Brustkrebspatientinnen bieten sollen. MammaPrint® ist ein von der US Food and Drug Administration (FDA) im Februar 2007 zugelassener DNA Microarray-basierter, diagnostischer, multivarianter In-Vitro-Index-Assay (IVDMIA), der von der Firma Agendia (Holland) hergestellt wird. Er analysiert im Frischgewebe des Tumors das Expressionsniveau von 70 Genen (Agendia Pressemitteilung, 2007). Ein weiterer, bereits auf dem US-amerikanischen Markt befindlicher Test, Oncotype DX® von der Firma Genomic Health (USA), ist ein Multiparameter-Genexpressions-Assay, der aus in Paraffin eingebettetem Brustkrebsgewebe 21 Gene analysiert. Dieser Test ist zugelassen und empfohlen bei Tumoren, die Östrogenrezeptor-positiv und nodal-negativ sind. Der Test soll dazu beitragen, die Notwendigkeit einer Chemotherapie bei Brustkrebspatientinnen zu überprüfen (Genomic Health Presseinformation 2008, Albain et al., 2007, NCCN 2008). Beide Tests sollen zusätzliche Informationen zum Metastasierungs- und Rezidivrisiko von Frauen mit Brustkrebs im Frühstadium liefern, um so zu ermitteln, ob sie von einer Chemotherapie profitieren würden. Bei Patientinnen mit intermediärem Risiko könnte so eine Übertherapie vermieden werden. Im Mai 2008 hat die Rekrutierung für eine europaweite Studie zur Überprüfung solcher Tests begonnen. Ziel dieser Studie ist es, festzustellen, ob die Bestimmung des genetischen Profils des Tumors bei Patientinnen mit tumorfreien Lymphknoten besser den Behandlungsbedarf voraussagt als die heutigen Standardprognosefaktoren (EORTC, MINDACT-Studie).

Die Unterteilung von Mammakarzinomen anhand des Expressionsmusters von Tumor relevanten Genen wurde erstmals 2000 von Perou et al. beschrieben (Perou et al., 2000). In weiteren Arbeiten wurde diese Unterteilung bestätigt (Sørli et al., 2001, 2003).

Mit den erhaltenen Genexpressionsmustern durch den Einsatz von Microarrays erfolgt eine Einteilung der Mammkarzinome in vier Subtypen: die Typen Luminal A und B, der Her2-Typ und der Basaltyp. Diese vier Gruppen unterscheiden sich sowohl in ihrer Prognose als auch in ihrem Ansprechen auf unterschiedliche Therapiemodalitäten.

Der Luminal A Typ (Östrogenrezeptor-positiv, Her2/neu-negativ) ist charakterisiert durch eine hohe Expression des ER-Alpha Gens und eine gute Prognose.

Der Luminal B Typ (Östrogenrezeptor-positiv, Her2/neu-positiv) hat eine niedrigere ER-Expression und gehört daher einer höheren Risikogruppe an als der Luminal A Typ.

Der Basaltyp ist Östrogenrezeptor-negativ, meist Her2neu-negativ und weist eine hohe Expression von Keratin 5, 6, 14 oder 17 auf. Dieser auch „basal-like“ genannte Brustkrebstyp gilt als sehr proliferationsfreudig und liegt meistens beim familiären Brustkrebs mit einer Mutation des BRCA1-Gens vor.

Der Her2- (oder ERBB2) Typ zeichnet sich aus durch eine Überexpression des Her2/neu-Rezeptors, resultierend aus einer Amplifikation des Genabschnitts von ERBB2. Die Östrogenrezeptoren dieses Typs sind in der Regel negativ.

Beide zuletzt genannten Tumortypen gehen mit einer erhöhten Rezidivrate und kürzerem rezidivfreien- sowie Gesamt-Überleben einher (Milikan et al., 2008).

Die Erforschung neuer Klassifizierungskriterien und genetischer Profile von Karzinomen soll die Auswahl der Patientinnen ermöglichen, die von einer Chemotherapie profitieren.

1.3. Der Rekombinationsfaktor Rad51

Die Reparatur von chromosomalen DNA-Doppelstrangbrüchen in humanen Zellen erfolgt durch den Vorgang der homologen Rekombination (HR), für den Rad51 ein Schlüsselprotein ist. Die HR bedeutet die wechselseitige Verknüpfung und den Austausch von DNA-Abschnitten mit gleicher oder sehr ähnlicher Nukleotid-Sequenz zwischen zwei homologen Chromosomen. Sie garantiert die genetische Vielfalt und ist von großer Bedeutung bei der Reparatur von genetischen Schäden wie z.B. Doppelstrangbrüchen und Strangvernetzungen (cross-links) der DNA-Doppelhelix (Thompson et al., 2001, Lengauer et al., 1998). Das Rad51 Protein ist Teil eines Proteinkomplexes mit den Tumorsuppressoren BRCA1, BRCA2 und p53, der bei Doppelstrangbrüchen in DNA Molekülen die rekombinante Reparatur aktiviert und koordiniert (Wang et al., 2001). Es bildet mit freier Einzel- oder Doppelstrang-DNA Nukleoproteinfilamente und verdrängt in einer benachbarten intakten DNA-Doppelhelix einen der beiden Einzelstränge. Dadurch erfolgt der Austausch von DNA-Einzelsträngen zwischen zwei DNA-Molekülen. Die HR

leistet einen wichtigen Beitrag in der Regulation der DNA-Reparatur und somit zur Stabilität des Genoms. Zellen, die Mutationen der HR-Gene (BRCA1, BRCA2, RAD51, RAD54, XRCC2 oder XRCC3) aufweisen, zeigen eine erhöhte genetische Instabilität und größere Anfälligkeit für DNA schädigende Substanzen (Thompson et al., 2001). Rad51 interagiert mit den Tumorsuppressoren p53, BRCA1 und BRCA2 (Buchhop et al., 1997, Marmorstein et al. 1998, Scully et al., 1997b; Sharan et al., 1997, Stürzbecher et al., 1996). P53 kontrolliert möglicherweise durch direkten Einfluss auf die Rekombination die korrekte Paarung der durch Strang austausch gebildeten Heteroduplex. Mutationen des p53 Tumorsuppressorgens werden mit der Prädisposition für verschiedene humane Malignome in Zusammenhang gebracht (Hollstein et al., 1991). Mutiertes p53 ist mit erhöhten Raten an HR, ausgelöst durch Replikationsarrest, assoziiert. Wildtyp p53 inhibiert hingegen die Replikations-assoziierte Rekombination (Dudenhoffer et al., 1999, Saintigny et al., 2002, Saintigny et al. 1999, Willers et al, 2000). Die Interaktion von Rad51 mit p53 scheint an die Wildtypkonformation von p53 gebunden zu sein (Stürzbecher et al., 1996). Für die Bildung von Proteinkomplexen nach DNA Schädigung (Stürzbecher et al., 1996) konnten bei p53 zwei Bindungsstellen für Rad51 identifiziert werden (Buchop et al., 1997). Einen indirekten Einfluss auf die HR über die Zellzykluskontrolle hat aktiviertes p53 durch Initiierung von Zellzyklusarrest und Apoptose (Robles et al., 2001). Mutationen des BRCA1 oder 2-Gens liegen bei 60 % der familiären Mammakarzinome vor (Venkitaraman et al., 2002). BRCA1 und 2 sind bedeutende Gene für die Regulation der DNA-Reparatur, deren Funktionsverlust zu einem gestörten Reparaturmechanismus mittels HR führen kann (Snouwaert et al., 1999, Moynahan et al., 2002). BRCA2 bindet über BRC-Domänen an Rad51 (Chen et al., 1998, Patel et al. 1998, Wong et al. 1997) und fungiert möglicherweise als Mediator der HR, indem bei DNA-Schädigung ein BRCA2-Rad51 Komplex durch Phosphorylierung von einem inaktiven in einen aktiven Zustand versetzt wird und so die Verfügbarkeit und Aktivität von Rad51 reguliert (Venkitaraman, 2002). Eine Interaktion zwischen BRCA1 und Rad51 wurde mittels Immunpräzipitation nachgewiesen. BRCA1 spielt vermutlich bei der Erkennung von DNA-Schäden und der darauf folgenden Signaltransduktion eine Rolle und koordiniert die Erhaltung der genomischen Integrität (Venkitaraman, 2002, Wang et al., 2000). Martin et al., (2007) fanden bei Untersuchungen an Hühnerzellen eine signifikante Korrelation zwischen BRCA1-defizienten Brusttumoren und erhöhter Rad51-Expression. Tumore mit einer BRCA1-Mutation zeigten eine 2,5 fach höhere Rad51-Expression als sporadische Karzinomzellen. Abbildung 2 zeigt ein vereinfachtes Modell für den möglichen Mechanismus im Zusammenspiel der Reparaturproteine BRCA/p53 und Rad51.

Der BRCA / p53 / Rad51 DNA-Reparaturmechanismus

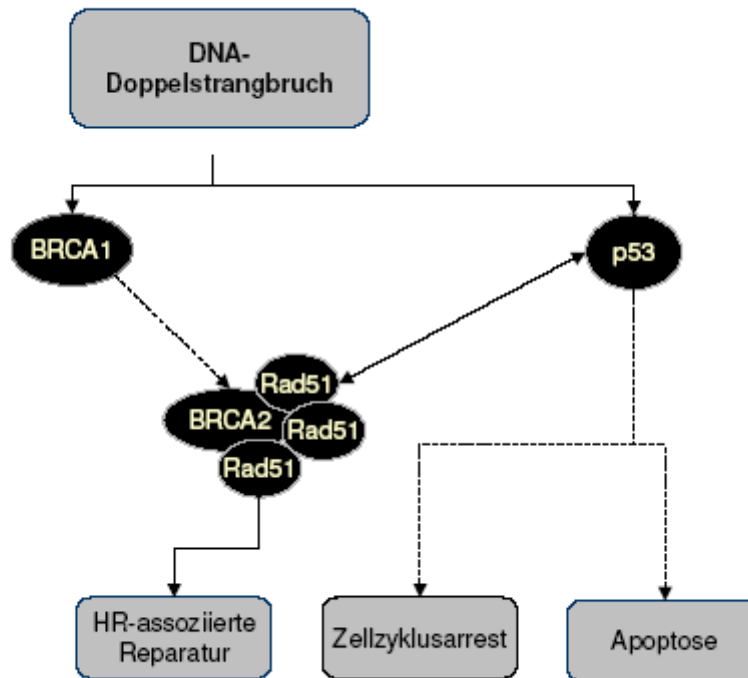


Abb.2: Vereinfachtes Modell für die Funktion von p53, BRCA1, BRCA2 und Rad51 bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur. Doppelstrangbrüche aktivieren die rekombinante Reparatur, in der möglicherweise Rad51, BRCA1 und BRCA2 in einem Proteinkomplex zusammenwirken. Gleichzeitig wird der Zellzyklus über p53 angehalten und u.U. bei ungenügender Reparatur die Apoptose eingeleitet.

Welche Rolle das Expressionsniveau von Rad51 in der Karzinogenese genau spielt, ist jedoch nicht klar. Eine erhöhte Rad51 Expression wurde bereits bei einer Reihe von menschlichen Malignomen der Brust, des Pankreas, der Blase und beim Bronchialkarzinom nachgewiesen (Maacke et al., 2000a). Beim invasiv duktalem Mammakarzinom sowie dem Blasenkarzinom konnte eine Korrelation zwischen der Rad51 Überexpression und dem histologischen „Tumograding“ festgestellt werden (Maacke et al., 2000b, Krüger et al., 2005).

Diese Studien geben Hinweise darauf, dass Rad51 im Zusammenspiel mit Proteinen wie p53 und BRCA1/2 einen wichtigen Beitrag bei der Unterdrückung von malignem Wachstum leistet und die Erforschung der Rad51 Expression wertvolle Informationen für die Entwicklung neuer Prognosefaktoren beim Mammakarzinom liefern könnte.

1.4. Fragestellung

In der vorliegenden Studie sollte die Rad51-Expression auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und auf mRNA-Ebene durch PCR in malignem und benignem Mammakarzinomgewebe verglichen werden. Folgende Fragestellungen wurden dabei bearbeitet:

- Kann eine erhöhte Expression auf Proteinebene erneut festgestellt werden ?
Hierzu wurden archiviertes, in Paraffin eingebettetes Mammakarzinomgewebe und benigne Anteile von Brustgewebe immunhistochemisch ausgewertet.
- Ist eine Rad51 Überexpression auch auf mRNA Ebene nachweisbar ?
Die Untersuchung von kryokonserviertem Frischgewebe erfolgte in der Realtime-PCR an den Karzinomen, die auch für die Proteinanalyse verwendet wurden und an Kontrollgewebe von benignem Brustgewebe.
- Ergeben sich Korrelationen mit klassischen Prognosefaktoren ?
- Sind die Ergebnisse der Proteinbestimmung und der mRNA Bestimmung vergleichbar ?

2. Material und Methoden

2.1. Patientenmaterial

Die Gewebeproben stammen von Patientinnen, bei denen in den Jahren 2003 – 2005 in der Frauenklinik des UK S-H, Campus Lübeck ein Mammakarzinom diagnostiziert wurde. In Tumorgewebe und gesundem Gewebe sollte die Expression von Rad51 mit zwei unterschiedlichen Verfahren untersucht werden. Die Expression des Proteins von Rad51 wurde mit immunhistochemischer Färbung von Paraffinschnitten asservierter Tumorproben untersucht. Die Expression der mRNA wurde in der RealTime-PCR an kryokonserviertem Frischgewebe quantitativ bestimmt.

2.1.1. Paraffinmaterial aus Operationspräparaten

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Material durchgeführt. Die Paraffinblöcke sind im Institut für Pathologie des UK S-H, Campus Lübeck von jeder Patientin, die in der Frauenklinik des UK S-H, Campus Lübeck operiert wurde, archiviert. Die benötigten Schnitte für diese Studie wurden freundlicherweise vom Labor des Instituts für Pathologie mit einer Dicke von 4 µm angefertigt. Die Begutachtung der Schnitte und Bestätigung repräsentativer invasiver Tumoranteile erfolgte durch den Pathologen Herrn Prof. Dr. med. Stefan Krüger aus dem Institut für Pathologie des UK S-H, Campus Lübeck (Direktor: Prof. Dr. med. A. C. Feller) an Hämatoxylin-Eosin gefärbten Präparaten.

Als Kontrolle wurden bei elf der gefärbten Mammakarzinomschnitte Rad51 positive Zellen in benignem Brustdrüsengewebe ausgezählt. Die geeigneten Bereiche aus dem Kollektiv der 49 Mammakarzinomschnitte wurden zusammen mit Frau Dr. Frauke Steinmüller und Herrn Miroslav Androshchuk (Institut für Pathologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald) ausgewählt. Es handelte sich um repräsentative, eindeutig benigne Areale, meist im Randgebiet der Schnitte liegend

2.1.2. Kryokonserviertes Frischgewebe aus Operationspräparaten

Die Tumorgewebe von 49 untersuchten Mammakarzinompatientinnen stammen aus Operationspräparaten und wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff bei -196 °C kryokonserviert. Als Kontrollgewebe wurde gutartiges Brustdrüsengewebe von Patientinnen mit nicht malignen Brustdrüsenerkrankungen wie z.B. einer Mastopathie oder Material aus Reduktionsoperationen verwendet. Einige der 18 Präparate für die Kontrolle stammen von tumorfreiem Brustgewebe einer Mammakarzinompatientin. Das Einverständnis der Patientinnen wurde vor der Operation eingeholt. Ein positives Votum der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zur Durchführung der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen liegt vor (Az: 98-039 vom 01.04.1998).

2.1.3. Klassifizierung der untersuchten Mammakarzinome

Die Tumor-bezogenen diagnostischen Ergebnisse wurden bereits bei der Behandlung der Patientinnen bestimmt und konnten aus den Krankendaten entnommen werden. Es handelt sich insgesamt um 49 Mammakarzinome, 35 (71,5 %) vom duktalem, 10 (20,5 %) vom lobulärem und 4 (8 %) vom gemischten Typ (vgl. Tab 1).

	gesamt	ER/PR pos	Grading			N0	Her2/neu pos
			1	2	3		
duktal	35	27	1	21	13	23	9
lobulär	10	9	0	6	4	1	2
gemischt	4	4	0	4	0	2	0

Tab.1: Zusammensetzung histologischer Merkmale der untersuchten Mammakarzinomproben

2.2. Immunhistochemie

2.2.1. Geräte und Reagenzien

Geräte und Reagenzien, die bei mehreren Arbeitsschritten benötigt wurden, sind in den Tabellen 2 und 3 und in den nachstehenden Abschnitten einzeln aufgeführt.

Laborgerät	Hersteller
Feuchte Kammer	1 Aluminiumschale 25x25 cm ausgelegt mit angefeuchtetem Papier
Magnetrührer	UNIMAG-ARE
Objekträger: ChemMate Capillary Gap	Dako Cytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Pap Pen	G.Kisker, Steinfurt
Bildanalysenmikroskops Axioskop 2 MOT Zeiss	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
Kamera AxioCam Zeiss	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena

Tab.2: Laborgeräte Immunhistochemie

Chemikalien/Seren	Hersteller
Albumine Bovine Fraction-V	Serva, Heidelberg
Borg Decloaker (ph = 9,5)	Sanova Pharma GmbH, Wien
Eukitt (Eindeckmedium)	O. Kindler GmbH, Freiburg
Mayer's Häkalaunlösung	Waldeck GmbH & CoKG, Münster
Pertex (Eindeckmedium)	Medite GmbH, Burgdorf
Kit	Hersteller
Chem Mate™ Detection Kit 5001 Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse	Dako Cytomation Denmark A/S Glostrup, Dänemark Diese gebrauchsfertige Antikörperlösung enthält biotinylierte Anti-Maus und Anti-Kaninchen Immunglobuline in gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Natriumazid.

Tab.3: Chemikalien Immunhistochemie

2.2.2. Lösungen und Puffer

- Phosphate Buffered Saline (PBS), pH = 7,4
- BSA/PBS-Blocking-Lösung, 5% (w / v)
- BSA (bovines Serumalbumin)
- Triton X-100-Lösung, 0,2% (v / v): 200 µl Triton X-100 werden in 100 ml PBS unter Rühren unter Erwärmung auf 50 °C gelöst.
- TRIS/Tween-Puffer pH=7,45: 8,78 g Natriumchlorid, 0,9 g Tris Base, 6,85 g Tris-HCl, und 300 µl Tween-20 werden in 1000 ml aqua bidest gelöst.

2.2.3. Antikörper

Anti-Rad51-Antikörper (1G8, Buchhop et al., 1996)

Es handelt sich um einen monoklonalen Antikörper, der die Aminosäuren 16-20 des humanen Rad51 als Antigen erkennt. Der Antikörper wurde in der eigenen Arbeitsgruppe hergestellt und in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Untersuchungen mit diesem Antikörper an Paraffinmaterial wurden bereits zuvor durchgeführt (Buchhop et al., 1996).

Anti-Ki-67-Antikörper (MIB-1, Oncogene Research Products, San Diego, USA) Der monoklonale Maus-Antikörper ermöglicht den Nachweis von humanem Ki-67. Bindungspunkt ist das C-terminale Ende des Proteins. Dieser Antikörper ist an in Paraffin eingebettetem Gewebe verwendbar.

2.2.4. Färbeprotokoll

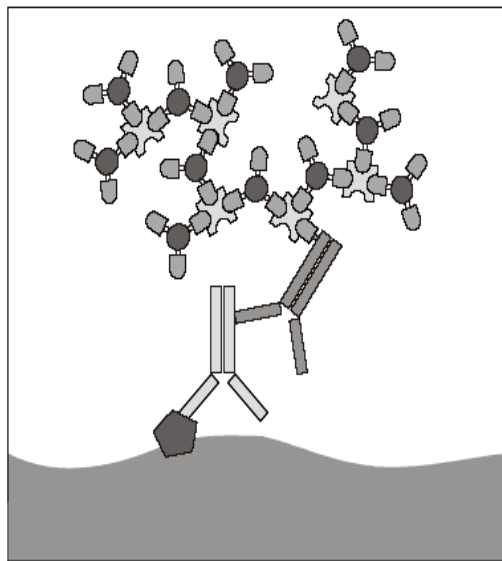
Das folgende Protokoll zum immunhistochemischen Nachweis von Rad51 auf Mammakarzinom-Gewebeschnitten wurde in unserer Arbeitsgruppe etabliert.






Zur Vorbehandlung wurden die Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe nach dem Zeitplan in Tabelle 4 entparaffiniert.

Xylol	3 x 10 min
Ethanol (100%)	2 x 5 min
Ethanol (80%)	2 min
Ethanol (80%)	1 min
Ethanol (70%)	1 min
Ethanol (50%)	1 min
Tris/Tween Puffer	1 min

Tab.4: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung der Mammakarzinom-Paraffinschnitte

Die Demaskierung erfolgte in Borg Decloaker (Sanova Pharma Wien) für 45 min im Dampfgarer (Multi Gourmet, Braun GmbH, Kronberg/Taunus). Dieser Vorgang dient der Unterstützung der hitzeinduzierten Antigendemaskierung im Temperaturbereich von 90-95 °C. Um den Verbrauch der nachfolgend eingesetzten Substanzen möglichst gering zu halten, wurde der Gewebebereich auf dem Objektträger mit einem Pap-Pen (Kisker, Steinfurt) umrahmt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern Anti-Rad51-Antikörper bzw. Anti-Ki-67-Antikörper (MIB-1 vgl. 2.2.3) erfolgte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 min. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Objektträger mit Tris/Tween-Puffer gespült. Zur Detektion des Primärantikörpers wurden die Präparate in einer Lösung mit gebrauchsfertigem biotinylierten Sekundärantikörper (biotynylated secondary antibody, aus dem Kit 5001 (Chem Mate™ Detection Kit, Dako, Glostrup/Denmark) für 15 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nicht gebundene Zweitantikörper wurden wiederum in TRIS/Tween-Puffer ab gespült. Zur Signalspezifisierung wurden die endogenen Peroxidasen mit der „peroxidase blocking solution“ (Chem Mate™ Detection Kit, Dako, Glostrup/ Denmark) dreimal für 5 min bedeckt und danach mit TRIS/Tween-Puffer gespült. Die Schnitte wurden für 15 min mit dem „Streptavidin HRP-Komplex“ (Chem Mate™ Detection Kit, Dako, Glostrup/Denmark) inkubiert. Diese Lösung enthält einen Komplex aus Streptavidin-Biotin. An das Streptavidin ist das Enzym Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert. Durch mehrfache Bindungsstellen des Streptavidins für Biotin entsteht durch Vernetzungen ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex mit mehreren HRP-Enzymen, wodurch das Signal verstärkt wird. Abbildung 3 verdeutlicht das Prinzip der Färbemethode.

**Abb.3: Prinzip der Färbemethode**

-  Antigen
-  Primärantikörper
-  biotinylierter Sekundärantikörper
-  Streptavidin
-  biotinylierte Meerrettichperoxidase

Im Anschluss erfolgte die Färbung der Gewebeproben mit Chromogen DAB (Chem Mate™ Detection Kit, Dako, Glostrup/Denmark) für exakt 8 min, um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten. Das an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidaseenzym reagiert mit dem Chromogen und führt zu einer Braunfärbung der Antikörper gebundenen Bereiche. Die Färbelösung 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid aus dem Kit 5001 wurde in einer Konzentration von 1:50 eingesetzt. Anschließend wurde die Färbung mit Leitungswasser gespült. Für die Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit Hämalaun-Färbelösung nach Mayer für 3 min gefärbt. Durch Bläuen für 5 min unter fließendem Wasser wurde die Reaktion beendet und überschüssige Färbelösung entfernt. Für das Eindeckeln der Gewebeschnitte wurde ein Eindeckautomat der Firma Medite GmbH, Burgdorf/Deutschland verwendet. Vorher wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Präparate wurden jeweils für 15 min in 70 %igem Ethanol, in 96 %igem Ethanol, zwei Mal in 100 %igem Isopropanol und anschließend dreimal in Xylol inkubiert. Als Eindeckmedium wurde Pertex® (Medite, Burgdorf) verwendet, das auf hydrophober Basis aufgebaut ist.

2.2.5. Kontrollen für unspezifische Färbungen

Negativkontrolle

Eine Negativkontrolle wurde stichprobenartig an Tumorpräparaten ohne Primärantikörper, also nur dem Lösungsmedium ohne Antikörper, durchgeführt. Die übrigen Färbebedingungen entsprachen dem unter 2.2.4. beschriebenen Färbeprotokoll.

Positivkontrolle

Als qualitative Positivkontrolle für das Färbeverfahren diene bei jeder Färbung die gleichzeitige Färbung des jeweiligen Schnittes mit einem Ki-67 Antikörper, da es sich hierbei um einen sehr zuverlässigen Antikörper-Nachweis beim Mammakarzinom handelt. Bei der Etablierung des Färbeverfahrens dienten Gewebeschnitte eines Blasen- bzw. Pankreaskarzinoms als Positivkontrolle mit bekannter Rad51 Expression, die von Herrn Prof. Dr. Stefan Krüger, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Lübeck zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.6. Auswertung der gefärbten Präparate

Zur Auswertung wurden die Präparate zunächst mit Hilfe des Bildanalysenmikroskops Axioskop 2 MOT Zeiss und der Kamera AxioCam Zeiss (beide Fa. Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) in 20-facher Vergrößerung digitalisiert. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines Computer gestützten Bildanalyseprogramms („PiClick Image Analysis“, Opitz, 2001) von mindestens 500 Tumorzellen der invasiven Tumorzellbereiche bzw. der gutartigen Bereiche der zur Kontrolle ausgewählten Paraffinschnitte. Die Auszählung erfolgte nach dem „Positive Stained Cell Index“ (PCI) (Linder et al., 1997), der den prozentualen Teil positiv gefärbter Zellkerne an der Gesamtzahl der Tumorzellkerne im analysierten Präparateausschnitt beschreibt. Für die positive Bewertung war eine deutliche Kernfärbung der einzelnen Tumorzelle ausschlaggebend. Eine evtl. vorhandene zytoplasmatische Färbung blieb unberücksichtigt.

2.3. mRNA-Nachweis

2.3.1. Geräte und Reagenzien

Geräte	Typ	Hersteller
Homogenisierer	Ultra Thurrax T25	IKA Labortechnik, Staufen
Zentrifugen	Universal 32	Hettich, Deutschland
	Biofuge fresco	Heraeus, Deutschland
Photometer	Typ Helius gamma	Unicam, USA
	UV-Präzisionsküvette	Hellma, Deutschland
PCR-Maschine	PTC-200 Peltier Cyclor	MJ Research, USA
Realtime-PCR-Maschine	DNA Engine Opticon 2	MJ Research, USA
Realtime-Software	Opticon Monitor Vers. 3.1.	MJ Research, USA
PCR-Platte	96 well Multiply-PCR plate	Sarstedt, Deutschland

Tab.5:
Geräte
mRNA-
Nachweis

Chemikalien	Hersteller
Trizol	Invitrogen GmbH, Deutschland
Chloroform	Merck
Isopropylalkohol	J.T. Baker
Ethanol	Merck
RNAse freies H ₂ O	Qiagen, Deutschland
Reagenzien	Hersteller
Random Primer	Fermentas
dNTP Mix	NEB, USA
Kits	
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Deutschland
Platinum [®] Quantitative PCR SuperMix-UDG	Invitrogen GmbH, Deutschland

Tab.6: Reagenzien mRNA-Nachweis

2.3.2. RNA-Isolierung

Für die Untersuchung der mRNA-Expression wurde Mammakarzinomgewebe in flüssigem Stickstoff (N₂; -196 °C) gelagert. Ein Gewebestück von 200 bis 300 mg Gewicht wurde in gefrorenem Zustand mit dem Skalpell abgetrennt und zerkleinert. Das zerkleinerte

Gewebe wurde in 3 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) mit einem Ultra-Thurrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen, um die Lysis der Zellen zu ermöglichen. Um die groben Zellbestandteile sowie das gelöste Fett aus der Probe zu entfernen wurde der Ansatz mit 12.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die fettige Oberphase wurde vorsichtig entfernt und der verbliebene Überstand in ein neues Gefäß überführt, ohne das Pellet zu überführen. Danach wurden zur Abtrennung der mRNA von organischen Substanzen 0,5 ml Chloroform zugegeben, kräftig gemischt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation (12.000 x g, 4°C) entstanden drei Phasen: eine untere rötliche Phenol/Chloroform-Phase, eine weiße Zwischenphase, die das Protein enthielt und oben die wässrige Phase mit der mRNA. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Um die gewonnene mRNA zu präzipitieren, wurde die RNA-Lösung mit 1,5 ml Isopropylalkohol gemischt und bei RT 10 min inkubiert. Die Proben wurden für 10 min mit 12.000 x g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgeschüttet. Das durchscheinende Pellet wurde dann mit 1,5 ml 75 %igem Ethanol nochmals für 5 min bei 7500 x g bei 4°C zentrifugiert, um es zu waschen. Nach dem Abschütten des Ethanols wurde das Pellet für 5 min getrocknet. Die mRNA wurde in 50 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration (Photometer Typ Helius gamma) der erhaltenen RNA wurde eine 1 : 20 Verdünnung hergestellt. Die RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.3. cDNA-Synthese

Die Menge von jeweils 1 µg RNA wurde für die Synthese der cDNA nach den Angaben des Herstellers mit der reversen Transkriptase SuperScript™-II (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Zum Starten der Polymerisation wurden Random-Hexamere (Fermentas GmbH, St.Leon-Rot/Deutschland) verwendet.

Reagenz	Menge
RNA	1 µg
Random-Hexamere (100 ng/µl)	1 µl
dNTP (10 mM each)	1 µl
5x First Strand Buffer	4 µl
DTT	2 µl
reverse Transkriptase	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Tab.7: Ansatz der cDNA-Synthese
für jeweils 1 µg RNA Probe

Die RNA, Random-Hexamere, dNTP und Wasser wurden zusammengegeben und bei 65 °C für 5 min erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Danach wurde das Gemisch auf Eis abgekühlt. 5-fach First Strand Puffer und DTT wurden dazugegeben und der Ansatz für 2 min bei 25 °C inkubiert, damit die Random-Hexamer mit der RNA hybridisieren. 1 µl der reversen Transkriptase wurde bei 25 °C vorsichtig mit der Pipettenspitze eingemischt und die Reaktion wurde zunächst für 2 min bei 25 °C gestartet, bevor sie bei 42 °C für 50 min fortgesetzt wurde. Für die Inaktivierung des Enzyms folgte die Inkubation bei 70 °C für 15 min.

2.3.4. Realtime PCR

Das Realtime PCR Verfahren ermöglicht eine Quantifizierung des gesuchten Zielsequenz-Amplikons noch in der exponentiellen Phase der Reaktion. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen. Sie erreicht gegenüber der konventionellen PCR, deren Datenerhebung in der Sättigungsphase der Reaktion liegt, eine höhere Genauigkeit. Die angewandte optische Methode des SYBR Green-Systems beruht auf der Einlagerung von Fluoreszenzmolekülen in die kleine Furche von doppelsträngigen Nukleinsäuren (dsDNA). Durch kurzwelliges Licht (488 nm) angeregt, emittiert die Substanz langwelliges Licht (520 nm), dessen Intensität mit zunehmender Quantität an dsDNA steigt. Dieses Fluoreszenzsignal verhält sich proportional zum angereicherten DNA-Produkt und ermöglicht also den Rückschluss auf die Ausgangsmenge der eingesetzten Zielsequenz-cDNA. In der Realtime PCR werden als Maß für die Quantifizierung der Startmenge die sog. Ct oder CP (= Crossing Point) Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR-Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am Ct befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Im Falle einer 100%igen Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Ein um einen PCR-Zyklus verringerter Ct entspricht der doppelten Menge an eingesetzter cDNA; respektive mRNA Startmenge. Ein großer Vorteil der Realtime PCR ist die verringerte Kontaminationsgefahr, da das PCR-Amplifikat nicht mehr auf ein Agarosegel mit zytotoxischem Ethidiumbromid aufgetragen wird. Zur Differenzierung zwischen spezifischem und unspezifischem Produkt und um auszuschließen, dass keine Nebenprodukte amplifiziert werden, wurde bei jeder Probe eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Master Mix	[μ l]
SYBR Green Super Mix	12,5
Primer Mix (5 μ mol)	1,0
Wasser	6,5
cDNA, Verdünnung 1: 7,5	5,0
Gesamtvolumen	25

Tab.8: PCR Ansatz

In Vorbereitung der Realtime-PCR wurde die cDNA direkt 1 : 7,5 verdünnt.

Zunächst wurden alle für die Reaktion notwendigen Reagenzien auf Eis aufgetaut und der Master Mix (vgl. Tab 8) hergestellt. Die cDNA jeder Probe wurde in Duplices (je 5 μ l) auf die 96 Well Platte aufgetragen. Nach Zugabe der 20 μ l Master Mix je well wurde die Platte für 1 min mit 1000 rpm zentrifugiert, um die Flüssigkeit vom Rand am Boden zu sammeln. Danach verlief die Reaktion für alle Gene im OPTICON 2 Cycler (MJ Research, USA) nach folgendem Protokoll:

1. 50 °C für 2 min (Aktivierung der Polymerase)
2. 95 °C für 2 min (Denaturierung)
3. 95 °C für 15 s (wiederholte Denaturierung)
4. 60 °C für 50 s (Annealing und Synthese)
5. Ablesen des Fluoreszenzsignals
6. Wiederholung der Schritte 3-5 in 39 Zyklen
7. Schmelzkurvenanalyse 65 °C - 95 °C in 0,3 °C Schritten
8. Ende

Tab.9: PCR Protokoll

2.3.5. Auswahl der Referenzgene

Zur Normalisierung der Ergebnisse, ist es erforderlich, die Rad 51-Expression mit der Expression von Referenzgenen, die auch „housekeeping“ Gene genannt werden, in Beziehung zu setzen. Die Voraussetzung, die ein Referenzgen erfüllen sollte, ist eine möglichst gleichbleibend starke Expression in alle Zuständen der untersuchten Gewebe. Insbesondere sollte es möglichst geringe Schwankungen im Vergleich von malignem und benignem Mammagewebe zeigen und möglichst wenig in dem Gewebe reguliert werden. Die Expressionsstärke des Referenzgens sollte in einem vergleichbaren Bereich mit dem des Zielgens liegen. Die verwendeten Referenzgene wurden ausgesucht, da sie bereits in einer Reihe von Studien über Brustkrebs eingesetzt wurden (Faneyte et al., 2002, Rohde et al., 2005, Szabo et al., 2004, Vandesompele et al., 2001).

Für die Auswahl des Referenzgens

Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1).

Accession Number: NM 00194, Amplikon: Basenpaare 449 bis 532, Größe: 83 bp

haben wir uns an der Studie von Di Nicolantonio F (2005) orientiert.

Der Einsatz von Porphobilinogen Deaminase (PBGD),

Accession Number: X04217, Amplikon: Basenpaare 836 bis 906, Größe 70 bp

bei Untersuchungen mit Brustkrebs wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben (Faneyte et al., 2002, Rohde et al., 2005).

2.3.6. Auswahl der Primer

HPRT wurde wie in der Arbeit von Di Nicolantonio F (2005) verwendet. Das Design der Primer für PBGD, Rad51-1 (#17) und Rad51-2 (#36) wurde mit Hilfe des Programms der Universal Probe Library for Human der Fa. Roche Applied Science nach den hierfür üblichen Kriterien vorgenommen:

- Länge 19-22 bp, GC Gehalt 40-60%
- Vermeiden von internen Nukleotidwiederholungen
- Vermeiden von zueinander komplementären Bereichen in den Primern
- ähnliche Schmelztemperaturen

Laut Literatur existieren verschiedene Splicevarianten des Rad51 Gens.

Splicevariante 1 (GenBank accession number: NM_002875) enthält die volle Transkriptlänge und entspricht der Isoform (1). In Splicevariante 2 (GenBank accession number: NM_133487) fehlt ein Segment (Exon 4 bis 6) und entspricht der Isoform (2) bei der, verglichen mit der Isoform 1, ein 97 aa internes Segment fehlt. Um eine eventuell vorhandene Splicevariante in dem zu untersuchenden Gewebe nachzuweisen, wurden Primerpaare ausgewählt, mit denen entweder beide Rad51 Isoformen oder nur die Splicevariante 1 detektiert werden konnte (vgl. Tabelle 10).

Primer	Sequenz	Transkription	Position
Probe (#17) forward primer	CGTTCAACACAGACCACCAG	beide Varianten	848 - 867 bp in Variante 1 und 557 - 576 bp in Variante 2
Probe (#17) reverse primer	CGGTGGCACTGTCTACAATAAG		943 - 922 bp in Variant 1 und 652 - 631 bp in Variante 2
Probe (#36) forward primer	GGCGGTCAGAGATCATACAGA	nur Variante 1	551 - 571 bp in Variante 1
Probe (#36) reverse primer	AGATCCAGTCTCAATTCCACCT		630 - 609 bp in Variante 1

Tab.10: Primer Sequenzen der Primer Nr. 17 (Rad51-1) und Primer Nr. 36 (Rad51-2) der Universal Probe Library for Human der Fa. Roche Applied Science

Voruntersuchungen zum Test auf Spezifität der Primer wurden mit cDNA aus der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 durchgeführt.

	Sequenz	Lieferant
PBGD 70 bp	for AGC TAT GAA GGA TGG GCA AC	Roche Applied Science/ Deutschland
	rev TTG TAT GCT ATC TGA GCC GTC TA	
HPRT 83 bp	for TCA GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG T	Metabion, Martinsried/ Deutschland
	rev AGT CTG GCT TAT ATC CAA CAC TTC G	

Tab.11: Primersequenzen/Lieferanten der Referenzgene

2.3.7. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der immunhistochemischen Ergebnisse wurde mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism (Version 5.01) durchgeführt. Die als PCI gemessene Proteinexpression lieferte Prozentangaben als Ergebnisse (vgl. 2.2.6). Es kamen nicht-parametrische Tests zur Anwendung, da die Verteilung der Werte im untersuchten Tumormaterial zum einen nicht normalverteilt war und sich darüber hinaus aus Prozentwerten nicht ohne weiteres Mittelwerte bilden ließen. Nicht-parametrische Tests sind unempfindlich gegen vereinzelte Messfehler. Bei Normalverteilung wären sie allerdings weniger effizient als parametrische Verfahren (Zöfel, 1992). Als Signifikanztest zum Vergleich von zwei Stichproben wurde der U-Test nach Mann und Whitney verwendet. Bei mehr als zwei Stichproben diente der H-Test nach Kruskal und Wallis als Globaltest. Wenn in diesem Test signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben festgestellt wurden, schloss sich ein paarweiser Vergleich der Einzelstichproben mit dem U-Test an, der in diesem Fall nach Bonferroni korrigiert wurde (Sachs, 1997).

Die PCR Ergebnisse wurden mit dem REST-XL Programm (REST = Relative Expression Software Tool, Pfaffl, 2002) ausgewertet. Diese Software fasst die Gruppen als Mittelwerte zusammen und berechnet daraus die mittleren Expressionsunterschiede der Gruppen, normalisiert über ein bestimmtes Referenzgen sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen. Die Ergebnisse wurden statistisch getestet und als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0,05$) angenommen. Die Statistik basiert auf einem sehr robusten und von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest, bei dem beliebig viele Randomisierungen und Wiederholungen durchgeführt werden können.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die Rad51-Expression in Tumoren der Brust mit immunhistochemischem Proteinnachweis und auf mRNA Ebene in der Realtime-RT-PCR untersucht.

3.1. Immunhistochemischer Nachweis von Rad51 in Mammakarzinomgewebe und in gesundem Gewebe der Brust

In den Präparaten, die mit dem 1G8 Antikörper (Buchhop et al., 1996) immunhistochemisch gefärbt wurden, zeigte sich die Rad51-Expression durch braune Färbung der Zellkerne. In Zellen ohne Rad51 Expression ist die blaue Färbung des Zellkerns durch die Hämatoxylin-Gegenfärbung zu sehen. Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte computergestützt mit dem Bildanalyseprogramm „PIClick“, das von Herrn Dr. Sven Opitz im Institut für Humangenetik des UK S-H, Campus Lübeck, entwickelt wurde (2001). Von jedem der 49 Tumore wurden drei digitale Mikrofotografien aus repräsentativen Arealen in 20-facher Vergrößerung erstellt (AxioCam Zeiss, Jena).

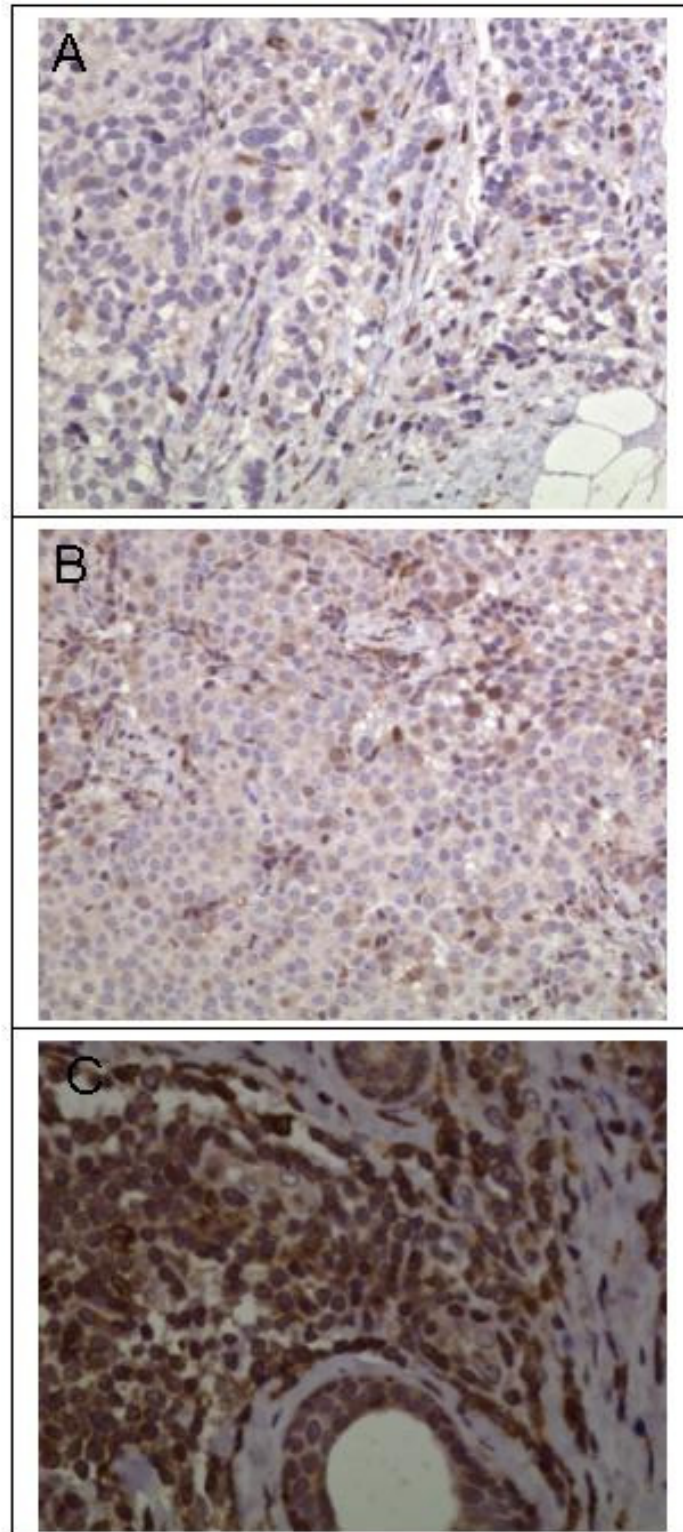


Abb.4: Bildbeispiele der immunhistochemischen Färbung von drei Mammakarzinom-Paraffinschnitten mit dem Rad51-Antikörper. Die formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Mammakarzinomschnitte wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen Rad51 immunhistochemisch analysiert. Braun gefärbte Zellkerne zeigen eine Rad51-Expression an und sind als positiv zu werten. Blau gefärbte Zellkerne gelten als negativ. Bild A: Beispiel mit schwacher Rad51-Protein-Expression (9 %). Bild B: intermediär (15 %) Bild C stark positiv (80 %) in (20-fache Vergrößerung)

3.1.1. Vergleich der Rad51 Proteinexpression in Tumorgewebe und gutartigem Brustgewebe

Insgesamt wurden je Präparat im Durchschnitt 597 Tumorzellen ausgewertet. Die Auszählung im Tumorgewebe ergab einen Mittelwert von 22 % positiver Zellen und einem Median von 15 %. Der geringste Wert ist 0,5 % und der höchste 88 %. Die Stärke der Rad51 Expression wurde nach dem PP-Score (Prozentsatz positiver Zellen, Friedrich et al., 1999) in vier Gruppen eingeteilt: keine (0 %), niedrige (1-10 %), moderate (11-25 %) und starke Expression (> 25%). In Abbildung 5 ist die Verteilung der 49 Tumorproben auf die vier Gruppen dargestellt.

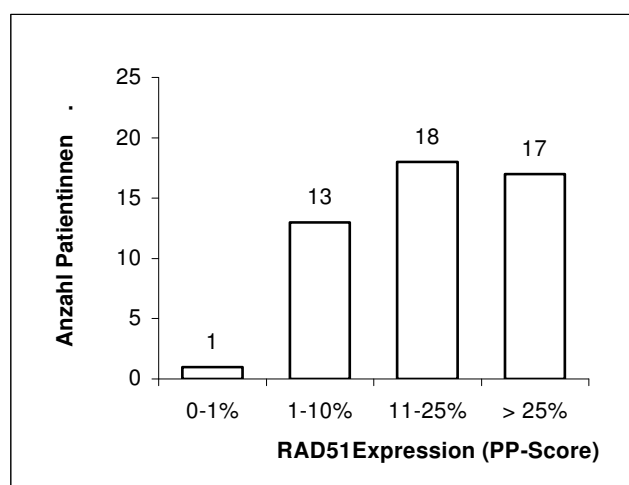


Abb.5: Gruppierung der Tumorproben nach Rad51-Immunreaktion nach dem PP-Score

Bei der Auszählung der elf als Kontrolle ausgewählten gutartigen Bereiche von den insgesamt 49 Mammagewebschnitten wurden pro Paraffinschnitt durchschnittlich 686 Zellen ausgewertet. Der Anteil Rad51 positiver Zellen lag zwischen 4,5 % und 11 %. Der Mittelwert (MW) lag bei einem PCI-Wert von 7,2 %. Abbildung 6 zeigt die Proteinexpression in benignem Gewebe im Vergleich zu malignem Gewebe.

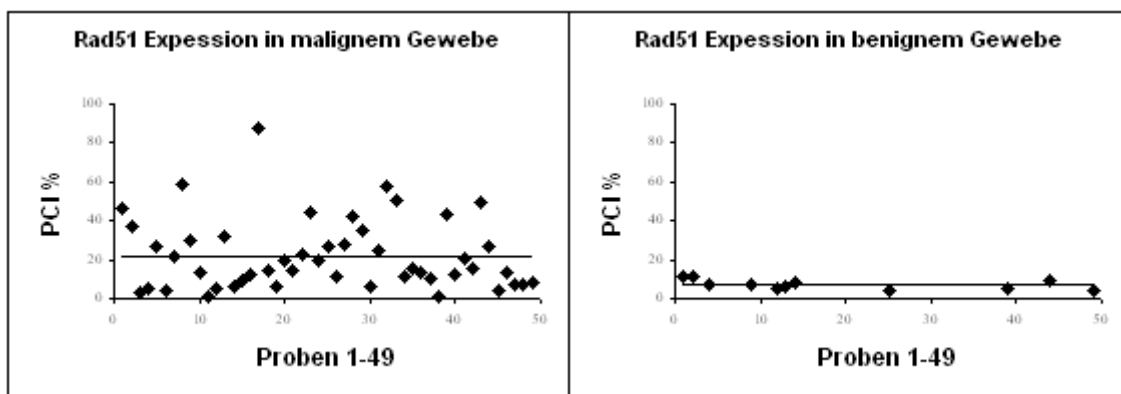


Abb.6: Einzelwerte der Rad51-PCI-Werte von 49 Mammakarzinomen und 11 gutartigen Gewebeanteilen im Vergleich, Linie: _____ Darstellung der Mittelwerte

Bei der statistischen Überprüfung mit dem U-Test nach Mann und Whitney ergab sich ein signifikanter Unterschied der Rad51-Proteinexpression ($p = 0,0012$) in malignem und benignem Brustgewebe. Abbildung 7 verdeutlicht die PCI-Mittelwerte der Rad51-Proteinexpression in malignem und benignem Gewebe.

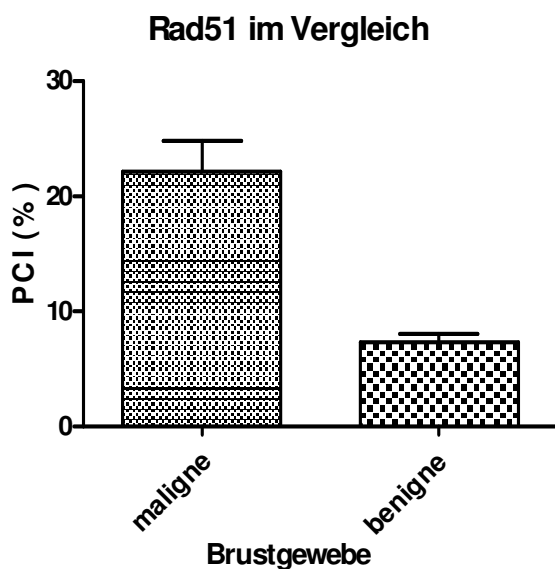


Abb.7: PCI-Mittelwerte der Rad51-Protein-Expression in malignem und benignem Gewebe

3.1.2. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit klinischen Parametern

In der Tabelle 12 sind die jeweils klinisch-pathologischen Variablen den vier Gruppen nach dem PP-Score gegenüber gestellt. Die einzelnen Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln nochmals erläutert.

Parameter	Anzahl	PP-Score der Rad51- Immunreaktion			
		0 (0-1 %)	1 (1-10 %)	2 (11-25 %)	3 (> 25 %)
Typ					
ductal	35	1	10	12	12
lobulär	10	0	4	2	4
gemischt	4	0	1	2	1
Tumorgöße					
T1	16	1	3	7	5
T2	24	0	6	9	9
T3	3	0	0	2	1
T4	6	0	4	0	2
Nodalstatus					
N0	29	1	5	12	11
N1	10	0	3	4	3
N2	6	0	2	1	3
N3	3	0	2	1	0
NX	1	0	1	0	0
Grading					
G2	31	0	8	11	12
G3	17	1	5	6	5
ER/PR					
pos	40	0	12	14	14
neg	8	1	0	4	3
Her2/neu					
pos	11	0	4	4	3
neg	37	1	8	14	14

Tab.12: Rad51-Proteinexpression nach dem PP-Score innerhalb der klinischen Gruppen

3.1.2.1. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit der Expression des Her2/neu Rezeptors

Der PCI-Mittelwert der Rad51-Expression bei Her2/neu-negativen Karzinomen ist tendenziell höher als bei Her2/neu-positiven Karzinomen. Bei dem statistischen Vergleich

mit dem U-Test nach Mann und Whitney ergab sich hier allerdings keine statistische Signifikanz.

Parameter	Klasse	n/Klasse	PCI (%)	H-Test	U-Test
			Mittelwert		
Her2	pos	11	18,75		
	neg	37	23,56	nn	pos:neg: ns (p = 0,2618)

Tab.13: Rad51-Proteinexpression bezogen auf den Her/2neu-Status anhand der PCI-Mittelwerte, Statistische Analyse: nn: Test nicht notwendig, ns: nicht signifikant, H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney

3.1.2.2. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit der TumorgroÙe

Ein Zusammenhang der Rad51-Überexpression mit dem Tumorstadium lässt sich bei den Tumorstadien T1 und T2 erkennen. Hier nimmt der Anteil Rad51-positiver Tumorzellen entsprechend der TumorgroÙe zu, während das T3 Stadium wieder einen etwas geringeren PCI aufweist. Der Anteil der Rad51 positiven Zellen der T4-Tumore entspricht in etwa dem der T1-Tumore. Die statistische Globalanalyse mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis zeigte keine signifikanten Unterschiede in diesen Gruppen.

Parameter	Klasse	n/Klasse	PCI(%) Mittelwert	H-Test	U-Test
TumorgroÙe	T1	16	19,8		
	T2	24	23,8	ns (p = 0,825)	nn
	T3	3	20,23		
	T4	6	22,67		

Tab.14: Rad51-Proteinexpression bezogen auf die TumorgroÙe anhand der PCI-Mittelwerte, Statistische Analyse: nn: Test nicht notwendig, ns: nicht signifikant, H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney

3.1.2.3. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit dem Tumorigradung

Beim Tumorigradung zeigt sich in diesem Kollektiv mit zunehmender Entdifferenzierung (G3) eine Abnahme der Rad51 positiven Zellen. Beim statistischen Vergleich der Gruppen „G2“ und „G3“ wird keine statistische Signifikanz erreicht.

Parameter	Klasse	n/Klasse	PCI (%) Mittelwert	H-Test	U-Test
Grading	G1	1	25		
	G2	31	24	nn	G2:G3: ns (p = 0,1529)
	G3	14	18,5		

Tab.15: Rad51-Proteinexpression bezogen auf das Tumorigradung im Gesamtkollektiv anhand der PCI-Mittelwerte, Statistische Analyse: nn: Test nicht notwendig, ns: nicht signifikant, H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney

Bei der Betrachtung des Tumorgradings nur innerhalb der Gruppe der duktal invasiven Mammakarzinome (n=34) zeigt sich eine Verstärkung des Trends, dass mit zunehmendem Grading der PCI-Mittelwert eher abnimmt, statistisch auch hier ohne Signifikanz.

Parameter	Klasse	n/Klasse	PCI (%) Mittelwert	H-Test	U-Test
duktal invasiv	Grading				
	G2	21	26,25	nn	p = 0,1366
	G3	13	15,29		

Tab.16: Rad51-Proteinexpression bezogen auf das Tumorgading in der Untergruppe der duktal invasiven Karzinome anhand der PCI-Mittelwerte, Statistische Analyse: nn : Test nicht notwendig, ns : nicht signifikant, H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney

3.1.2.4. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit dem Tumortyp

Bezüglich der Karzinomtypen lässt sich kein Zusammenhang mit erhöhter Rad51-Expression erkennen. Die Mittelwerte der Rad51 positiven Zellen des duktal invasiven, lobulär invasiven und gemischten Typs unterscheiden sich nur unwesentlich. Statistisch ergibt sich hier auch keine Signifikanz.

Parameter	Klasse	n/Klasse	PCI (%) Mittelwert	H-Test	U-Test
Typ	duct	35	22,15		
	lob	10	22,47	ns (p = 8853)	nn
	gem	4	21		

Tab.17: Rad51-Proteinexpression bezogen auf den Tumortyp anhand der PCI-Mittelwerte, Statistische Analyse, nn: Test nicht notwendig, ns: nicht signifikant, H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney

3.1.2.5. Rad51-Proteinexpression koordiniert mit dem Sexualsteroidrezeptorstatus und dem Nodalstatus

Bei der Betrachtung in Bezug auf den Sexualsteroidrezeptorstatus liegt der PCI-Mittelwert der Sexualsteroid-negativen Tumore leicht über dem Wert der Sexualsteroid-positiven. In Bezug auf den axillären Nodalstatus lassen sich keine eindeutigen Zusammenhänge mit einer erhöhten Rad51-Proteinexpression erkennen. In der Gruppe „N2“ lag der PCI-Wert leicht über dem Mittelwert, in der Gruppe „N3“ weit unter dem Mittelwert. Auch die statistische Analyse ergab bei keiner der Beziehungen eine statistische Signifikanz (vgl. Tabelle 18).

Parameter	Klasse	n/Klasse	PCI (%) Mittelwert	H-Test	U-Test
Nodalstatus	N0	29	22,02		
	N1	10	24,86	ns (p = 0,2763)	nn
	N2	6	28,56		
	N3	3	7,47		
ER/PR	pos	40	22		
	neg	8	24,36	nn	pos:neg: ns (p = 0,2996)

Tab.18: Rad51-Proteinexpression bezogen auf den Hormonrezeptor- und Nodalstatus
anhand der PCI-Mittelwerte, Statistische Analyse: nn: Test nicht notwendig, ns: nicht signifikant, H-Test nach Kruskal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney

3.2. Expression der Rad51-mRNA

3.2.1. Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung der im Zielgewebe exprimierten Menge von mRNA im Vergleich zu einer Kontrollgruppe wird die Expression des Zielgens nicht per absoluter Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die ermittelten Ct-Werte des zu untersuchenden Gens werden auf ein zweites, nicht reguliertes Referenzgen bezogen. Die Normalisierung ist notwendig, um eine Verfälschung der Expressionsergebnisse durch Gewebe- und Matrixeffekte sowie Unterschiede in der Reaktion bei der Realtime PCR zu vermeiden. Die relative Quantifizierung lässt sich weiter optimieren, indem man die unterschiedlichen Realtime PCR Effizienzen der untersuchten Amplifikate mit berücksichtigt. Die Effizienz-korrigierte relative Quantifizierung mittels Realtime-RT-PCR kommt einer genauen mRNA Quantifizierung sehr nahe.

3.2.2. Ermittlung von Effizienzen der PCR-Reaktionen

Als Maß für die Qualität der Synthesereaktion bei der PCR gilt die Effizienz. Eine Steigung der Geraden m von $-3,32$ bedeutet, dass die Verdopplung der eingesetzten cDNA zu einer Verschiebung des Ct-Wertes um minus 1 führen würde. Dies entspräche einer idealen Effizienz von 2, bei der in jedem Zyklus eine Verdopplung der Amplifikate stattfinden würde. Die von dem Idealwert 2 abweichenden Effizienzen werden für jedes Primerpaar errechnet und fließen in die Quantifizierung der mRNA ein. Zur Berechnung der Effizienzen mit den verwendeten Primern für die Ziel- und Referenzgene wurden die Ct-Werte, die sich in der Realtime-PCR mit einer Verdünnungsreihe der verwendeten cDNA ergaben, ermittelt. Die Verdünnungsreihe wurde aus einer Mischung von Proben

der einzusetzenden cDNA in 1 : 5 Schritten hergestellt. Die Ct-Werte stiegen mit der Höhe der Verdünnung linear an. Aus der daraus resultierenden Steigung wurde die Effizienz mit folgender Formel berechnet.

$$E = 10^{-1/m} - 1$$

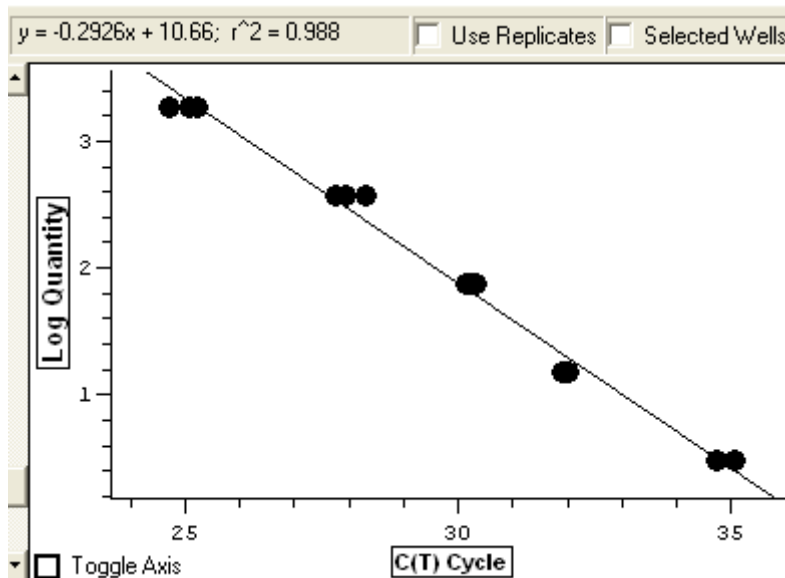


Abb.8: Realtime-PCR mit einer Verdünnungsreihe einer cDNA von Brustkrebsproben zur Ermittlung der Effizienz

Für jede Verdünnung wurden drei Werte ermittelt. Beispiel mit den Primern für Rad 51-1 (#17)

Die Effizienzen der beiden untersuchten Zielgene lagen bei 1,9 und 1,95 und waren damit nahe der optimalen Effizienz von 2. Die beiden Referenzgene wiesen eine Effizienz von 1,8 und 2,0 auf.

PBGD	HPRT	Rad 51-1 (#17)	Rad 51-2 (#36)
1,86	2	1,9	1,95

Tab.19: Mit Verdünnungsreihen von cDNA errechnete Effizienzen der Ziel- und Referenzgene

3.2.3. Gelelektrophoretische Überprüfung von Größen der erhaltenen Amplifikate

Alle PCR Ansätze erzeugten ein Produkt mit der zu erwartenden Lauflänge. Entsprechend der Sequenzen, die von den Primerpaaren amplifiziert werden sollten, entstand für Rad51-1(#17) ein Produkt von 96 Basenpaaren (bp), für Rad51-2 (#36) ein Produkt von 80 bp, für PBGD ein Produkt von 70 bp und für HPRT ein Produkt von 83 bp.

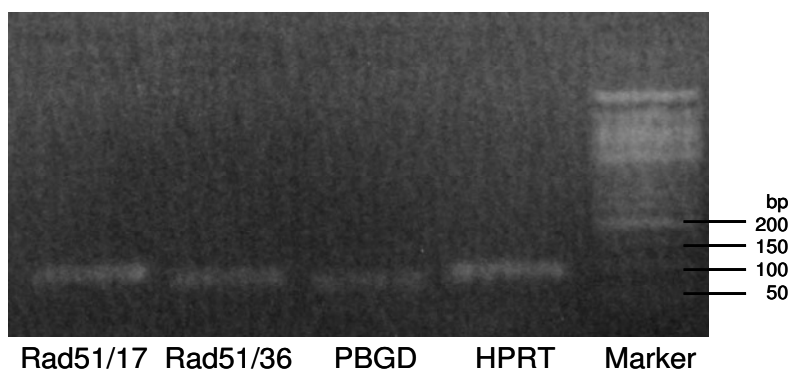


Abb.9: Nachweis der Größe von Amplifikaten. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Amplifikate wurde die DNA mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Die Lauflängen der Amplifikate für Ziel- und Referenzgene lassen auf deren ungefähre Größe schließen.

3.2.4. Schmelzkurvenanalyse

Um die Spezifität des Amplifikats zu überprüfen und auszuschließen, dass keine Nebenprodukte amplifiziert werden, wurde bei jedem PCR-Ansatz eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird nach Abschluss der PCR die doppelsträngige DNA stetig erwärmt und die Fluoreszenzintensität nach jeder Erwärmung um 0,3 °C gemessen. Wenn die Doppelstränge aufschmelzen, nimmt die Fluoreszenzintensität ab, weil das SYBR-Green von der DNA dissoziiert. Die spezifische Schmelztemperatur einer Nukleinsäure hängt von ihrer Länge und dem GC-Gehalt der DNA-Sequenz ab. Sie lässt sich in der Funktion $-dI/dT$ als einen Peak darstellen, an dem die Fluoreszenz am stärksten abnimmt. Wenn nur ein spezifisches PCR-Produkt vorliegt, entsteht ein einzelner Peak (vgl. Abbildung 10).

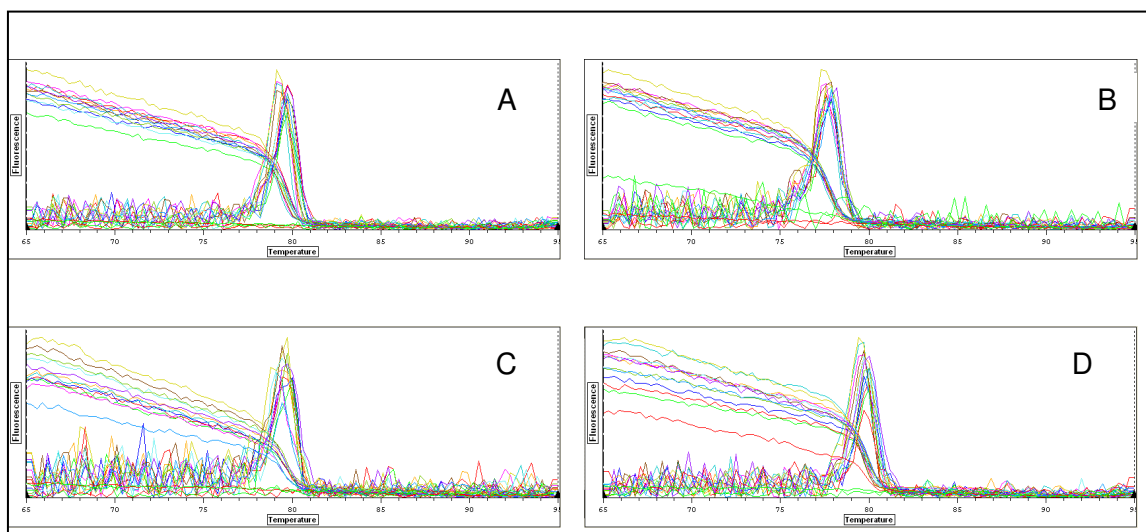


Abb.10: Schmelzkurvenanalyse der Primerpaare, Rad51-1 (#17) (A), Rad51-2 (#36) (B), PBGD (C), HPRT (D)

Für alle verwendeten Primerpaare (Rad51-1, Rad51-2, PBGD, HPRT) konnte eine jeweilige Spezifität des Amplifikates nachgewiesen werden.

3.2.5. Rad51 mRNA-Expression in Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Brustgewebe

3.2.5.1. delta ct - Methode

Es wurde zunächst nach der Doppelbestimmung für jede Probe der Mittelwert der Ct-Werte gebildet. Für jede Probe wurde die Differenz der zugehörigen Ziel- und Referenzgene errechnet (Δ Ct Wert) (Livak KJ, Schmittgen TD, 2002). Als Kontrolle diente der Mittelwert der Ct-Werte der 18 Proben von benignem Brustgewebe. Die Normalisierung erfolgte durch die Einbeziehung der Referenzgene nach der folgenden Formel (Pfaffl, 2002), unter Einbeziehung der zuvor ermittelten Effizienzen.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CP_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CP_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Abb.11: Formel zur Berechnung der Ratio der Rad51-Expression (Pfaffl, 2002)

Hieraus resultierte für jede Probe die n-fache Expression von Rad 51 im Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Brustgewebe in Relation zu den Referenzgenen (vgl. Anhang Tabelle 42). Die Berechnung der Mittelwerte der Einzelergebnisse ergab eine 3,35 bis 6-fach höhere Expression von Rad51 im Vergleich zu benignem Brustgewebe. Die unterschiedlichen Expressionswerte beziehen sich auf die beiden Zielgene in Relation zu dem jeweiligen Referenzgen, wie in Tabelle 20 nochmals dargestellt.

Zielgen/Referenzgen	Ratio der Rad51-Expressionen
Rad51-1(#17)/PBGD	5,42
Rad51-2(#36)/PBGD	6,00
Rad51-1(#17)HPRT	3,42
Rad51-2(#36)HPRT	3,35

Tab.20: Ratio der Rad51-Expression in Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Gewebe normalisiert mit dem jeweiligen Referenzgen

Es handelt sich um den Mittelwert der für jede Probe mit der delta-ct Methode errechneten Ratio

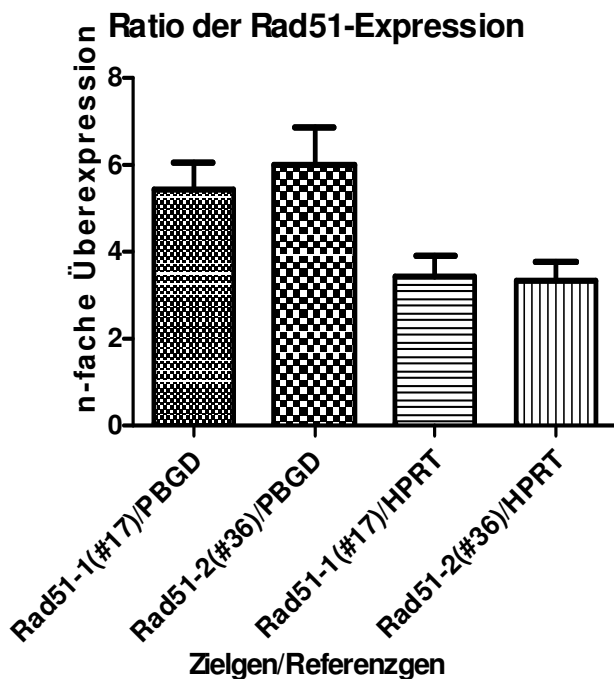


Abb.12: Ratio der Rad51-Expression in Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Gewebe normalisiert mit dem jeweiligen Referenzgen: dargestellt sind die beiden Zielgene Rad51-1 (#17) und Rad51-2 (#36), jeweils normalisiert mit den Referenzgenen PBGD und HPRT

3.2.5.2. Analyse mit dem REST-XL Programm

Bei einer Computer gestützten Analyse wurden die Ct-Werte mit dem REST-XL Programm (REST = Relative Expression Software Tool, Pfaffl 2002) ausgewertet. Diese Software fasst die Gruppen als Mittelwerte zusammen und berechnet daraus die mittleren Expressionsunterschiede der Gruppen, normalisiert über ein bestimmtes Referenzgen sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen. Die Ergebnisse werden statistisch getestet und die Expressionsunterschiede werden mit ihren Signifikanzlevels angegeben. Die Statistik basiert auf einem sehr robusten und von einer Normalverteilung unabhängigen Randomisierungstest, bei dem beliebig viele Randomisierungen und Wiederholungen durchgeführt werden können.

Als absolute Genexpression für Rad51 in malignem Gewebe nach dem Randomisierungstest mit dem REST-XL Programm ergibt sich eine Bandbreite von 2,5 – 3,9 für den jeweiligen Primer abhängig von der Normalisierung gegen das jeweilige Referenzgen. In Tabelle 21-23 sind die einzelnen Werte dargestellt.

Expressionsunterschiede normalisiert (PBGD)		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	3,913	p = 0,001
Rad51-2 (#36)	4,121	p = 0,001

Tab.21: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe normalisiert mit dem Referenzgen PBGD

(REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede normalisiert (HPRT)		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	2,462	p = 0,001
Rad51-2 (#36)	2,593	p = 0,001

Tab.22: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe normalisiert mit dem Referenzgen HPRT

(REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede nicht normalisiert		Signifikanzlevel
PBGD	5,56	p = 0,001
HPRT	8,836	p = 0,001
Rad51-1 (#17)	21,755	p = 0,001
Rad51-2 (#36)	22,916	p = 0,001

Tab.23: Ratio der Rad51-mRNA Expression zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe der verwendeten Referenzgene und Zielgene, nicht normalisiert

(REST-Programm, Pfaffl 2002)

3.2.6. Expression der Rad51 mRNA koordiniert mit den klinischen Tumordaten

Eingeteilt nach histologischen Charakteristika ergaben sich nach der delta-ct-Methode pro Parameter die Werte für die beiden Zielgene (Rad 51-1(#17) und Rad51-2 (#36), im Verhältnis zu beiden Referenzgenen (HPRT, PBGD). Die Tabelle 24 gibt eine Übersicht über die einzelnen Daten. Es handelt sich um einen Faktor der Überexpression, nach Gruppen zusammengefasst, verglichen an dem Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe.

Parameter	n/Klasse	Ratio der Rad51-Überexpression (Mittelwert)			
		Rad51(#17)/ PBGD	Rad51(#36)/ PBGD	Rad51(#17)/ HPRT	Rad51(#36)/ HPRT
Typ		PBGD	PBGD	HPRT	HPRT
ductal	35	5,82	5,98	3,57	3,37
lobulär	10	4,56	6,66	3,46	3,68
gemischt	4	4	4,56	1,97	2,4
Tumorgroße					
T1	16	5,76	5,59	4,11	3,58
T2	24	4,63	5,41	2,49	2,94
T3	3	5,72	12,74	2,34	2,88
T4	6	7,49	6,12	5,83	4,62
Nodalstatus					
N0	29	4,87	4,94	3,47	3,4
N1	10	5,2	6,45	2,39	2,74
N2	6	7,83	11,05	3,39	3,36
N3	3	5,07	4,21	4,35	3,66
Grading					
G1	1	5,78	5,80	1,37	1,37
G2	31	4,34	4,61	2,6	2,67
G3	14	7,36	8,56	5,03	4,7
ER/PR					
pos	40	6,92	9,05	2,94	2,84
neg	8	6,9	7,01	8,79	8,06
Her2/neu					
pos	11	4,37	4,51	4,17	4
neg	37	5,48	6,26	3,2	3,17

Tab.24: Gegenüberstellung der Rad51 mRNA-Expression mit den klinischen Tumordaten
Werte entsprechen der Ratio der Überexpression nach Auswertung gemäß der delta-ct-Methode, je nach Gruppe als Mittelwerte zusammengefasst, Typ: duktal, lobulär oder gemischtes Karzinom, n/Klasse : Fälle in einer Klasse, ER/PR: Östrogen/Progesteronrezeptorstatus, Her2/neu-Rezeptorstatus

3.2.6.1. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Tumorigradung

Eine deutliche Erhöhung der Rad51 mRNA-Expression mit zunehmender Entdifferenzierung des Mammakarzinomgewebes lässt sich beim Tumorigradung nachweisen. Im Vergleich der Gruppen G2 und G3 ist der Überexpressionsfaktor der Rad51 Expression bei G3 Tumoren mit 1,955 fast zweimal so hoch wie bei G2 Tumoren. Die statistische Analyse mit dem REST-XL Programm ergibt bei der Normalisierung mit dem Referenzgen HPRT einen signifikanten Expressionsunterschied (vgl. Tabelle 25).

In den folgenden Tabellen sind alle signifikanten Ergebnisse fett gedruckt.

Expressionsunterschiede normalisiert (HPRT) G2/G3		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	1,955	p = 0,027
Rad51-2 (#36)	1,763	p = 0,024

**Tab.25: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen
den Gruppen des Tumorigradings G2
gegen G3, normalisiert mit dem
Referenzgen HPRT**
(REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede normalisiert (PBGD) G2/G3		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	1,455	p = 0,3445
Rad51-2 (#36)	1,312	p = 0,519

**Tab.26: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen
den Gruppen des Tumorigradings G2
gegen G3, normalisiert mit dem
Referenzgen PBGD**
(REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede G2/G3 nicht normalisiert		Signifikanzlevel
PBGD	2,414	p = 0,133
HPRT	1,797	p = 0,425
Rad51-1 (#17)	3,513	p = 0,0925
Rad51-2 (#36)	3,168	p = 0,1175

**Tab.27: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen
den Gruppen des Tumorigradings G2
gegen G3, nicht normalisiert**
(REST-Programm, Pfaffl 2002)

3.2.6.2. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit der Tumorigröße

Der Vergleich der Werte der mRNA-Überexpression zwischen den Tumorigrößestadien T 1 bis T 4 zeigt in Bezug auf das Referenzgen HPRT eine Zunahme der Rad 51-Expression entsprechend der Tumorausdehnung. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Werte nach Normalisierung gegen HPRT lässt sich beim Vergleich der Klassen T1 und T2 gegen T3 und T4 zeigen (vgl. Tabelle 28-30).

Expressionsunterschiede normalisiert (HPRT) T1+T2/T3+T4		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	2,545	$p = 0,007$
Rad51-2 (#36)	1,707	$p = 0,066$

Tab.28: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen den Gruppen der Tumorgroße T1+T2 gegen T3+T4, normalisiert mit dem Referenzgen HPRT (REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede normalisiert (PBGD) T1+T2/T3+T4		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	1,862	$p = 0,084$
Rad51-2 (#36)	1,248	$p = 0,512$

Tab.29: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen den Gruppen der Tumorgroße T1+T2 gegen T3+ T4, normalisiert mit dem Referenzgen PBGD (REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede T1+T2/T3+T4 nicht normalisiert		Signifikanzlevel
PBGD	1,028	$p = 0,9595$
HPRT	0,752	$p = 0,6875$
Rad51-1 (#17)	1,914	$p = 0,3985$
Rad51-2 (#36)	1,283	$p = 0,7345$

Tab.30: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen den Gruppen der Tumorgroße T1+T2 gegen T3+T4, nicht normalisiert (REST-Programm, Pfaffl 2002)

3.2.6.3. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Sexualsteroid-Rezeptorstatus

Bei der Betrachtung des Östrogen/Progesteronrezeptorstatus lässt sich ein 2,2 – 2,7 fach höherer Faktor der Rad51-Expression in der Gruppe der rezeptornegativen Tumore feststellen. Beim statistischen Vergleich ergibt sich hinsichtlich der Normalisierung gegen das Referenzgen HPRT ein signifikanter Unterschied (vgl. Tabelle 31).

Expressionsunterschiede normalisiert (HPRT) ER.PR pos/neg		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	2,760	$p = 0,005$
Rad51-2 (#36)	2,245	$p = 0,007$

Tab.31: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen Hormonrezeptor-positiven- und negativen Tumoren, normalisiert mit HPRT (REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede normalisiert (PBGD) ER.PR pos/neg		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	2,368	$p = 0,0465$
Rad51-2 (#36)	1,927	$p = 0,1325$

Tab.32: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen Hormonrezeptor-positiven- und negativen Tumoren, normalisiert mit PBGD (REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede		Signifikanzlevel
ER.PR pos/neg nicht normalisiert		
PBGD	1,905	$p = 0,2755$
HPRT	1,634	$p = 0,513$
Rad51-1 (#17)	4,511	$p = 0,051$
Rad51-2 (#36)	3,670	$p = 0,088$

Tab.33: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen
Hormonrezeptor-positiven- und
negativen Tumoren, nicht normalisiert
 (REST-Programm, Pfaffl 2002)

3.2.6.4. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Her2/neu Status

Der Vergleich der Rad51-Expression in der Gruppe der Her2/neu-negativen Tumore ergibt keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Gruppe der Her2/neu-positiven Tumore.

Expressionsunterschiede normalisiert		Signifikanzlevel
(HPRT) Her2/neu pos/neg		
Rad51-1 (#17)	1,502	$p = 0,258$
Rad51-2 (#36)	0,955	$p = 0,884$

Tab.34: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen
Her2/neu-positiven- und negativen
Tumoren, normalisiert mit HPRT
 (REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede normalisiert		Signifikanzlevel
(PBGD) Her2 pos/neg		
Rad51-1 (#17)	0,629	$p = 0,29$
Rad51-2 (#36)	0,400	$p = 0,032$

Tab 35: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen
Her2/neu-positiven- und negativen
Tumoren, normalisiert mit PBGD
 (REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede Her2		Signifikanzlevel
pos/neg nicht normalisiert		
PBGD	1,147	$p = 0,84$
HPRT	0,481	$p = 0,32$
Rad51-1 (#17)	0,722	$p = 0,7$
Rad51-2 (#36)	0,459	$p = 0,331$

Tab.36: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen
Her2/neu-positiven- und negativen
Tumoren, nicht normalisiert
 (REST-Programm, Pfaffl 2002)

3.2.6.5. Rad51 mRNA-Expression koordiniert mit dem Nodalstatus

Der Vergleich der Patientinnen mit negativem Nodalstatus (N0) mit der Gruppe, die einen Befall der axillären Lymphknoten aufweisen (N1-N3), zeigt eine leicht zunehmende Tendenz der Rad51-Expression, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Expressionsunterschiede N+/N-normalisiert (HPRT)		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	0,772	p = 0,4425
Rad51-2 (#36)	1,128	p = 0,7105

Tab.37 : Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen nodalpositiven und nodalnegativen Tumoren, normalisiert mit HPRT

(REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede N+/N-normalisiert (PBGD)		Signifikanzlevel
Rad51-1 (#17)	0,954	p = 0,921
Rad51-2 (#36)	1,394	p = 0,4415

Tab.38: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen nodalpositiven und nodalnegativen Tumoren, normalisiert mit PBGD

(REST-Programm, Pfaffl 2002)

Expressionsunterschiede nicht normalisiert N+/N-		Signifikanzlevel
PBGD	0,872	p = 0,8095
HPRT	1,078	p = 0,9175
Rad51-1 (#17)	0,832	p = 0,811
Rad51-2 (#36)	1,216	p = 0,798

Tab.39: Rad51-mRNA
Expressionsunterschied zwischen nodalpositiven und nodalnegativen Tumoren, nicht normalisiert

(REST-Programm, Pfaffl 2002)

3.2.7. Suche nach Rad51 Splicevarianten im untersuchten Kollektiv

Um eine eventuell vorhandene Splicevariante in dem zu untersuchenden Mammakarzinomgewebe nachzuweisen, wurden die Realtime RT-PCR Untersuchungen mit zwei unterschiedlichen Rad51 Primerpaaren durchgeführt (vgl. Tab 28): Primer 1 (#17 der Firma Roche Applied Science) und Primer 2 (#36 der Firma Roche Applied Science). Wie aus der Abbildung 13 zu ersehen ist, zeigten beide Primer bei allen Durchläufen annähernd die gleichen Ergebnisse, so dass in dem untersuchten Kollektiv nur die Isoform 1 (GenBank accession number: NM_002875) des Rad 51 Gens vorzuliegen scheint.

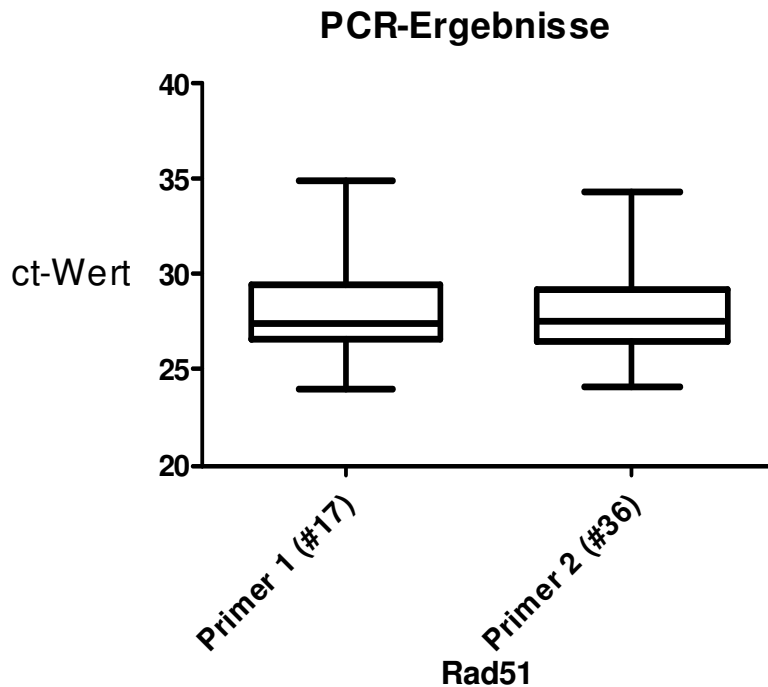


Abb.13: Gegenüberstellung der Ct-Werte der beiden Primer Rad51-1 (#17) und Rad51-2 (#36)

3.3. Korrelation von Rad51 Protein- und mRNA-Nachweisen

Die Frage nach einer möglichen Korrelation des Rad51-Proteingehalts mit der beobachteten Expression auf mRNA-Ebene, wurde mit dem Rangkorrelationskoeffizienten r_s nach Spearman untersucht. Er kann Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen, wobei ein Betrag nahe Null einen schwachen und ein Betrag nahe eins einen starken Zusammenhang bedeutet.

Als Einheit für jede Probe wurde für die Proteinexpression der PCI-Wert gewertet. Für die mRNA-Expression galt der Faktor der Überexpression gemäß o.g. Formel (vgl. Kap. 3.2.5.1.), d.h. gewertet gegenüber dem Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe.

Beim Vergleich der Einzelwerte je Probe hatte sich bei Korrelationskoeffizienten von $-0,13$ - $0,22$ keine statistisch signifikante Korrelation der analysierten Rad 51-Expressionswerte ergeben.

	Korrelationskoeffizient r_s
PCI/Rad51-1(#17)/PBGD	- 0,21 (p = 0,145)
PCI/Rad51-2(#36)/PBGD	- 0,16 (p = 0,2684)
PCI/Rad51-1(#17)/HPRT	- 0,18 (p = 0,2232)
PCI/Rad51-2(#36)/HPRT	- 0,13 (p = 0,3911)

Tab.40: Korrelationskoeffizient Rad51-Proteingehalt (PCI %) und mRNA (delta ct-Wert)

Die graphische Darstellung der Ergebnisse jeder Probe aus der Immunhistochemie und PCR zeigt in keiner der Beziehungen eine Korrelation.

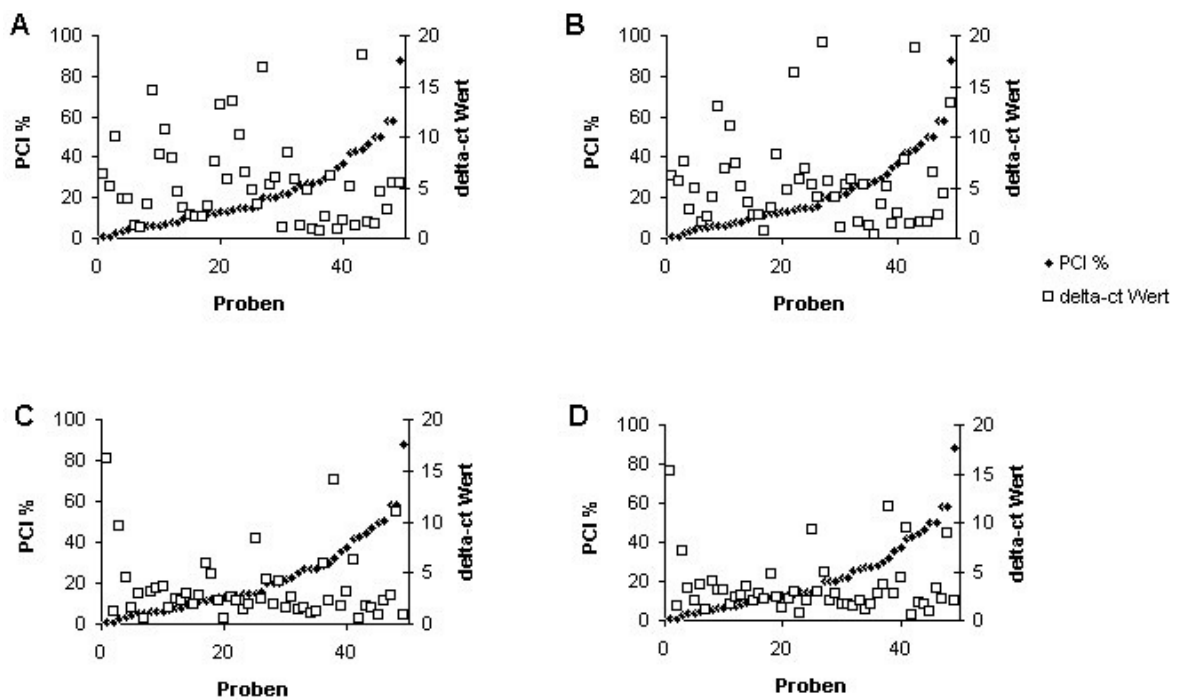


Abb.14: Ergebnisse der Immunhistochemie ♦ (PCI %) und PCR □ (delta-CT Wert)

Sortiert nach PCI-Wert: A PCI/Rad51-1(#17)/PBGD, B PCI/Rad51-2(#36)/PBGD, C PCI/Rad51-1(#17)/HPRT, D PCI/Rad51-2(#36)/HPRT

4. Diskussion

Die Entscheidung zur Therapie einer an Brustkrebs erkrankten Patientin wird anhand von Prognosefaktoren und prädiktiven Faktoren vorgenommen. Zu den Prognosefaktoren beim Mammakarzinom gehören entsprechend den Leitlinien (Friedrichs et al., AGO Leitlinien, 2009, Kreienberg et al., S3 Leitlinie, 2008) der Lymphknotenstatus, die Tumorgroße, das histopathologische Grading und das Alter. Als prädiktive Faktoren gelten Parameter, die eine Vorhersage für das Therapieansprechen geben, wie z.B. der Status der Sexualsteroidhormonrezeptoren und der Her2/neu Rezeptorstatus. In den letzten Jahren hat sich die klinische Forschung darauf konzentriert, neue genetische und zelluläre Merkmale eines Tumors zu definieren, um damit individuell abgestimmte Therapien zu entwickeln. Dazu wurden eine Vielzahl von Gen- und Proteinexpressionen untersucht, deren Produkte für die Prognose der einzelnen Patientin von Bedeutung sein könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Rad51-Expression in Tumoren der Brust mit immunhistochemischem Proteinnachweis und auf mRNA Ebene in der Realtime-RT-PCR nachgewiesen werden. Eine Überexpression von Rad51 wurde auch schon in anderen Tumorentitäten gefunden, wie zum Beispiel beim Pankreaskarzinom (Maacke et al, 2000a). In der Studie von Maacke et al. ergab die immunhistochemische Analyse bei 27 von 41 Pankreaskarzinomgewebeproben im Vergleich zu Pankreaszelllinien eine erhöhte Rad51-Proteinexpression mit einem PCI-Wert von 5 - 50 %. Bei der Untersuchung von 383 Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte eine hohe Rad51-Expression (PCI > 10 %) als unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Qiao et al., 2005). Beim Mammakarzinom konnten Maacke et al. (2000b) an 108 Patientinnen zeigen, dass eine Rad51-Proteinüberexpression eine signifikante Korrelation mit dem histologischen Grading aufweist.

4.1. Nachweis einer erhöhten Proteinexpression von Rad51 in Tumorgewebe der Brust

Der immunhistochemische Nachweis des Rad51 Proteins zeigte eine deutliche Überexpression im vorliegenden Kollektiv von 49 Mammkarzinomen. Im Vergleich zu der Auszählung von gutartigen Brustgewebsabschnitten (n = 11) ergab sich eine statistisch signifikant höhere Rad51-Expression in malignen Bereichen der Tumorgewebe. Die PCI-Werte zwischen 0,5 % und 88 % der Rad51-Expression der Karzinome entsprachen in etwa der Bandbreite, die zuvor bereits in Mammakarzinomgewebe mit einem PCI zwischen 0 und 68 % nachgewiesen werden konnte (Maacke et al., 2000b, Opitz 2001,

Schierholz 2009 im Druck). Als Kontrolle für gutartiges Brustgewebe wurde in den Gewebeschnitten zwischen Tumorbereichen und gutartigen Bereichen unterschieden. Auf 11 von den insgesamt 49 Paraffinschnitten ließen sich eindeutig gutartige Bereiche abgrenzen. Dass das Gewebe für die „gesunde Kontrollgruppe“ von benachbartem Gewebe des Tumors oder der kontralateralen Brust von denselben Patientinnen stammt wie auch die Tumorproben, muss kritisch beurteilt werden. Allerdings sind in der Literatur Beispiele beschrieben, in denen dem Tumor benachbartes Brustgewebe als Kontrollgruppe gewertet wurde (Tokes et al., 2005). In der genannten Studie wurde bei der Untersuchung der Protein- und mRNA- Expression der Claudin-Proteine in Brustgewebe bei der mRNA-Analyse das den Tumor umgebende Brustgewebe als Kontrollgruppe miteinbezogen.

Innerhalb der hier untersuchten Tumorgewebe zeigten sich tendenzielle Unterschiede der Rad51-Expression in Bezug auf die klinischen Parameter. Im Vergleich der Her2/neu-positiven gegenüber Her2/neu-negativen Tumore war die Rad51-Expression von 18 % auf 23 % PCI erhöht, allerdings ohne statistische Signifikanz. Da in unserem Kollektiv nur 11 Her2/neu-positive Tumore und 37 negative Tumore untersucht wurden, konnte aufgrund der geringen Fallzahl keine statistische Signifikanz erreicht werden. Ein Vergleich mit den veröffentlichten Vorarbeiten von Maacke et al. (2000b) und Opitz (2001) ist leider nicht möglich, da dieser klinische Parameter erst seit Zulassung der adjuvanten Herceptin-Therapie 2006 in der EU (Beckmann et al., St. Gallen-Konsensus 2007) standardmäßig beim Mammakarzinom bestimmt wird.

In Bezug auf das histopathologische Tumorgrading ist mit zunehmender Entdifferenzierung des Gewebes eine tendenziell abnehmende Expression festzustellen. Dieses Ergebnis weicht von vorangegangenen Studien ab, in denen eine Korrelation der erhöhten Rad51-Proteinexpression mit dem Tumorgrading nachgewiesen werden konnte (Maacke et al., 2000b, Opitz, 2001, Schierholz, 2009, im Druck). Im Gegensatz zu den Arbeiten von Maacke et al. und Opitz wurden in dieser Arbeit nicht nur invasiv duktales Mammakarzinome untersucht, sondern ein Mischkollektiv von duktales, lobulären und gemischten Karzinomtypen. Bei der isolierten Betrachtung der Untergruppe der 35 Patientinnen mit invasiv duktalem Karzinom (vgl. Tabelle 16) bestätigte sich mit einem PCI-Mittelwert von 15 % bei den G3-Tumoren und 26 % bei den G2-Tumoren der Trend, dass mit steigender Entdifferenzierung eine geringere Rad51 Proteinexpression festgestellt wurde. Eine Einbeziehung der G1-Tumore war bei nur einem Fall im vorhandenen Kollektiv nicht sinnvoll.

4.2. Nachweis einer erhöhten mRNA-Expression von Rad51 in Tumorgewebe der Brust

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Rad51 in Karzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe 2,5 – 3,9 fach höher exprimiert wird. Diese Werte beziehen sich auf die absolute Genexpression für Rad51 in malignem Gewebe nach dem Randomisierungstest mit dem REST-XL Programm für den jeweiligen Primer, abhängig von der Normalisierung gegen das jeweilige Referenzgen (vgl. Kap. 3.2.5.2, Tab. 21-23). Es wurde erstmalig die Rad51-Expression auf mRNA-Ebene in schockgefrorenem, kryokonserviertem Frischgewebe aus Mammakarzinomen im Vergleich mit benignem Gewebe der Brust untersucht. Zuvor wurde die Rad51 mRNA Expression lediglich an Mammakarzinom-Zelllinien (Le Corre et al., 2004, Caetano et al., 2006, Raderschall et al. 2000b) untersucht. In der Arbeitsgruppe Raderschall et al. (2000b) wurde die Rad51-Expression auf mRNA-Ebene per Northernblot Hybridisierung in verschiedenen Tumorzelllinien bestimmt, um die Rad51-Expression und Verteilung nach DNA-Schädigung zu untersuchen. Im Vergleich zu Fibroblasten ergab sich in den drei untersuchten Tumorzelllinien eine sechs- bis elf-fach erhöhte Rad51-mRNA-Expression. Untersuchungen der Rad51-mRNA-Expression bei anderen Tumorentitäten wie z.B. beim intrahepatischen Cholangiokarzinom (Obama et al., 2008) sind mit DNA-Microarrays durchgeführt worden. Han et al. (2002) konnten eine zunächst mit cDNA-Microarray-Analysen in Pankreaskarzinomzelllinien gefundene Überexpression von Rad51 bestätigen, indem diese an Patiententumorgewebe per immunhistochemischer Analyse und RT-PCR verifiziert wurden. Die per cDNA-Microarray nachgewiesene Rad51-Überexpression stimmte mit dem gezielten Rad51-Nachweis auf mRNA-Ebene und Proteinebene überein. Bishay et al. (2001) bestimmten die mRNA-Expression von Rad51 aus Lymphozyten, die aus menschlichem Blut isoliert wurden, um zu zeigen, dass die mRNA-Expression von Rad51 und weiteren an der DNA-Reparatur beteiligten Genen, negativ mit der Bildung von DNA-Strangbrüchen nach Bestrahlung korreliert.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten signifikante Expressionsunterschiede der Rad51-Expression auf mRNA-Ebene bezüglich Tumorgrading und Hormonrezeptorstatus gezeigt werden (vgl. Kap 3.2.7). Beim Vergleich der G2-Tumore mit den G3-Tumoren zeigte sich eine 1,3 bis 2-fach höhere Expression der G3-Tumore, bei den gegen das Referenzgen HPRT normalisierten Werten mit statistischer Signifikanz. Ein möglicher Zusammenhang von erhöhter mRNA-Expression mit einem höheren Tumorgrading, d.h. mit zunehmender Entdifferenzierung der Zellen befindet sich im Einklang mit der Aussage von Maacke et al. (2002b), die eine Korrelation des Tumorgradings mit der Rad51-Expression auf Proteinebene nachweisen konnten. Ein entsprechendes Ergebnis auf mRNA-Ebene ist in

der veröffentlichten Literatur nicht beschrieben und wurde in dieser Arbeit erstmalig gezeigt.

Die Gruppe von acht Östrogen/Progesteron-negativen Tumoren zeigte gegenüber 40 Östrogen/Progesteron-positiven Tumoren eine 2,2 bis 2,7-fach erhöhte Rad51-mRNA-Expression. Diese negative Korrelation zwischen den Expressionen von Sexualsteroidrezeptoren mit Rad51 wurde auch bei Maacke et al. (2000b) in der immunhistochemischen Analyse beschrieben.

4.3. Bewertung der verwendeten Methoden

4.3.1. Immunhistochemie

Die Bestimmung der Rad51-Expression auf Proteinebene wurde nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Färbeverfahren durchgeführt. Die Sensitivität des Verfahrens wurde durch Anpassung der Färbeparameter so eingestellt, dass Zellen mit einem normalen Gehalt an Rad51 gerade kein Färbesignal mehr liefern. Die meisten epithelialen Zellen sind in nicht entarteten, in Paraffin eingebetteten Geweben bei der verwendeten Methodik negativ für den Rad51-Nachweis. Die in der vorliegenden Studie gewählten Reaktionsbedingungen führen nicht zu einer Detektion basaler Rad51-Spiegel. Hierdurch wird eine Unterscheidung zwischen basalem und erhöhtem Rad51-Gehalt ermöglicht. Sowohl in gesundem Brustdrüsengewebe als auch in entartetem Gewebe zeigten sich mit diesem immunhistochemischen Verfahren Rad51-positive Zellen, die über einen deutlich erhöhten Gehalt an Rad51 im Vergleich zu den übrigen epithelialen Zellen verfügen. Die Methode zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbung orientierte sich ebenfalls an den genannten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe. Zur Beurteilung der immunhistochemischen Färbung wurde der „Positive stained Cell Index“ (PCI) gewählt. Der PCI beschreibt den Anteil positiv gefärbter Zellen an der Gesamtzellzahl. Es wurden sowohl die Zellen mit einer schwachen als auch mit einer starken Färbung als positiv gewertet. Da eine Differenzierung von unterschiedlichen Färbeintensitäten, im Gegensatz zum „Staining Intensity Indexes“ (SII, in Anlehnung an Wilson et al. 1999), entfällt, hat sich diese Methode als relativ unabhängig vom Untersucher erwiesen (Opitz, 2001).

Zur weiteren Differenzierung wurden die PCI-Werte nach dem PP-Score (Prozentsatz positiver Zellen, Friedrich et al., 1999) eingeteilt, der die PCI-Werte in ein vierstufiges Ranking einteilt, das sich wiederum nur auf die Anzahl der positiv gefärbten Zellen bezieht und nicht auf die Färbeintensität. Die deutlich gesteigerte Anzahl von Rad51 positiv gefärbten Zellen bestätigt zumindest eine hohe Sensitivität des verwendeten Färbeverfahrens, wobei die Unterscheidung von leicht erhöhter und stark erhöhter Rad51-

Expression und die Differenzierung anhand eines Scores in weiteren Studien, evtl. auch erneut im Vergleich mit dem mRNA-Gehalt untersucht werden müssten.

4.3.2. RNA-Isolierung und Realtime-RT-PCR

Die Auswahl der in dieser Studie untersuchten 49 Mammakarzinome erfolgte nach der Verfügbarkeit von formalinfixiertem Paraffinmaterial und kryokonserviertem Frischgewebe derselben Patientin. Da das Einfrieren von Frischgewebe im Gegensatz zur Erstellung eines Paraffinblocks nicht standardmäßig erfolgt, orientierte sich die Zusammenstellung des Kollektivs an dem zur Verfügung stehenden Frischgewebe. Die Gewinnung von ausreichend Material ist bei einem fortgeschrittenen Tumor eher gegeben, so dass sich für diese Studie, bezogen auf die Tumorgöße, ein Hochrisikokollektiv (T1: n=16, T2-T4: n=33) ergeben hat. Um ein geeignetes Verfahren zur mRNA-Isolierung aus fettigem Brustgewebe zu nutzen, wurde durchgehend das Trizol-Isolierungsverfahren eingesetzt. Auf der Suche nach dem idealen Referenzgen, wohl wissend dass dieses nicht existiert, haben wir uns an Daten aus der Literatur orientiert. Der Einsatz von PBGD als Referenzgen bei Untersuchungen mit Brustkrebs ist in der Literatur bereits beschrieben (Faneyte et al., 2002, Rohde et al., 2005). HPRT hatte sich in Arbeiten zur Validierung von Referenzgenen, insbesondere beim Mammakarzinom als empfehlenswert erwiesen (Szabo et al., 2004, Vandesompele et al., 2001). Beide Gene zeigten bei Testanalysen mit RNA aus Zelllinien eine stabile Expression, die sich auch mit RNA aus malignem und benignem Brustgewebe bestätigte. Aufgrund der limitierten Menge an Brustgewebe und der daraus zu gewinnenden RNA Menge wurde der Einsatz auf das absolute Minimum von zwei Referenzgenen beschränkt.

4.4. Mögliche Ursachen und Folgen einer Rad51-Überexpression

Das Rad51-Protein und seine Interaktion mit den Tumorsuppressoren p53, BRCA1 und BRCA2 spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Die genaue Funktion und Ursachen einer Überexpression in diesem Prozess sind jedoch noch nicht klar. Trotz intensiver Forschung konnten tumorbedingte Mutationen im Rad51-Gen noch nicht nachgewiesen werden (Kato et al., 2000), so dass offensichtlich Mutationen im Rad51 Gen eine wenig bedeutende Rolle spielen. Levy-Lahad et al. (2001) konnten zeigen, dass ein Polymorphismus auf dem nicht kodierenden Exon des Rad51 Gen das Brustkrebsrisiko von Frauen erhöht, die Trägerin einer BRCA2-Mutation sind. Nach DNA-Schädigung z.B. nach Bestrahlung lagert sich das Rad51 Protein im Zellkern zu Foci oder

Nukleoproteinfilamenten zusammen und kann mittels Immunfluoreszenz Färbung nachgewiesen werden (Haaf et al., 1995, Tan et al., 1999). Diese Rad51 Foci entsprechen wahrscheinlich großen durch HR gekoppelten DNA-Reparatur Proteinkomplexen. Während des normalen Zellzyklus findet die Rad51 Transkription in der S und G2 Phase statt und Foci mit Rad51 Protein können in einer geringen Zahl von Zellen nachgewiesen werden (Flygare et al., 1996, Haaf et al., 1995). Durch Behandlung mit DNA schädigenden Substanzen steigt die Zahl der Kerne mit Rad51-Protein Foci stark an (Tashiro et al. 2000). Bei einer Vielzahl von Tumoren ist die Rad51-Überexpression nicht nur ein sekundäres Phänomen der Tumorgenese, sondern scheint auch eine Bedeutung in der malignen Transformation bzw. der Tumorprogression zu haben (Raderschall et al. 2002b). Bei einer Erhöhung der Rad51-Expression um das zwei- bis dreifache steigert sich die spontane HR um das 20-fache (Vispe et al., 1998). In Rad51 überexprimierenden Zellen ist das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Komponenten des DNA-Reparatursystems gestört. Schwankende Rad51-Expressionen könnten von Vorteil für die Tumorzelle sein. Möglicherweise schützt das Rad51-DNA Reparatursystem die Tumorzelle vor DNA-Schäden und Apoptose. Desweiteren könnte eine Überstimulation der HR und der chromosomalen Austauschmechanismen durch Rad51 zur genomischen Instabilität von Tumorzellen beitragen. Einige Tumorsuppressoren, wie p53 und BRCA2 kontrollieren das Rad51 Molekül möglicherweise in Form eines inaktiven Monomere-Stadiums. Bei einer Überexpression von Rad51 kommt es wahrscheinlich zur Aktivierung von Polymerkomplexen, weil die limitierende Konzentration der Tumorsuppressoren nicht mehr ausreicht (Raderschall et al., 2002b). Somit wird durch die fehlende Regulierung des Rad51-Proteins eine übersteigerte Rekombination wahrscheinlich (Vispe et al., 1998, Xia et al., 1997). Im Tiermodell stimuliert die Überexpression von Rad51 jedoch nicht die Tumorgenese (Bertrand et al., 2003). Es könnte daher sein, dass der erhöhte Gehalt an Rad51 ein Indikator für den proliferativen Status des Tumors darstellt. Daher liegt es nahe, dass HR gekoppelte Reparaturmechanismen streng kontrolliert sein müssen, um die Genomstabilität zu erhalten. Es bleibt weiter offen, ob eine Rad51 Überexpression mitverantwortlich für die Karzinogenese ist oder ein Schutzmechanismus bei genetischer Instabilität, ausgelöst durch maligne Proliferation.

4.5. Vergleich der Rad51 Protein-und mRNA-Expression

Im untersuchten Kollektiv wurde eine generell erhöhte Rad51-Expression in Mammakarzinomgewebe sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Eine mögliche Beziehung zwischen Rad51-Proteinexpression und Rad51-

mRNA-Expression in den zusammengehörenden Proben einer Mammakarzinompatientin wurde mit Hilfe einer nicht parametrischen Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Bei der Analyse des Kollektivs konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Das heißt, dass ein Tumor mit hohem PCI-Wert in der immunhistochemischen Färbung nicht automatisch bei der Realtime-PCR-Analyse ein entsprechend hohes Expressionsniveau zeigte. Warum hier keine Korrelation ermittelt werden konnte, ist in diesem Fall nicht einfach zu bewerten. Für die mRNA-Expression wurden experimentell festgelegte Einzelwerte für den Vergleich mit der Proteinexpression herangezogen. Das Ergebnis der Realtime-PCR in Form des Ct-Wertes, wurde nach der delta-Ct-Formel (vgl. Kap.3.2.5) gegen den Mittelwert der „gesunden Kontrollgruppe“ gewertet. Es handelt sich daher um einen reinen Verhältniswert. Für die Quantifizierung der mRNA-Expression für jede Probe wäre es u.U. besser gewesen, die Einzelwerte anhand einer Standardkurve mit bekannten mRNA-Konzentrationen darzustellen, um einen absoluten Wert für die mRNA-Menge von Rad51 zu erhalten. Bei der Fragestellung nach einer Beziehung zwischen immunhistochemischen und PCR-Ergebnissen muss auch berücksichtigt werden, dass es sich um die Betrachtung zweier verschiedener Ebenen im Verlaufe der Proteinproduktion handelt. Die Unterschiede von Protein und mRNA können auf einer beschleunigten Aktivierung des Proteins, unterschiedlichen Stabilität, dem Abbau oder auch dem Ausschleusen aus der Zelle beruhen. Dieser nicht lineare Zusammenhang zwischen mRNA und Proteingehalt könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Regulierung von Rad51 auf verschiedenen Ebenen geschieht. Raderschall et al (2002) nahmen an, dass die Hochregulation von Rad51 auf transkriptioneller Ebene stattfindet, nachdem eine Amplifikation des Rad51-Gens als Ursache für eine Überexpression des Rad51-Proteins in verschiedenen Tumorzelllinien ausgeschlossen werden konnte. Andererseits wurden hier erhöhte mRNA-Level ohne Verstärkung der Rad51 Protein-Level gefunden, was auf eine Regulierung von Rad51 auch außerhalb der Transkriptionsebene, also auch auf der Ebene der Translation und der Prozessierung zurückgeführt wurde (Raderschall et al., 2002b).

4.6. Ausblick

Für eine exakte Therapieplanung müssen neue Anhaltspunkte für die biologische Aktivität eines Tumors gefunden werden. Die Strahlen- und Chemotherapie gehören nach der Operation zu den Grundpfeilern der Therapie des Mammakarzinoms. Diese hier vorgestellte Pilotstudie konnte anhand von zwei unterschiedlichen Nachweismethoden zeigen, dass Rad51 in Mammakarzinomgewebe gegenüber gesundem Gewebe der Brust überexprimiert ist. Neben seiner Bedeutung bei der Kontrolle und Entstehung von malignem Wachstum scheint der Rad51-Gehalt auch einen Einfluss auf die Chemo- und

Strahlensensibilität der Tumorzellen zu haben. Immer mehr Studien beschäftigen sich mit der Bedeutung von Rad51 bei der Resistenzbildung unter Chemo- und Strahlentherapie. Vispe et al. (1998) zeigten, dass eine zwei- bis dreifache Überexpression von Rad51 zu einer 20-fachen Zunahme der homologen Rekombinationsprozesse und gleichzeitig zu einer Zunahme der Resistenz gegen radioaktive Strahlung führt. In einem Experiment mit Antisense-Oligonukleotiden gegen Rad51 konnte eine Verstärkung des Effektes einer Radiotherapie bei Gliomzellen beobachtet werden (Ohnishi et al., 1998).

In weiteren Arbeiten konnte in Rad51 überexprimierenden Zellen eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Zytostatika nachgewiesen werden. Es zeigte sich insbesondere eine Resistenz auf DNA-Doppelstrangbruch-induzierende Zytostatika wie Mitomycin C, Cisplatin oder Calicheamicin (Kremer, 2003). Eine Arbeitsgruppe aus Texas, USA konnte nachweisen, dass Rad51 in verschiedenen Weichteilsarkomen nach Behandlung mit Doxorubicin höher exprimiert war als in unbehandelten Zellen. Die durch Behandlung mit Anti-Rad51-RNA verminderte Rad51-Expression führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Doxorubicin, so dass Rad51 ein Anteil an der Entwicklung einer Doxorubicin-Resistenz zukommen könnte (Hannay et al., 2007). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine auf die Promoterregion von Rad51 gezielte Therapie mit dem Diphtherietoxin A insbesondere Brustkrebs-, Fibrosarkom- und Zervixkarzinomzellen schädigt (Hine et al., 2008). Durch eine spezifische Modulation der Rad51-Funktion wäre eine Beeinflussung der Resistenzentwicklung möglich. In diesem Zusammenhang könnte Rad51 ein neues wichtiges Zielprotein bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien sein. Die Funktion von Rad51 in der Karzinogenese oder Resistenzentwicklung konnte in der vorliegenden Studie nicht weiter geklärt werden. Die zu dieser Frage genannten Grundlagenstudien basieren zum großen Teil auf Experimenten an Tumorzelllinien. Mit der vorliegenden Studie haben wir durch den Nachweis von Rad51 in Patientengewebe einen möglichen Zusammenhang von Rad51 und der Brustkrebserkrankung bestätigen können. Dieser Zusammenhang könnte in Zukunft einen prognostischen und prädiktiven Wert erlangen. Die Validität der gemachten Aussagen müsste allerdings in weiterführenden prospektiven Studien mit vergrößertem Patientenkollektiv bestätigt werden.

5. Zusammenfassung

Mit dem Ziel einer exakteren Therapieplanung des Mammakarzinoms, hat sich die Grundlagenforschung in den letzten Jahren darauf konzentriert, neben der klassischen Definition, neue Merkmale zur genaueren Charakterisierung des jeweiligen Tumors zu untersuchen. Der Rekombinationsfaktor Rad51, ein Schlüsselprotein der homologen Rekombination, hat möglicherweise eine zentrale Bedeutung in der Entstehung und Kontrolle von malignem Wachstum. Es interagiert u.a. mit den für das Mammakarzinom relevanten Tumorsuppressoren BRCA1, BRCA2 und p53. Eine Überexpression von Rad51 wurde bereits in Mamma-, Bronchial-, Harnblasen- und Pankreaskarzinomen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rad51-Expression in 49 Mammakarzinomen im Vergleich zu benignem Brustgewebe mit immunhistochemischem Proteinnachweis auf Paraffinschnitten untersucht. Von denselben Patientinnen wurde nach Isolierung der mRNA aus schockgefrorenem Tumorgewebe mit der Realtime-RT-PCR die Rad51-Expression quantifiziert. Die Ergebnisse unterschiedlicher Nachweismethoden wurden betrachtet und verglichen.

Es zeigte sich sowohl auf Proteinebene als auch auf der mRNA-Ebene eine signifikante Überexpression von Rad51 in malignem im Vergleich zu gutartigem Brustgewebe. Die immunhistochemische Analyse ergab in dem Tumorgewebe einen Anteil Rad51 positiver Zellen zwischen 0,5 % und 88 % (PCI-Mittelwert: 22 %). Im Vergleich dazu lagen die Werte in dem gutartigen Gewebe zwischen 4,5 % und 11 %, mit einem Mittelwert von 7,2 %. Auf mRNA-Ebene war Rad51 in Karzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe 2,5 – 3,9 fach signifikant höher exprimiert. Signifikante Zusammenhänge konnten bei der Koordination der Rad51-mRNA-Expression mit dem histologischen Tumorgrading und dem Sexualsteroidrezeptorstatus gezeigt werden. Die G3-Tumore zeigten eine 1,3 bis 2-fach höhere mRNA-Expression als die G2-Tumore. Bei der Betrachtung des Östrogen/Progesteronrezeptorstatus ließ sich ein 2,2 – 2,7-fach höherer Faktor der Rad51-mRNA-Expression in der Gruppe der rezeptornegativen Tumore feststellen. Bei der Koordination der Rad51-Proteinexpression mit den klinischen Tumordaten fanden sich keine signifikanten Zusammenhänge. Der Vergleich der beiden Nachweismethoden ergab keine Korrelation. Ein Tumor mit vielen positiv gefärbten Zellen korrelierte nicht automatisch mit einer vergleichsweise hohen mRNA-Expression.

Mit der vorliegenden Studie haben wir durch den Nachweis von Rad51 im Mammakarzinom einen Zusammenhang der Rad51-Expression mit der Erkrankung bestätigen können. Ein möglicher prognostischer Wert der gemachten Aussagen müsste allerdings in weiterführenden Studien mit vergrößertem Patientenkollektiv weiter untersucht werden.

6. Literatur

Agendia Presseportal www.agendia.com, 2008

Albain K, Barlow W, Shak S, Hortobagyi GI, Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal, node-positive, ER-positive breast cancer (S8814, INT0100). Presented at: the 2007 San Antonio Breast Cancer Symposium. Dec 2007

Beckmann MW, Blohmer J, Costa S, Diedrich K, Eiermann W, Friese K, Gerber B, Hilfrich J, Kaufmann M, Köhler U, Kreienberg R, v. Minckwith G, Jänicke F, Jonat W, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, St. Gallen Konsensus 2007 aus deutscher Sicht, *Frauenarzt* 48, Nr. 5, 434-439, 2007

Bertrand P, Lambert S, Joubert C, Lopez BS, Overexpression of mammalian Rad51 does not stimulate tumorigenesis while a dominant-negative Rad51 affects centrosome fragmentation, ploidy and stimulates tumorigenesis, in p53-defective CHO cells. *Oncogene* 22 (48),7587-92, 2003

Bishay K, Ory K, Olivier MF, Lebeau J, Levalois C, Chevillard S, DNA damage-related RNA expression to assess individual sensitivity to ionizing radiation, *Carcinogenesis*, 22, 1179-83, 2001

Buchhop S, Donzelmann B, Nastainczyk W, Stürzbecher HW, isolation and characterization of six monoclonal antibodies raised against human Rad51 recombinant protein.,*Hybridoma* 15, 205-210, 1996

Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Stürzbecher HW, Harris C, Interaction of p53 with the human Rad51 protein, *Nucleic Acids Res* 25, 3868-3874, 1997

Caetano B, Le Corre L, Chalabi N, Delort L, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ, Soya phytonutrients act on a panel of genes implicated with BRCA1 and BRCA2 oncosuppressors in human breast cell lines. *Br. J Nutr*, 5, 406-413, 2006

Chen PL, Chen CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH, The BRC repeats in BRCA2 are critical for Rad51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5287-5292, 1998b

Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Knight LA, Gabriel FG, Whitehouse PA, Sharma S, Fernando A, Glaysher Sh, Di Palma S, Johnson P, Somers Sh S, Toh S, Higgins B, Lamont A, Gulliford T, Hurren J, Yiangou C, Cree IA, Cancer cell adaption to chemotherapy, *BMC Cancer*,5:78, 1471-2407, 2005

Dudenhoffer C, Kurth M, Janus F, Deppert W, Wiesmuller L, Dissociation of the recombination control and the sequence-specific transactivation function of p53, *Oncogene* 18, 573-5784, 1999

European Medicines Agency (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use, April 24-27, 2006.

EORTC (European Organisation of Research and Treatment of Cancer), MINDACT-Studie (Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy) nationale Leitung durch die WSG (Westdeutsche Studiengruppe, www.wsg-online.com)

Faneyte IF, Kristel PMP, Maliepaard M, Scheffer GL, Scheper RJ, Schellens JHM, van de Vijver MJ, Expression of the Breast Cancer Resistance Protein in Breast Cancer, Clin Canc Res, 8, 1068-1074, 2002

Flygare J, Benson F, Hellgren D, Expression of the human Rad51 gene during the cell cycle in primary human peripheral blood lymphocytes, Biochem Biophys Acta, 1312, 231-236, 1996

Friedrich M, Villena-Heinsen C, Reitnauer K, Schmidt W, Tilgen W, Reichrath J, Malignancies of the uterine corpus and immunoreactivity score of the DNA "mismatch-repair" enzyme human Mut-S-homologon-2, J Histochem Cytochem 47: 113-118, 1999

Friedrichs K, Harbeck N, AGO Leitlinien, Kommission Mamma, Prognosefaktoren und prädiktive Faktoren, 2009

Genomic Health Presseinformation www.genomichealth.com 2008

Haaf T, Golub EI, Reddy G, Radding CM, Ward DC, Nuclear foci of mammalian Rad51 recombination protein in somatic cells after DNA damage and its localization in synaptonemal complexes, Proc Natl Acad Sci USA 92, 2298-2302, 1995

Han H, Bearss DJ, Browne LW, Calaluca R, Nagle RB, von Hoff DD, Identification of differentially expressed genes in pancreatic cancer cells using cDNA microarray, Cancer Res 62 (10), 2890-2896, 2002

Hannay JA, Liu J, Zhu QS, Bolshakov SV, Li L, Pisters PW, Lazar AJ, Yu D, Pollock RE, Lev D, Rad51 overexpression contributes to chemoresistance in human soft tissue sarcoma cells: a role for p53/activator protein 2 transcriptional regulation, Mol Cancer Ther, 6, 1650-1660, 2007

Hine CM, Seluanov A, Gorbunova V, Use of the Rad51 promoter for targeted anti-cancer therapy, Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105, 20810-20815, 2008

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC, p53 mutations in human cancers, Science 253, 49-53, 1991

Jänicke F, Diedrich K, Jonat W, Gerber B, Lisboa B, Friedrich M, Remer T, Maas N, Konsens St. Gallen 2005, Frauenarzt (46) Nr.3, 2005

Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M for the German "Chemo-N0" Study Group (2001) Randomized adjuvant trial in high risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-Type plasminogen activator and plasminogen activator

inhibitro type 1, J Natl Cancer Inst 93 (12): 913-920, 2001

Kato M, Yano K, Matsuo F, Saito H, Katagiri T, Kurumizaka H, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Skamoto G, Identifiation of Rad51 alteration in patients with bilateral breast cancer, J Hum Genet 45, 133-137, 2000

Kraywinkel K, Epidemiologie des Brustkrebs, Landestagung für Frauenselbsthilfe 11/2007

Kreienberg R, Kopp I, Albert U, Bartsch HH, Beckmann MW, Berg D, Bick U, du Bois A, Budach W, Dunst J, Engel J, Ernst B, Geraedts M, Henschler U, Hölzel D, Jackisch C, Köning K, Kreipe H, Kühn T, Lebeau A, Leinung S, Link H, Lück HJ, Madjar H, Maiwald A, Maiwald G, Marschner N, Marx M, von Minckwitz G, Naß-Griegoleit I, Possinger K, Reiter A, Sauerbrei W, Schlake W, Schmutzler R, Schreer I, Schulte H, Schulz KD, Souchon R, Thomssen C, Untch M, Wagner U, Weis J, Zemmler T, Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., 2008

Kremer T, Auswirkungen einer Überexpression des Rekombinationsfaktors Rad51 auf Apoptose und Nekrose in Tumorzellen, Med Diss, Institut für Humangenetik, Universität zu Lübeck, 2003

Krüger S, Oidtmann B, Haase S, Henning W, Feller AC, Böhle A, Stürzbecher HW, High-level expression of Rad51 is associated with tumor recurrence and progression in non-invasive papillary bladder carcinoma, 2005

Le Corre L, Fustier P, Chalabi N, Bignon YJ, Bernard-Gallon, Effects of resveratrol on the expression of a panel of genes interacting with the BRCA1 oncosuppressor in human breast cell lines, Clinica Chimica Acta 344, 115-121, 2004

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, genetic instabilities in human cancers, Nature 96, 643-649, 1998

Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C, The fall in breast cancer mortality in Europe, Eur J Cancer , 37:1409-1412, 2001

Levy-Lahad E, Lahad A, Eisenberg S, Dagan E, Paperna T, Kasinetz L, Catane R, Kaufman B, Beller U, Renbaum P, Gershoni-Baruch R, A single nucleotide polymorphism in the Rad51 gene modifies cancer risk in BRCA2 but not BRCA1 carriers, Proc Natl Acad Sci USA 98, 3232-3236, 2001

Linder S, Parradi C, Falkmer UG, Blasjo M, Sundelin P, von Rosen A
Prognostic significance of Ki-67 antigen and p53 protein expression in pancreatic duct carcinoma : a study of the monoclonal antibodies MIB-1 and DO-7 in formalin-fixed paraffin-embedded tumor material Br J Cancer 76, 54-59, 1997

Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(t))}$ Method, Methods, 25(4), 402-408, 2001

- Maacke H**, Jost K, Opitz S, Miska S, Yuan Y, Hasselbach L, Luttges J, Kalthoff H, Stürzbecher HW, DNA repair and recombination factor Rad51 is over-expressed in human pancreatic adenocarcinoma, *Oncogene*, 19, 2791-2795, 2000a
- Maacke H**, Opitz S, Jost K, Hamdorf W, Hamdorf W, Henning W, Krüger S, Feller A, Lopens A, Diedrich K, Schwinger E, Stürzbecher HW, Overexpression of wild-type Rad51 correlates with histological grading of invasive ductal breast cancer, *Int J. Cancer*, 88, 907-913, 2000b
- Marmorstein LY**, Ouchi T, and Aaronson SA, The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and Rad51, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13869-1874, 1998
- Martin R**, Orelli BJ, Yamazo M, Minn AJ, Takeda S, Bishop DK, Rad51 up-regulation bypasses BRCA1 function and is a common feature of BRCA1-deficient breast tumors, *Cancer Research*, 67, 9658-9665, 2007
- Meslin F**, Conforti R, Mazouni C, Morel N, Tomasic G, Drusch F, Yacoub M, Sabourin JC, Grassi J, Delaloge S, Mathieu MC, Chouaib S, Andre F, Mehrpour M, Efficacy of adjuvant chemotherapy according to Prion Protein expression in patients with estrogen receptor-negative breast cancer, *Annals of Oncology* 18 (11), 1793-8, 2007
- Millikan RC**, Newman B, Tse Ch-K, Moorman PG, Conway K, Smith LV, Labbok MH, Geradts J, Bensen JT, Jackson S, Nyante S, Livasy Ch, Carey L, Earp HS, Perou CM, Epidemiology of basal-like breast cancer, *Breast Cancer Res Treat* 109 (1) 123-139, 2008
- Moynahan ME**, Pierce AJ, Jasin M, BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks, *Mol Cell* 7, 263272, 2001
- National Comprehensive Cancer Network**, (NCCN), Clinical Practice Guidelines in Oncology, Breast Cancer 2008
- Obama K**, Satoh S, Hamamoto R, Sakai Y, Nakamura Y, Furukawa Y, Enhanced expression of Rad51 associating protein-1 is involved in the growth of intrahepatic cholangiocarcinoma cells, *Clin Canc Res*, 5, 1333-9, 2008
- Ohnishi T**, Taki T, Hiraga S, Arita N, Morita T, In vitro and in vivo potentiation of radiosensitivity of malignant gliomas by antisense inhibition of the Rad51 gene, *Biochem Biophys Res Commun* 245, 319-324, 1998
- Opitz S**, Der Rekombinationsfaktor Rad51 in invasiv duktalem Mammakarzinomen: eine immunhistochemische Studie, *Med. Diss. Lübeck*, 2001
- Patel KJ**, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, Colledge WH, Friedman LS, Ponder BA, Venkitaraman AR, Involvement of BRCA2 in DNA repair, *Mol Cell*, 3, 347-357, 1998
- Pereira H**, Pinder SE, Sibbering DM, Galea MH, Elston CW, Blamey RW, Robertson JF, Ellis IO, Pathological prognostic factors in breast cancer.IV: Should you be a typer or a

grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma. *Histopathology* 27, 219-226, 1995

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van der Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature* 406:747–752 , 2000

Pfaffl MW, real time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung, *BIOSpektrum, Sonderausgabe PCR*,10, 92-95, 2004

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L, Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acid Res*, 30(9) :e36, 2002

Prechtl A, Harbeck N, Thomssen C, Meissner C, Braun M, Untch M, Wieland M, Lisboa B, Cufer T, Graeff H, Selbmann K, Schmitt M, Jaenicke F, Tumorbiological factors uPA and PAI-1 as stratification criteria of a multicenter adjuvant chemotherapy trial in node negative breast cancer, *Int J Biol Markers* 15 (1): 73-78, 2000

Qiao GB, Wu YL, Yang XN, Zhong WZ, Xie D, Guan XY, Fischer D, Kolberg HC, Krüger S, Stürzbecher HW, High-level expression of Rad51 is an independent prognostic marker of survival in non-small-cell lung cancer patients, *British Journal of Cancer* 93(1),137-143, 2005

Raderschall E, Stout K, Freier S, Suckow V, Schweiger S, Haaf T, Elevated levels of Rad51 recombination protein in tumor cells, *Cancer Res* 62, 219-225, 2002b

Robert Koch-Institut (RKI) u. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID), *Krebs in Deutschland 2003-2004*, 6. Auflage 2008

Robles AI, Harris CC, p53-mediated apoptosis and genomic instability diseases, *Acta Oncol* 40, 696-701, 2001

Rohde M, Daugaard M, Jensen MH, Helin K, Nylandsted J, Jäättelä M, Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms, *Genes Dev*, 19, 570-582, 2005

Sachs L., *Angewandte Statistik*, 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1997

Saintigny Y, Rouillard D, Chaput B, Soussi T, Lopez BS, Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint, *Oncogene* 18, 3553-3563, 1999

Saintigny Y, Lopez BS, Homologous recombination induced by replication inhibition, is stimulated by expression of mutant p53, *Oncogene* 21, 488-492, 2002

Schierholz S, Die prognostische Aussagefähigkeit von Rad51, Ki67, uPA/PAI-1 für das Mammakarzinom: eine immunhistochemische Studie, *Med Diss Lübeck (im Druck)*, 2009

- Schmidt M**, Bremer E, Hasenclever D, Victor A, Gehrman M, Steiner E, Schiffer IB, Gebhardt S, Lehr HA, Mahlke M, Hermes M, Mustea A, Tanner B, Koelbl H, Pilch H, Hengstler JG, Role of the progesterone receptor for paclitaxel resistance in primary breast cancer, *BR J Cancer*. 96 (2): 241-7, 2007
- Scully R**, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoeckstra M, Feunteun J, Livingston DM, Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage, *Cell*, 90, 425-435, 1997a
- Sharan SK**, Morimatsu M, Albrecht U, Lim DS, Regell E, Dinh C, Sands A, Eichele G, Hasty P, Bradley A, Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking BRCA2, *Nature* 386, 804-810, 1997
- Snouwaert JN**, Gowen LC, Latour AM, Mohn AR, Xiao A, DiBiase L, Koller BH, BRCA1 deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of non-homologous recombination that is corrected by expression of a BRCA1 transgene, *Oncogene* 18, 7900-7907, 1999
- Sørli T**, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10869–10874, 2001
- Sørli T**, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 8418–8423, 2003
- Stuart-Harris R**, Caldas C, Pinder SE, Pharoa P, Proliferation markers and survival in early breast cancer: A systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients, *Breast*, 2008
- Stürzbecher HW**, Donzelmann B, Henning W, Knippschild U, Buchhop S, p53 is linked directly to homologous recombination processes via Rad51/RecA protein interaction, *Embo J* 15, 1992-2002, 1996
- Szabo A**, Perou CM, Karaca M, Perreard L, Quackenbush JF, Bernard PS, Statistical modeling for selecting housekeeper genes, *Genome Biology*, 5, R59, 2004,
- Taki T**, Onishi T, Yamamoto A, Hiraga S, Arita N, Izumoto S, Hayakawa T, Morita T, Antisense inhibition of the Rad51 enhances radiosensitivity, *Biochem Biohys Res Commun*, 223, 434-438, 1996
- Tan TL**, Essers J, Citterio E, Swagemakers SM, de Wit J, Benson FE, Hoeijmakers JH, Kanaar R, Mouse Rad54 affects DNA conformation and DNA-damage-induced Rad51 foci formation, *Curr Biol* 9, 325-328, 1999

- Tashiro S**, Walter J, Shinohara A, Kamada N, Cremer T, Rad51 accumulation at sites of DNA damage and in postreplicative chromatin., *J Cell Biol*, 150, 283-291, 2000
- Thames HD**, Petersen C, Petersen S, Nieder C, Baumann M, Immunohistochemically detected p53 mutations in epithelial tumors and results of treatment with chemotherapy and radiotherapy. *Strahlenther Onkolog* 178(8):411-21, 2002
- Thompson LH**, Schild D, homologous recombinational repair of DNA ensures mammalian chromosome stability, *Mutat Res* 477, 131-153, 2001
- Tóké AM**, Kulka J, Paku S, Szik A, Páska C, Novák PK, László Szilák, Kiss A, Bögi K, Schaff Z, Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study, *Breast Cancer Res*, 7(2): R296–R305, 2005
- Vandesompele J**, de Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*, 3 (7), 0034.1-0034.11, 2002
- van't Veer LJ**, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer, *Nature* 415, 530-536, 2002
- van de Vijver MJ**, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R, A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer, *N Engl J Med*, 347(25):1999-2009, 2002
- Venkitaraman AR**, Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, *Cell* 108, 171-182, 2002
- Vispe S**, Cazaux C, Lesca C, Defais M, Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation, *Nucleic Acids Res* 26, 2859-2864, 1998
- Von Minckwitz G**, Kümmel S, du Bois A, Hanusch C, Eidtmann H, Hilfrich J, Gerber B, Huober J, Costa SD, Jackisch C, Loibl S, Mehta K, Kaufmann M, Individualized treatment strategies according to in vivo-chemosensitivity assessed by response after 2 cycles of neoadjuvant chemotherapy. Final results of the GeparTrio study of the GBG, San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS), 2006
- Wang Y**, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J, BASC, A super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures, *Genes Dev* 14, 927-939, 2000

Willers H, McCarthy EE, Wu B, Wunsch H, Tang W, Taghian DG, Xia F, Powell SN, Dissociation of p53-mediated suppression of homologous recombination from G1/S cell cycle checkpoint control, *Oncogene* 19, 632-639, 2000

Wilson CA, Ramos L, Vilasenor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, Karlan B, Chen JJ, Scully R, Livingston D, Zuch RH, Kanter MH, Cohen S, Calzone FJ, Slamon DJ, Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas, *Nat Genet* 21, 236-240, 1999

Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL, Rad 51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRCA2, *J Biol Chem* 272, 31941-31944, 1997

Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID, Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with Rad51, *J Biol Chem* 276, 19375-19381, 2001

Xia SJ, Shamma MA, Shmookler Reis RJ, Elevated recombination in immortal human cells is mediated by HsRad51 recombinase, *Mol Cell Biol* 17, 7151-7158, 1997

Zöfel P, *Statistik in der Praxis*, 3. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1992

7. Anhang

Erklärung über die Genehmigung der Untersuchungen von der Ethikkommission

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in der Sitzung der Ethikkommission vom 01.04.1998 unter dem Aktenzeichen 98-039 genehmigt. Antragsteller waren Herr Prof. Dr. Stürzbecher und Herr Prof. Dr. Schwinger. Der Titel des Antrages lautete : Untersuchungen zur Frage der Wechselwirkungen der Tumorsuppressoren BRCA1, BRCA2 und p53 mit dem Rekombinationsfaktor Rad51 bei der Entstehung des hereditären Brustkrebses.

	Proben Nr.	pcr Ergebnis (Ct-Wert)	
		Primer 1(#17)	Primer 2 (#36)
1	2058	30,91	30,83
2	2065	28,54	28,02
3	2073	25,82	26,37
4	2076	27,79	27,50
5	2079	27,41	27,09
6	2107	27,00	27,54
7	2113	29,45	29,33
8	2121	25,77	26,19
9	2126	28,93	28,21
10	2134	24,22	24,11
11	2136	27,09	27,23
12	2139	32,91	31,73
13	2144	27,55	27,88
14	2160	27,72	27,42
15	2161	27,34	27,16
16	2168	26,86	27,00
17	2170	34,97	33,37
18	2171	26,70	26,70
19	2176	27,36	27,69
20	2182	24,95	24,89
21	2183	27,08	28,01
22	2187	25,32	26,12
23	2192	25,93	25,98
24	2204	28,25	28,20
25	2210	31,19	30,54
26	2213	31,78	33,20
27	2216	33,39	34,36
28	2217	28,63	28,02
29	2218	31,35	30,52
30	2224	26,07	26,34
31	2227	27,48	27,52
32	2230	31,76	32,01
33	2234	26,80	26,33
34	2247	29,28	29,21
35	2248	27,09	26,84
36	2251	26,55	26,92
37	2258	30,17	30,10
38	2268	27,26	27,16
39	2273	29,11	28,88
40	2285	26,62	26,58
41	2286	30,88	31,43
42	2300	25,44	25,41
43	2301	29,35	29,10
44	2302	27,81	27,66
45	2305	26,47	26,17
46	2310	29,45	28,01
47	2314	23,98	24,12
48	2345	24,96	25,18
49	2348	26,64	26,54

Tab.41: Gegenüberstellung der PCR-Ergebnisse Rad51-1 (#17) und Rad51-2 (#36)

Anzahl	Probenr	Ratio Rad51-1(#17)/PBGD	Ratio Rad51-2(#36)/PBGD	Ratio Rad51-1(#17)/HPRT	Ratio Rad51-2(#36)/HPRT
1	2058	1,53	1,53	1,65	1,64
2	2065	1,72	2,44	3,11	4,41
3	2073	10,02	7,47	9,61	7,16
4	2076	1,20	1,49	2,93	3,64
5	2079	1,27	1,63	1,61	2,07
6	2107	3,85	2,81	4,47	3,26
7	2113	1,04	1,11	1,49	1,58
8	2121	5,46	4,45	10,93	8,90
9	2126	2,09	3,36	2,26	3,63
10	2134	13,50	16,36	2,35	2,84
11	2136	6,40	6,07	16,09	15,27
12	2139	1,06	2,08	0,59	1,16
13	2144	6,22	5,14	14,14	11,68
14	2160	3,29	4,12	3,17	3,97
15	2161	3,04	3,55	2,90	3,39
16	2168	3,11	2,97	4,86	4,64
17	2170	5,38	13,29	0,79	1,95
18	2171	6,49	6,83	1,90	2,00
19	2176	8,25	6,85	3,73	3,09
20	2182	16,88	19,35	4,34	4,98
21	2183	10,25	5,74	1,31	0,73
22	2187	8,36	5,34	2,59	1,65
23	2192	18,14	18,84	1,81	1,88
24	2204	5,29	5,54	1,94	2,03
25	2210	0,79	1,15	1,16	1,67
26	2213	2,14	0,77	5,88	2,10
27	2216	0,74	0,34	5,87	2,72
28	2217	5,14	7,73	6,33	9,52
29	2218	0,84	1,36	1,69	2,74
30	2224	14,56	12,96	3,47	3,09
31	2227	5,78	5,80	1,37	1,37
32	2230	2,82	2,20	2,80	2,18
33	2234	4,55	6,53	2,28	3,27
34	2247	2,14	2,21	2,71	2,80
35	2248	3,31	4,08	2,36	2,90
36	2251	5,80	4,78	2,67	2,20
37	2258	2,26	2,28	1,95	1,97
38	2268	5,05	5,60	1,28	1,42
39	2273	1,17	1,35	0,47	0,54
40	2285	7,59	8,22	2,19	2,38
41	2286	6,05	3,96	4,14	2,71
42	2300	4,77	5,29	8,43	9,36
43	2301	1,32	1,53	0,80	0,92
44	2302	4,69	5,32	0,97	1,10
45	2305	3,78	4,89	1,49	1,93
46	2310	13,21	33,88	0,49	1,25
47	2314	10,72	11,06	1,54	1,59
48	2345	7,84	7,43	2,50	2,37
49	2348	4,51	5,06	2,24	2,52

Tab.42: n-fache mRNA-Expression von Rad 51 je Probe im Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Brustgewebe in Relation zu den Referenzgenen, berechnet nach der delta-Ct-Methode

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Absolute Fallzahlen jährlicher Neuerkrankungen und Todesfälle an Brustkrebs für Frauen in Deutschland	6
Abb. 2: Vereinfachtes Modell für die Funktion von p53, BRCA1, BRCA2 und Rad51 bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur.	12
Abb. 3: Prinzip der Färbemethode	19
Abb. 4: Bildbeispiele der immunhistochemischen Färbung von drei Mammakarzinom-Paraffinschnitten mit dem Rad51-Antikörper.	29
Abb. 5: Gruppierung der Tumorproben nach Rad51-Immunreaktion nach dem PP-Score	30
Abb. 6: Einzelwerte der Rad51-PCI-Werte von 49 Mammakarzinomen und 11 gutartigen Gewebeanteilen im Vergleich	30
Abb. 7: PCI-Mittelwerte der Rad51-Protein-Expression in malignem und benignem Gewebe	31
Abb. 8: Realtime-PCR mit einer Verdünnungsreihe einer cDNA von Brustkrebsproben zur Ermittlung der Effizienz	36
Abb. 9: Nachweis der Größe von Amplifikaten	37
Abb.10: Schmelzkurvenanalyse der Primerpaare,	37
Abb.11: Formel zur Berechnung der Ratio der Rad51-Expression	38
Abb.12: Ratio der Rad51-Expression in Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Gewebe normalisiert mit dem jeweiligen Referenzgen:	39
Abb.13: Gegenüberstellung der Ct-Werte der beiden Primer Rad51-1 (#17) und Rad51-2 (#36)	46
Abb.14: Ergebnisse der Immunhistochemie ♦ (PCI %) und PCR □ (delta-CT Wert)	47

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung histologischer Merkmale der untersuchten Mammakarzinomproben	16
Tab. 2: Laborgeräte Immunhistochemie	16
Tab. 3: Chemikalien Immunhistochemie	17
Tab. 4: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung der Mammakarzinom-Paraffinschnitte	18
Tab. 5: Geräte mRNA-Nachweis	21
Tab. 6: Reagenzien mRNA-Nachweis	21
Tab. 7: Ansatz der cDNA-Synthese	22
Tab. 8: PCR Ansatz	24
Tab. 9: PCR Protokoll	24
Tab.10: Primer Sequenzen der Primer Nr. 17 (Rad51-1) und Primer Nr. 36 (Rad51-2)	26
Tab.11: Primersequenzen/Lieferanten der Referenzgene	26
Tab.12: Rad51- Proteinexpression nach dem PP-Score innerhalb der klinischen Gruppen	32
Tab.13: Rad51-Proteinexpression bezogen auf den Her/2neu-Status	33
Tab.14: Rad51-Proteinexpression bezogen auf die TumorgroÙe	33
Tab.15: Rad51-Proteinexpression bezogen auf das Tumorigradung im Gesamtkollektiv	33
Tab.16: Rad51-Proteinexpression bezogen auf das Tumorigradung in der Untergruppe der duktal invasiven Karzinome	34
Tab.17: Rad51-Proteinexpression bezogen auf den Tumortyp	34
Tab.18: Rad51-Proteinexpression bezogen auf den Hormonrezeptor- und Nodalstatus	35
Tab.19: Mit Verdünnungsreihen von cDNA errechnete Effizienzen der Ziel- und Referenzgene	36
Tab.20: Ratio der Rad51-Expression in Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu benignem Gewebe normalisiert mit dem jeweiligen Referenzgen	38
Tab.21: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe normalisiert mit dem Referenzgen PBGD	40
Tab.22: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe normalisiert mit dem Referenzgen HPRT	40
Tab.23: Ratio der Rad51-mRNA Expression zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe der verwendeten Referenzgene und Zielgene, nicht normalisiert	40
Tab.24: Gegenüberstellung der Rad51 mRNA-Expression mit den klinischen Tumordaten	41

Tab.25: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen den Gruppen des Tumorgradings G2 gegen G3, normalisiert mit dem Referenzgen HPRT	42
Tab.26: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen den Gruppen des Tumorgradings G2 gegen G3, normalisiert mit dem Referenzgen PBGD	42
Tab.27: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen den Gruppen des Tumorgradings G2 gegen G3, nicht normalisiert	42
Tab.28: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen den Gruppen der Tumorgröße T1+T2 gegen T3+T4, normalisiert mit dem Referenzgen HPRT	43
Tab.29: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen den Gruppen der Tumorgröße T1+T2 gegen T3+ T4, normalisiert mit dem Referenzgen PBGD	43
Tab.30: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen den Gruppen der Tumorgröße T1+T2 gegen T3+T4, nicht normalisiert	43
Tab.31: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Hormonrezeptor-positiven- und negativen Tumoren, normalisiert mit HPRT	43
Tab.32: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Hormonrezeptor-positiven- und negativen Tumoren, normalisiert mit PBGD	43
Tab.33: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Hormonrezeptor-positiven- und negativen Tumoren, nicht normalisiert	44
Tab.34: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Her2/neu-positiven- und negativen Tumoren, normalisiert mit HPRT	44
Tab.35: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Her2/neu-positiven- und negativen Tumoren, normalisiert mit PBGD	44
Tab.36: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen Her2/neu-positiven- und negativen Tumoren, nicht normalisiert	44
Tab.37: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen nodalpositiven und nodalnegaativen Tumoren, normalisiert mit HPRT	45
Tab.38: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen nodalpositiven und nodalnegaativen Tumoren, normalisiert mit PBGD	45
Tab.39: Rad51-mRNA Expressionsunterschied zwischen nodalpositiven und nodalnegaativen Tumoren, nicht normalisiert	45
Tab.40: Korrelationskoeffizient Rad51-Proteingehalt (PCI %) und mRNA (delta ct-Wert)	47
Tab.41: Gegenüberstellung der PCR-Ergebnisse Rad51-1 (#17) und Rad51-2 (#36)	66
Tab.42: n-fache mRNA-Expression von Rad 51 je Probe	67

8. Danksagung

Ich danke Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dorothea Fischer für die stetige Betreuung und die schnelle Korrekturbereitschaft während der Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Klaus Diedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Ein herzliches Dankeschön geht an das Labor der Frauenklinik für die stets freundliche und fachkundige Hilfestellung. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Frank Köster für seine kontinuierliche und flexible Unterstützung und Frau Barbara Nehls für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei den praktischen Arbeiten.

Herrn Prof. Horst-W. Stürzbecher danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas und für die Betreuung der Arbeiten im Pathologischen Institut.

Ausserdem danke ich dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Lübeck für die Bereitstellung von Laborgeräten und Herrn Prof. Dr. Stefan Krüger für die fachkundige Beratung in pathologischen Fragen. Frau Frosso Boutou aus Griechenland danke ich für die Einführung in die Laborarbeit.

Ein weiteres Dankeschön geht nach Greifswald an Herrn Prof. Marek Zygmunt, Direktor der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Greifswald für die Bereitstellung des Bildanalysemikroskops. Frau Dr. Frauke Steinmüller vom Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Greifswald danke ich für ihre flexible Hilfe von pathologischer Seite.

9. Lebenslauf

NAME	Britta Hebenbrock
GEBURTSDATUM	02.06.1964
GEBURTSORT	Hamburg
STAATSANGEHÖRIGKEIT	deutsch
FAMILIENSTAND	ledig
SCHULBESUCH	
1970 –1974	Grundschule in Geesthacht
1974 -1983	Otto-Hahn-Gymnasium Geesthacht Abschluss: Abitur
AUSBILDUNG	
1983 - 1984	Staatl. Fremdsprachenschule Hamburg Abschluss: Fremdsprachliche Sekretärin
BERUFLICHE TÄTIGKEIT	
1984 –1997	Fa. Andenex-Chemie als Fremdsprachensekretärin und Assistenz der Geschäftsleitung
STUDIUM	
WS 97/98	Spanisch und Portugiesisch, Universität Hamburg
MEDIZINISCHE AUSBILDUNG	
1998 – 2004	Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg März 2000 Absolvierung der Ärztlichen Vorprüfung März 2001 Absolvierung des 1. Abschnitts März 2003 Absolvierung des 2. Abschnitts Mai 2004 3. Staatsexamen
6/2004 – 3/2008	Assistenzärztin in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck , Direktor : Prof. K. Diedrich

seit 4/2008	Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Greifswald, Direktor: Prof. M. Zygmunt
PROMOTION	
1/2005 – 5/2009	Bearbeitung des Themas : „Expression der mRNA und des Proteins des Rekombinationsfaktors Rad51 beim Mammakarzinom“ in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck
Mai 2007	Bewilligung von Fördermitteln von 7000,-- EUR der Kreitz-Stiftung zur Unterstützung des o.g. Projektes
Veröffentlichung	Hebenbrock B, Nehls B, Köster F, Fischer D, Diedrich K, Zygmunt M, Stürzbecher HW, Poster DGGG 9/2008 : „Vergleich des immunhistochemischen Proteinnachweises mit der mRNA-Expression des Rekombinationsfaktors Rad51 beim Mammakarzinom“

Lübeck, 15.05.2009