

**Die Identifizierung und Validierung neuer potentieller Blut-basierter
Früherkennungs-Biomarker sowie die funktionelle Charakterisierung
von ITIH5 im humanen Mammakarzinom**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen
University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin Vera Kloten

aus Sinzig

Berichter: Universitätsprofessor: Prof. Dr. rer. nat. Edgar Dahl

Universitätsprofessor: Prof. Dr. rer. nat. Björn Usadel

Tag der mündlichen Prüfung: 10. April 2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| INHALTSVERZEICHNIS ----- | II |
| ZUSAMMENFASSUNG----- | VII |
| SUMMARY----- | IX |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ----- | XI |
| 1. EINLEITUNG----- | 1 |
| 1.1 DAS HUMANE MAMMAKARZINOM ----- | 1 |
| 1.1.1 DIE ANATOMIE DER WEIBLICHEN BRUST ----- | 1 |
| 1.1.2 DIE EPIDEMIOLOGIE DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS ----- | 2 |
| 1.1.3 DIE HISTOLOGIE UND KLASSIFIZIERUNG DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS----- | 3 |
| 1.1.4 GENETISCHE URSACHEN DER ENTSTEHUNG DES MAMMAKARZINOMS ----- | 7 |
| 1.1.4.1 TUMORSUPPRESSORGENE ----- | 7 |
| 1.1.4.2 PROTO-ONKOGENE ----- | 8 |
| 1.2 EPIGENETIK ----- | 9 |
| 1.2.1 GRUNDLAGEN DER EPIGENETIK ----- | 9 |
| 1.2.1.1 HISTON-MODIFIKATIONEN ----- | 10 |
| 1.2.1.2 DNA-METHYLIERUNG----- | 11 |
| 1.2.2 DIE DNA-METHYLIERUNG IN DER TUMORGENESE ----- | 14 |
| 1.2.3 DIE DNA-METHYLIERUNG IM HUMANEN MAMMAKARZINOM ----- | 16 |
| 1.2.4 DIE KLINISCHE RELEVANZ DER DNA-METHYLIERUNG ALS BIOMARKER FÜR DIE BLUT- BASIERTE BRUSTKREBS-FRÜHERKENNUNG----- | 18 |
| 1.2.4.1 DIE NOTWENDIGKEIT DER BRUSTKREBS-FRÜHERKENNUNG----- | 19 |
| 1.2.4.2 FREI ZIRKULIERENDE DNA IM BLUT (CFDNA) ----- | 20 |
| 1.2.4.3 POTENTIELLE BLUT-BASIERTE DNA-METHYLIERUNGS-BIOMARKER IN DER BRUSTKREBS- FRÜHERKENNUNG ----- | 21 |
| 1.3 <i>WINGLESS AND INTEGRATION SITE GROWTH FACTOR-</i> (WNT) SIGNALWEG ----- | 22 |
| 1.4 DIE INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR (ITI) PROTEIN FAMILIE ----- | 23 |
| 1.4.1 <i>ITIH5</i> ALS PUTATIVES METASTASIERUNGSSUPPRESSORGEN DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS ----- | 25 |
| 1.5 N-MYC <i>DOWNSTREAM</i> REGULIERTE GENFAMILIE (NDRG)----- | 26 |
| 1.5.1 NDRG2 IN DER TUMORGENESE MIT DEM FOKUS AUF DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM----- | 27 |

| | | |
|--------|--|----|
| 1.6 | ZIELSETZUNG DER ARBEIT ----- | 29 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN----- | 32 |
| 2.1 | KLINISCHES PROBENMATERIAL ----- | 32 |
| 2.1.1 | KRYOKONSERVIERTES HUMANES FRISCHGEWEBE ----- | 32 |
| 2.1.2 | KRYOKONSERVIERTE HUMANE SERUMPROBEN ----- | 32 |
| 2.2 | HUMANE MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN----- | 33 |
| 2.3 | GERÄTE, SOFTWARE, CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL----- | 34 |
| 2.3.1 | GERÄTE----- | 34 |
| 2.3.2 | SOFTWARE UND DATENBANKEN----- | 34 |
| 2.3.3 | CHEMIKALIEN----- | 35 |
| 2.3.4 | LÖSUNGSMITTEL ----- | 35 |
| 2.4 | PUFFER UND LÖSUNGEN ----- | 36 |
| 2.5 | MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR ----- | 37 |
| 2.6 | MONOKLONALE UND POLYKLONALE ANTIKÖRPER ----- | 37 |
| 2.7 | DETEKTIONSKIT FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE ----- | 37 |
| 2.8 | MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS----- | 38 |
| 2.9 | OLIGONUKLEOTIDE ----- | 38 |
| 2.9.1 | OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE PYROSEQUENZIERUNG ----- | 38 |
| 2.9.2 | OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (MSP)----- | 39 |
| 2.9.3 | OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE QUANTITATIVE METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (QMSP)----- | 40 |
| 2.9.4 | OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEMIQUANTITATIVE <i>REAL-TIME</i> PCR ----- | 40 |
| 2.10 | VEKTOREN ----- | 41 |
| 2.11 | siRNA ----- | 41 |
| 2.12 | MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN ----- | 41 |
| 2.12.1 | DNA-ISOLATION AUS KRYOKONSERVIERTEM FRISCHGEWEBE UND HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN ----- | 41 |
| 2.12.2 | ISOLATION FREI ZIRKULIERENDER DNA AUS HUMANEM SERUM ----- | 42 |
| 2.12.3 | GESAMT-RNA ISOLATION AUS KRYOKONSERVIERTEM FRISCHGEWEBE UND HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN ----- | 42 |
| 2.12.4 | PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN ----- | 43 |
| 2.12.5 | REVERSE TRANSKRIPTION (cDNA-SYNTHESE)----- | 43 |
| 2.12.6 | <i>REAL-TIME</i> POLYMERASE KETTENREAKTION (RT-PCR)----- | 44 |

| | | |
|-----------|--|----|
| 2.12.7 | BISULFIT-UMWANDLUNG GENOMISCHER DNA AUS HUMANEM GEWEBE UND SERUM ----- | 47 |
| 2.12.8 | METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (MSP)----- | 49 |
| 2.12.9 | QUANTITATIVE METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (qMSP)----- | 50 |
| 2.12.10 | ANALYTISCHE EFFIZIENZ DER qMSP-TESTS ----- | 52 |
| 2.12.10.1 | ISOLATION VON LEUKOZYTEN-DNA AUS VOLLBLUT----- | 52 |
| 2.12.10.2 | <i>IN VITRO</i> DNA-METHYLIERUNG ----- | 53 |
| 2.12.10.3 | VERDÜNNUNGSREIHE UND <i>SPIKING</i> -EXPERIMENT ----- | 53 |
| 2.12.11 | AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ----- | 54 |
| 2.12.12 | QUANTITATIVE ANALYSE DER DNA-METHYLIERUNG MITTELS DER PYROSEQUENZIERUNG --- | 55 |
| 2.13 | PROTEINCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN ----- | 59 |
| 2.14.6 | HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (HE-FÄRBUNG) VON GEWEBESCHNITTEN ----- | 59 |
| 2.13.2 | IMMUNHISTOCHEMIE (IHC) AN PARAFFINFIXIERTEM GEWEBE ----- | 59 |
| 2.13.3 | ISOLATION VON GESAMTPROTEIN AUS HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN ----- | 61 |
| 2.13.4 | SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)----- | 62 |
| 2.13.5 | WESTERNBLOTTING UND IMMUNODETEKTION----- | 63 |
| 2.14 | ZELLBIOLOGISCHE METHODEN ----- | 64 |
| 2.14.1 | KRYOKONSERVIERUNG VON HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN ----- | 64 |
| 2.14.2 | KULTIVIERUNG DER HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN BT20 UND MDA-MB-231 -- | 64 |
| 2.14.3 | ZELLZAHLBESTIMMUNG ----- | 65 |
| 2.14.4 | HERSTELLUNG VON STABILEN, GENETISCH-VERÄNDERTEN HUMANEN BT20- MAMMAKARZINOM-ZELLEN ----- | 66 |
| 2.14.5 | DIE <i>IN VITRO</i> DNA-DEMETHYLIERUNG----- | 68 |
| 2.14.6 | RNA-INTERFERENZ----- | 69 |
| 2.15 | FUNKTIONELLE <i>IN VITRO</i> EXPERIMENTE----- | 71 |
| 2.15.1 | XTT-PROLIFERATIONSTEST ----- | 71 |
| 2.15.2 | WUNDHEILUNGSTEST----- | 71 |
| 2.15.3 | KOLONIENBILDUNGSTEST (<i>COLONY FORMATION ASSAY</i>) ----- | 72 |
| 2.15.4 | ADHÄSIONSTEST ----- | 72 |
| 2.15.5 | GENEXPRESSIONS <i>MICROARRAY</i> ANALYSE DER ITIH5-BASIERTEN BT20 UND MDA-MB-231 TUMORMODELLE ----- | 73 |
| 2.16 | STATISTISCHE METHODEN ----- | 74 |
| 3. | ERGEBNISSE ----- | 76 |
| 3.1 | DIE IDENTIFIZIERUNG UND VALIDIERUNG POTENTIELLER BLUT-BASIERTER BRUSTKREBS FRÜHERKENNUNGS-BIOMARKER ----- | 76 |
| 3.1.1 | ERSTE STUFE: IDENTIFIZIERUNG SPEZIFISCHER FRÜHERKENNUNGS-BIOMARKER----- | 76 |
| 3.1.1.1 | ANALYTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER POTENTIELLEN BIOMARKER ----- | 77 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.1.1.2 | METHYLIERUNGSSTATUS DER POTENTIELLEN BIOMARKER IM HUMANEN MAMMAKARZINOM ----- | 78 |
| 3.1.1.3 | KLINISCHE SPEZIFITÄT DER POTENTIELLEN BIOMARKER----- | 79 |
| 3.1.1.4 | ANWENDBARKEIT DER KOMBINIERTEN <i>ITIH5</i> - UND <i>DKK3</i> -METHYLIERUNG----- | 81 |
| 3.1.2 | ZWEITE STUFE: VALIDIERUNG VON <i>ITIH5</i> UND <i>DKK3</i> ----- | 82 |
| 3.1.2.1 | ETABLIERUNG DER QMSP-TESTS----- | 82 |
| 3.1.2.2 | QMSP-BASIERTE DETEKTION DER <i>ITIH5</i> - UND <i>DKK3</i> -METHYLIERUNG----- | 86 |
| 3.1.2.3 | OPTIMIERUNG DER BIOMARKER-EFFIZIENZ----- | 89 |
| 3.1.2.4 | EFFIZIENZ DES 3-GEN-PANELS MIT <i>ITIH5</i> , <i>DKK3</i> UND <i>RASSF1A</i> ----- | 92 |
| 3.1.3 | KORRELATION DER <i>ITIH5</i> -, <i>DKK3</i> -, UND <i>RASSF1A</i> -METHYLIERUNG MIT KLINIKO- PATHOLOGISCHEN PARAMETERN----- | 94 |
| 3.2 | DIE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON <i>ITIH5</i> IM HUMANEN MAMMAKARZINOM----- | 97 |
| 3.2.1 | ETABLIERUNG EINES <i>IN VITRO</i> MAMMAKARZINOM-MODELLS----- | 98 |
| 3.2.2 | DIE FUNKTIONELLE <i>IN VITRO</i> ANALYSE DER <i>ITIH5</i> -EXPRESSION IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20----- | 100 |
| 3.2.2.1 | DER EINFLUSS VON <i>ITIH5</i> AUF PROLIFERATIVE EIGENSCHAFTEN IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20----- | 101 |
| 3.2.2.2 | DER EINFLUSS VON <i>ITIH5</i> AUF DIE KOLONIEBILDUNG IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM- MODELL BT20----- | 102 |
| 3.2.2.3 | DER EINFLUSS VON <i>ITIH5</i> AUF DIE ZELL-MATRIX ADHÄSION IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20----- | 103 |
| 3.2.2.4 | DER EINFLUSS VON <i>ITIH5</i> AUF DIE MIGRATIONSFÄHIGKEIT IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20----- | 106 |
| 3.3 | DIE ANALYSE <i>ITIH5</i> -ASSOZIIERTER ZIELGENE IN DEN HUMANEN <i>ITIH5</i> MAMMAKARZINOM- MODELLEN BT20 UND MDA-MB-231----- | 108 |
| 3.3.1 | DIE IDENTIFIZIERUNG <i>ITIH5</i> -ASSOZIIERTER GENMUSTER IN BT20-ZELLEN----- | 108 |
| 3.3.1.1 | GEN-ONTOLOGIE (GO) ANALYSE <i>ITIH5</i> -ASSOZIIERTER ZIELGENE IN BT20-ZELLEN----- | 111 |
| 3.3.1.2 | DIE <i>IN SILICO</i> ANALYSE <i>ITIH5</i> -ASSOZIIERTER ZIELGENE IN BT20-ZELLEN----- | 113 |
| 3.3.2 | DIE IDENTIFIZIERUNG <i>ITIH5</i> -ASSOZIIERTER GENMUSTER IN MDA-MB-231 ZELLEN----- | 117 |
| 3.3.2.1 | GEN-ONTOLOGIE (GO) ANALYSE <i>ITIH5</i> -ASSOZIIERTER ZIELGENE IN MDA-MB-231-ZELLEN ----- | 120 |
| 3.3.2.2 | DIE ANALYSE ECM-ASSOZIIERTER <i>ITIH5</i> ZIELGENE IN MDA-MB-231-ZELLEN----- | 122 |
| 3.3.2.3 | METHYLIERUNGSANALYSE <i>ITIH5</i> -ASSOZIIERTER ZIELGENE----- | 124 |
| 3.4 | DAS TUMORSUPPRESSORGEN <i>NDRG2</i> ALS POTENTIELLES <i>TARGET</i> DER <i>ITIH5</i> - VERMITTELTELTEN SIGNALTRANSDUKTION----- | 126 |
| 3.4.1 | PYROSEQUENZIERUNGSANALYSE DES <i>NDRG2</i> -PROMOTORS----- | 126 |
| 3.4.2 | <i>NDRG2</i> -REEXPRESSION NACH <i>IN VITRO</i> DEMETHYLIERUNG----- | 128 |
| 3.4.3 | DIE ASSOZIATION DER <i>ITIH5</i> - UND <i>NDRG2</i> -EXPRESSION IN PRIMÄREN MAMMAKARZINOMEN - ----- | 130 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.4.4 | DER EINFLUSS DER <i>ITIH5</i> - <i>NDRG2</i> -EXPRESSION AUF DAS UNIVARIATE UND MULTIVARIATE ÜBERLEBEN DER PATIENTINNEN ----- | 133 |
| 3.4.5 | DIE <i>IN SILICO</i> ANALYSE DER <i>NDRG2</i> - <i>ITIH5</i> -EXPRESSIONSACHSE IM MAMMAKARZINOM ---- | 134 |
| 3.4.6 | DER EINFLUSS DES <i>NDRG2</i> <i>KNOCK-DOWN</i> AUF DAS WACHSTUMSVERHALTEN VON MDA-MB-231-ZELLEN----- | 136 |
| 3.4.6.1 | DER EINFLUSS DES <i>NDRG2</i> -VERLUSTS AUF DIE ZELLPROLIFERATION ----- | 138 |
| 3.4.6.2 | DER EINFLUSS DES <i>NDRG2</i> -VERLUSTS AUF DIE ZELLMIGRATION ----- | 140 |
| 4. | DISKUSSION ----- | 142 |
| 4.1 | CHARAKTERISIERUNG DER NEUEN PUTATIVEN SERUM-ASSOZIIERTEN BRUSTKREBS FRÜHERKENNUNGS-BIOMARKER <i>ITIH5</i> UND <i>DKK3</i> ----- | 142 |
| 4.2 | DAS BIOLOGISCHE WIRKUNGSSPEKTRUM VON <i>ITIH5</i> IM HUMANEM MAMMAKARZINOM----- | 149 |
| 4.3 | DAS TUMORSUPPRESSORGEN <i>NDRG2</i> ALS POTENTIELLES <i>ITIH5</i> <i>TARGET</i> ----- | 160 |
| 5. | LITERATUR ----- | 163 |
| | ABBILDUNGSVERZEICHNIS ----- | 186 |
| | TABELLENVERZEICHNIS ----- | 189 |
| A. | ANHANG ----- | 191 |
| A.1 | KLASSIFIKATION MALIGNER TUMORE ----- | 191 |
| A.1.1 | <i>STAGING</i> DES MAMMAKARZINOMS ----- | 191 |
| A.1.2 | HISTOLOGISCHE GRADUIERUNG DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS ----- | 192 |
| A.1.3 | AUSWERTESYSTEM DES HISTOLOGISCHEN SUMMENScores----- | 192 |
| A.2 | EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN PATIENTEN-KOHORTE ----- | 193 |
| A.3 | 61-GEN-SIGNATUR DES HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELLS BT20----- | 194 |
| A.4 | DANKSAGUNG ----- | 196 |

ZUSAMMENFASSUNG

Die mammographische Detektion eines Mammakarzinoms ist mit einigen Schwachpunkten verbunden, die in einer anhaltenden kontroversen Diskussion über das Nutzen des *Screening* Verfahrens resultiert. Ein wichtiges Ziel der modernen Medizin ist daher die Validierung neuartiger, nicht-invasiver analytischer Methoden die einen Brusttumor frühzeitig anzeigen können. Diesen neuartigen Ansatz bieten DNA-basierte Methylierungsmarker, die ein enormes Potential besitzen mit einer hohen Spezifität und Sensitivität Tumor-spezifische cfDNA im Serum von Mammakarzinom-Patientinnen nachzuweisen und so das Vorhandensein eines Tumors früh aufzuzeigen.

Basierend auf dem größten derzeitig beschriebenen Serum-Kollektiv (n=604) in der Blut-basierten Brustkrebs-Früherkennungsforschung, konnten im Rahmen dieser Arbeit aus initial sechs analysierten potentiellen Kandidatengen die putativen Tumorsuppressorgene *DKK3* und *ITIH5* als hoch spezifische potentielle Biomarker validiert werden. Die kumulative cfDNA-Methylierung des *DKK3-ITIH5* Biomarker-Dupletts erzielte in einem unabhängigen Validierungskollektiv eine Sensitivität von 40% bei einer Spezifität von 94% (AUC: 0,673, P<0,0001). Die Wahrscheinlichkeit das bei Positivität des Tests tatsächlich eine Erkrankung vorliegt (PPV) betrug 85%, während die Wahrscheinlichkeit bei Negativität des Tests an einem Mammakarzinom erkrankt zu sein bei 34% (NPV: 66%) lag. Eine signifikante Diskriminierung zwischen dem Mamma- und dem Kolonkarzinom war durch einen Spezifitätsverlust auf 52% nicht mehr gegeben. Dementgegen erwies sich das potentielle Biomarker-Duplett in der klinisch relevanten Subgruppe der prämenopausalen Patientinnen deutlich sensitiver (52%) bei maximaler Spezifität von 100% (AUC: 0,762, P<0,0001). Der vielfach beschriebene potentielle Biomarker *RASSF1A* führte in Kombination mit der *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung in dieser Studie zu einer gesteigerten Sensitivität von 67%, jedoch zu einer Verminderung der Spezifität auf 69%.

Die hohe Brustkrebs-Sterblichkeitsrate bedingt neben einer effektiven und robusten Früherkennungs-Analytik auch das Verständnis Tumorgenese-basierter molekularer Mechanismen, die eine individuelle Therapieentwicklung ermöglichen. Dem potentiellen Nutzen von *ITIH5* als Früherkennungs-Biomarker steht seine Funktion in der ECM-Stabilisierung und im Zuge dessen die putative Rolle als Metastasierungssuppressoren im Mammakarzinom gegenüber. So zeigten retrospektive Studien, dass der DNA-Methylierungs-assoziierte Verlust der *ITIH5*-Expression im Mammakarzinom zu einer reduzierten Rezidiv-freien- und Gesamtüberlebensrate führt, wobei der zelluläre *ITIH5*-Mechanismus unbekannt ist. Anhand zweier Zellkultur-basierter Tumormodelle, die nach der forcierten *ITIH5*-

Reexpression eine verringerte Proliferation- und Migrationsfähigkeit sowie eine erhöhte Zell-Matrix-Adhäsion aufwies, konnte über eine Genexpressions *Microarray* Analyse unter dem Einfluss von ITIH5 differenziell regulierte Gene identifiziert werden. Evident zeigte sich eine Annotation ITIH5-assoziiierter Zielgene in der Gen-Ontologie Klasse „extrazelluläre Matrix“ (ECM). Die ECM ist die zentrale Barriere maligner Zellen die im Verlauf der malignen Progression invadiert und abgebaut wird. Im Einklang mit dieser Beobachtung zeigte eine aktuelle Studie, dass die ITIH5-Expression in MDA-MB-231-Brustkrebszellen zu einer Auflösung von Stressfasern und deren zugehörigen fokalen Adhäsionsstellen führt, welche für die Zellbewegung notwendig sind. Weiterhin unterdrückt ITIH5 die mesenchymale Migration, welche als ein fundamentales Kennzeichen invasiver Tumorzellen angesehen wird. Aufbauend auf diesen Daten konnte im Rahmen dieser Arbeit in den ITIH5-positiven Zellen eine Demethylierung Tumorgenese-relevanter Gene (z.B. *NDRG2* und *EHD3*) gezeigt werden. Darüber hinaus korrelierte die *NDRG2*-Expression an *ex vivo* gewonnen Mammakarzinomgeweben auf RNA- und Proteinebene signifikant mit der ITIH5-Expression, obgleich der RNAi-vermittelte Verlust der *NDRG2*-Expression in dem komplexen Netzwerk ITIH5-assoziiierter Gene keine massive Auswirkung auf die Reaktivierung des Phänotyps in den ITIH5-positiven MDA-MB-231-Zellen aufzeigte. Vielmehr spielen in diesem Zusammenhang komplexe Interaktionen fokaler Adhäsionskomplex mit der ECM eine tragende Rolle. Diesbezüglich könnte der TGF- β Ko-Rezeptor Endoglin, der in den ITIH5-positiven Zellen vollständig reexprimiert wurde und an der Regulation fokaler Adhäsionskomplexe beteiligt ist, eine direkte Verbindung zu den intrazellulären Prozessen darstellen. Weiterhin konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die basale Expression der zytoplasmatischen Fokalen Adhäsions Kinase (FAK) in den ITIH5-positiven MDA-MB-231-Zellen erhöht vorliegt, jedoch nicht resultierend in einer erhöhten FAK-Phosphorylierung d.h. ITIH5 scheint die FAK-Aktivierung negativ zu beeinflussen. In diesem Signalweg wies zudem die Src-Kinase, als zentrale Schnittstelle, abhängig von ITIH5 Degradationserscheinungen auf. Die Annahme, dass ITIH5 die Src/FAK-Signalkaskade modifiziert, wird durch die erhöhte Expression von Caveolin-1, einem negativen Regulator der Src-Kinase sowie einer Reduktion der STAT1-Phosphorylierung, einem Zielmolekül der Src/FAK-Signalkaskade, verstärkt.

Zusammenfassend ist es in dieser Arbeit gelungen *ITIH5* und *DKK3* als hoch spezifische neue putative Blut-basierte Brustkrebs Früherkennungs-Biomarker zu verifizieren und darüber hinaus die tumorsuppressive Rolle von ITIH5 auf molekularer Ebene, insbesondere auf Basis erstmalig beschriebener assoziierter Signalwege zu untermauern.

SUMMARY

Mammography has become standard of care in breast cancer screening but the limitations are well-recognized resulting in an ongoing discussion about the screening necessity. Regarding these limitations of mammography in population-based screening the validation of novel minimally-invasive screening tests that could complement to mammography is an important research topic of modern medicine. There is a growing confidence that the next generation of screening tests will be based on molecular biomarkers present in bodily fluids. Determination of promoter methylation of tumor suppressor genes in the circulating free DNA (cfDNA) of serum is a rapidly growing research field in cancer detection, indicating high specificity and sensitivity of these biomarkers.

Based on the largest sample collection analyzed for serum based cfDNA methylation biomarkers so far, promoter methylation of the *DKK3-ITIH5* gene combination was highly significant compared to initially six analyzed candidate genes. In an independent validation set the combined *ITIH5*- and *DKK3*-methylation achieved 40% sensitivity with a high specificity of 94% (AUC: 0,673, $P < 0,0001$). In case of positivity the likelihood of an existent breast tumor was 85% (positive predictive value), while in case of negativity the likelihood of an existent breast tumor was 34% (negative predictive value: 66%). However, the cumulative *DKK3-ITIH5*-methylation failed in discriminating between breast and colon cancer with a reduction of specificity to 56%. In contrast, these biomarkers showed the capability to detect cfDNA methylation in the important clinical subgroup of premenopausal women revealing a higher sensitivity (52%) with a specificity of 100% (AUC: 0.762, $P < 0,0001$). In combination with *DKK3-ITIH5*-methylation the known potential biomarker *RASSF1A* increased sensitivity to 67%, but specificity of *RASSF1A* in healthy controls was quite low resulting in a reduction of specificity to 69% using the three-biomarker-panel (*DKK3*, *ITIH5*, *RASSF1A*).

Due to the high breast cancer related mortality rate, the understanding of tumor biological and molecular consequences is mandatory to further develop and targeted breast cancer therapy. Besides the potential use of *ITIH5* as an early detection biomarker, this putative metastasis suppressor gene encodes an extracellular matrix protein, being involved in extracellular matrix integrity. It is known that the DNA-methylation based loss of *ITIH5*-expression is associated with a reduction of patient's survival, while the functional characterization of *ITIH5*-related signaling pathways remains unknown. On the basis of two cell culture based gain-of-function tumors models, reduction of proliferation and migration capability as well as an enhanced cell-to-matrix adhesion was shown. Furthermore, a gene expression microarray identified differential regulated genes in *ITIH5*-positive cells.

Microarray analysis showed a clear classification of ITIH5-associated genes in Gene Ontology Annotation “extracellular matrix” (ECM). During malignant progression cancer cells overcome an ongoing degradation of the ECM, the central barrier of invasive cells. Consistent with this observation, a previous study revealed that ITIH5-expression in MDA-MB-231 breast tumor cells led to the disruption of stress fibers and their anchored focal adhesion sites, which are both necessary for cell movement. Therewith, ITIH5 could suppress specific mechanisms of the mesenchymal migration process that is defined as a fundamental hallmark of invasive cancer cells. In line with the different cell morphology a complete demethylation of cancer related genes, e.g. of the tumor suppressor gene *NDRG2* and *EHD3*, was found. Furthermore, *NDRG2* and ITIH5 RNA- and protein-expression correlated significant in breast cancer tissue. However, in the complex network of ITIH5-associated genes RNAi mediated *NDRG2* knock-down revealed no solid influence in reactivation of the phenotype of ITIH5-positive MDA-MB-231 cells. In this context, complex interactions of focal adhesion complex with the ECM play a supporting role. Since endoglin, a co-receptor of TGF- β 1 which is known to modulate the composition of focal adhesion sites was found to be re-expressed only in cells positive for ITIH5, it could be hypothesized that endoglin represents the direct connection to the extracellular compartment. While there was an increased expression of the non-receptor focal adhesion kinase (FAK) in ITIH5-positive cells, phosphorylation state was identical unregarded of ITIH5, i.e. ITIH5 seems to influence FAK activation. In this signaling pathway the non-receptor Src-kinase, an important component of FAK signaling, seems to be degraded in the presence of ITIH5. Therewith, a higher caveolin-1 expression and a decrease in STAT1 phosphorylation fit to the putative abruption of the Src/FAK-signaling pathway in the presence of ITIH5.

In conclusion, this study achieved the validation of the highly specific blood-based biomarkers *ITIH5* and *DKK3* for blood-based early detection of breast cancer. Moreover, molecular evidence was provided that ITIH5 mediates suppression of breast cancer invasion and metastasis *in vitro*, in particular on the basis of the first description of ITIH5-associated signaling pathways.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------|---|
| 5mC | 5-Methylcyotsin |
| A | Adenin |
| AG | Arbeitsgruppe |
| APS | Adenosinphosphosulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AUC | <i>Area under curve</i> |
| Aza | 5-Aza-2'-desoxycytidin |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| cDNA | komplementäre DNA |
| C | Cytosin |
| CDS | Kodierende Sequenz |
| cfDNA | <i>circulating free DNA</i> , frei zirkulierende DNA |
| CIS | <i>Carcinoma In Situ</i> |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CpG | Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid |
| CS | Chondroitinsulfat |
| CT | <i>Cycle threshold</i> ; Zyklusschwelle |
| DAB | Diaminobenzidin |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DCIS | Duktales <i>Carcinoma In Situ</i> |
| dCTP | Desoxycytidintriphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| d.h. | das heißt |
| DKK3 | Dickkopf-3 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DNMT | DNA-Methyltransferase |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dsDNA | Doppelsträngige DNA |
| DTT | DL-Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxythymidintriphosphat |
| E.coli | <i>Escherichia coli</i> |
| ECM | <i>Extracellular Matrix</i> ; extrazelluläre Matrix |
| EtOH | Ethanol |
| FA | Fokaler Adhäsionskomplex |
| FAK | <i>Focal Adhesion Kinase</i> ; Fokale Adhäsionskinase |
| FC | <i>Fold Change</i> ; Änderungsgrad |
| FFPE | Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet |
| FISH | <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> |

| | |
|-------|---|
| FKS | Fötales Kälberserum |
| FMFÜ | Fernmetastasen-freies Überleben |
| G | Guanin |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GAG | Glykosaminoglykane |
| GÜ | Gesamtüberleben |
| HA | <i>Hyaluronic Acid</i> , Hyaluronsäure |
| HAT | Histon-Acetyltransferase |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HER-2 | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i> |
| HR | <i>Hazard Ratio</i> ; Relatives Risiko |
| HRP | <i>Horse Raddish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| HTM | Histon-Methyltransferase |
| IDC | Invasiv-duktales Karzinom |
| IgG | Immunglobulin G |
| IHC | Immunhistochemie |
| ILC | Invasiv-lobuläres Karzinom |
| IRS | Immunreaktiver <i>Score</i> |
| ITI | Inter- α -trypsin inhibitor |
| ITIH5 | <i>Inter-α- trypsin inhibitor heavy chain 5</i> |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilo Dalton |
| KI | Konfidenzintervall |
| LCIS | Lobuläres Carcinoma <i>In Situ</i> |
| LOH | <i>Loss of Heterozygosity</i> ; Verlust der Heterozygotie |
| Lsg. | Lösung |
| MBD | Methyl-CpG-bindendes Protein |
| MCS | <i>Multi Cloning Site</i> ; multiple Klonierungsstelle |
| Min | Minute |
| MMP | Matrixmetalloproteinase |
| mRNA | <i>messenger RNA</i> ; Boten RNA |
| MSP | Methylierungsspezifische PCR |
| n | Anzahl |
| NDRG2 | <i>N-Myc downstream regulated gene 2</i> |
| NPV | Negativ prädiktiver Vorhersagewert |
| NTC | <i>No template control</i> ; Wasserkontrolle |
| OD | Optische Dichte |
| P | Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion |
| pN | Nodalstatus (postoperativ bestimmt) |
| pM | Fernmetastasenstatus (postoperativ bestimmt) |
| PPi | Pyrophosphat |

| | |
|-------|--|
| PPV | Positiv prädiktiver Vorhersagewert |
| pT | Tumorgröße (postoperativ bestimmt) |
| RFÜ | Rezidiv-freies Überleben |
| RKI | Robert-Koch-Institut |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| rpm | <i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute |
| ROC | <i>Receiver operating characteristics</i> |
| RT | Raum-Temperatur |
| RWTH | Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| Sek | Sekunde |
| SFRP1 | <i>Secreted frizzled receptor protein 1</i> |
| SFRP2 | <i>Secreted frizzled receptor protein 2</i> |
| SFRP5 | <i>Secreted frizzled receptor protein 5</i> |
| SHAP | <i>Serum-derived HA-associated protein</i> |
| ssDNA | <i>Single stranded DNA</i> ; Einzelstrang-DNA |
| T | Thymin |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| TDLE | Terminal-duktolebuläre Einheiten |
| TMA | <i>Tissue Microarray</i> , Gewebe-Mikroarray |
| TSA | Trichostatin A |
| TSS | <i>Transcription Start Site</i> ; Transkriptionsstartpunkt |
| U | Uracil |
| UICC | <i>Union International Centre le Cancer</i> |
| UK | Universitätsklinikum |
| ü.N. | über Nacht |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | Volumenanteil des gelösten Stoffes pro Gesamtvolumen |
| WIF1 | <i>Wnt inhibitory factor1</i> |
| WT | Wildtyp |
| w/v | <i>Weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen |
| XTT | sodium 2,3,-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)-carbonyl]-2H-tetrazolium |
| z.B. | zum Beispiel |

1. EINLEITUNG

1.1 DAS HUMANE MAMMAKARZINOM

1.1.1 DIE ANATOMIE DER WEIBLICHEN BRUST

Ein wesentlicher Bestandteil der weiblichen Brust (*Mamma*) ist der Drüsenkörper (*Corpus mammae*), der sich aus Binde- und Fettgewebe, Lymph- und Blutgefäßen sowie den epithelialen Drüsenstrukturen zusammensetzt. Jede Brustdrüse besteht aus 12-20 Brustdrüsenlappen (*Lobi glandulae mammae*). Das epitheliale Drüsengewebe eines Drüsenlappens differenziert sich in ein ausgedehntes duktales Gangsystem, bestehend aus den Milchgängen (*Ducti lactiferi*), die kleinere und größere Milch-abführende Gänge (*Ductuli*) besitzen, sowie einen eigenen Ausführgang auf der Brustwarze (*Papilla mammaria*) und einen lobulären Anteil, den Drüsenläppchen (*Lobuli glandulae mammae*) (Abb. 1-1 A). Die lobulären Anteile bilden zusammen mit den terminalen duktolobulären Einheiten (TDLE) die milchproduzierenden Strukturen. Die Drüsenläppchen sind aus einem inneren einschichtigen, luminalen Epithel aufgebaut und werden durch die Basalmembran räumlich von dem umgebenden Bindegewebe getrennt. Zusätzlich sind zwischen den luminalen Epithelzellen und der Basalmembran basale Epithelzellen lokalisiert. Dieser basale Zelltyp wird als Myoepithel bezeichnet und hat eine entscheidende Funktion für die Kontraktibilität der Milchdrüsen. Die kleinen Milchgänge sind ebenfalls aus einem einschichtigen Epithel aufgebaut, während die größeren Zweige des Gangsystems aus einem ein- bis zweischichtigen Epithel ausgekleidet sind: luminal liegen prismatische Epithelzellen, basal Myoepithelzellen, die auch dem Milchtransport dienen. Die Epithelgewebe der Dukti und Lobuli sind von stützendem Bindegewebe sowie von inter- und intralobulärem Stromagewebe umgeben (Abb. 1-1 B). Erst durch die weiblichen Sexualhormone in der Pubertät kommt es zur Zunahme des Stromas und zur Proliferation sowie Differenzierung des Drüsenbaumes zu laktierenden Brustdrüsen. Die Brustdrüse unterliegt daraufhin während jedem weiblichen Zyklus bis zur Menopause einem hohen hormonellen Einfluss (Lüllmann-Rauch 2003). Die ständigen hormonellen Veränderungen der Brust können die Entstehung eines malignen Tumors aus den Epithelzellen der Brustdrüse begünstigen.

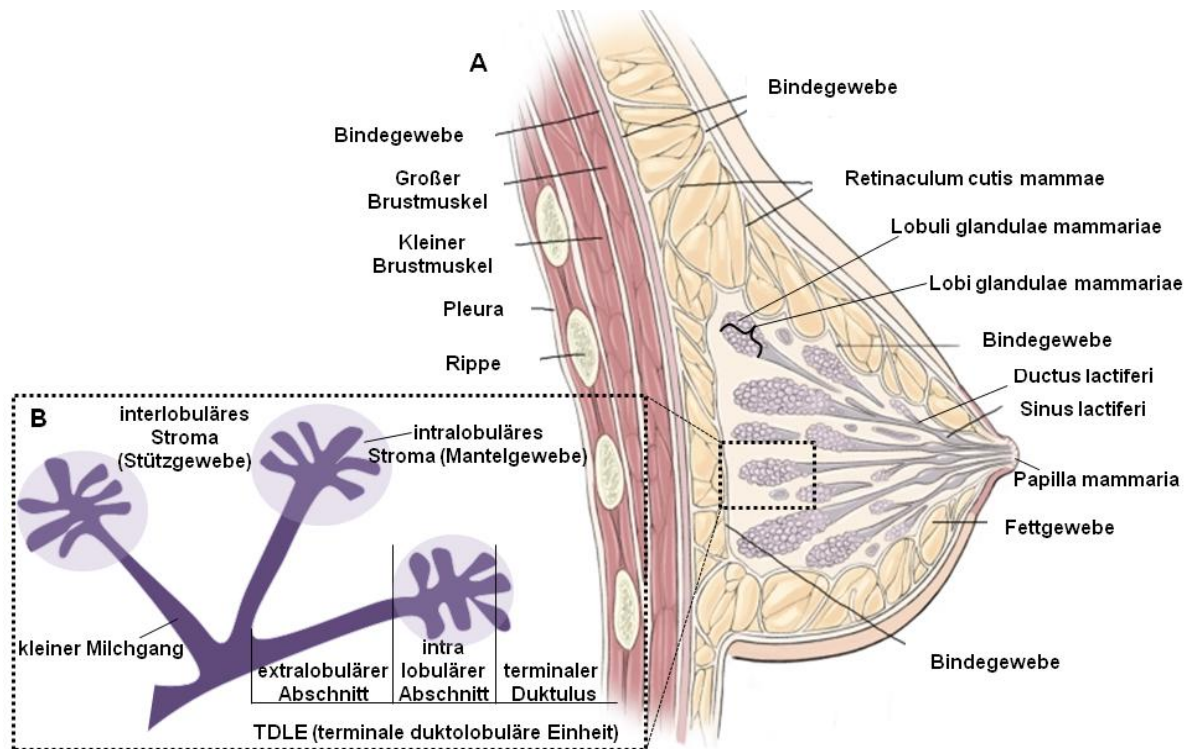


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der weiblichen Brustanatomie. (A) Querschnitt durch die weibliche Brust. (B) Ansicht einer terminalen duktolobulären Einheit (verändert: nach Harness *et al.* 2011).

1.1.2 DIE EPIDEMIOLOGIE DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS

Das Mammakarzinom ist die häufigste bösartige Erkrankung bei Frauen in Deutschland und weltweit. Eine Erkrankung der Brustdrüse ist mit einer Inzidenz von 32,1% für fast ein Drittel aller Krebserkrankungen bei Frauen in Deutschland verantwortlich (Abb. 1-2). Nach aktuellen Schätzungen der *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland* (GEKID, 8. Ausgabe 2012) erkrankten im Jahr 2012 etwa 74.500 Frauen neu an Brustkrebs, während 2008 die Neuerkrankungszahl noch bei 71.660 Frauen lag. Kinderlosigkeit, ein höheres Alter bei der ersten Geburt, eine frühe erste Menarche und eine späte Menopause sowie Faktoren des Lebensstils wie Alkoholkonsum und Übergewicht werden als Gründe für die steigende Inzidenzrate beim Mammakarzinom und des Erkrankungsrisiko allgemein vermutet (Hulka & Moorman 2008; Key *et al.* 2006). Eine Hormonersatztherapie mit Östrogenen in und nach den Wechseljahren ist mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko assoziiert (Geller & Chlebowski 2003). Hormonhaltige Ovulationshemmer zeigen dagegen nur einen geringfügigen Einfluss auf das Brustkrebsrisiko (Zhu *et al.* 2012). Zudem sind bei etwa 5-10% der Brustkrebsfälle genetische Dispositionen die Ursache der Erkrankung. Das Erkrankungsrisiko nimmt vor allem mit fortschreitendem Alter zu. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 65 Jahren, wobei

etwa jede vierte betroffene Frau bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre und jede zehnte noch keine 45 Jahre alt ist (GEKID, 8. Ausgabe 2012).

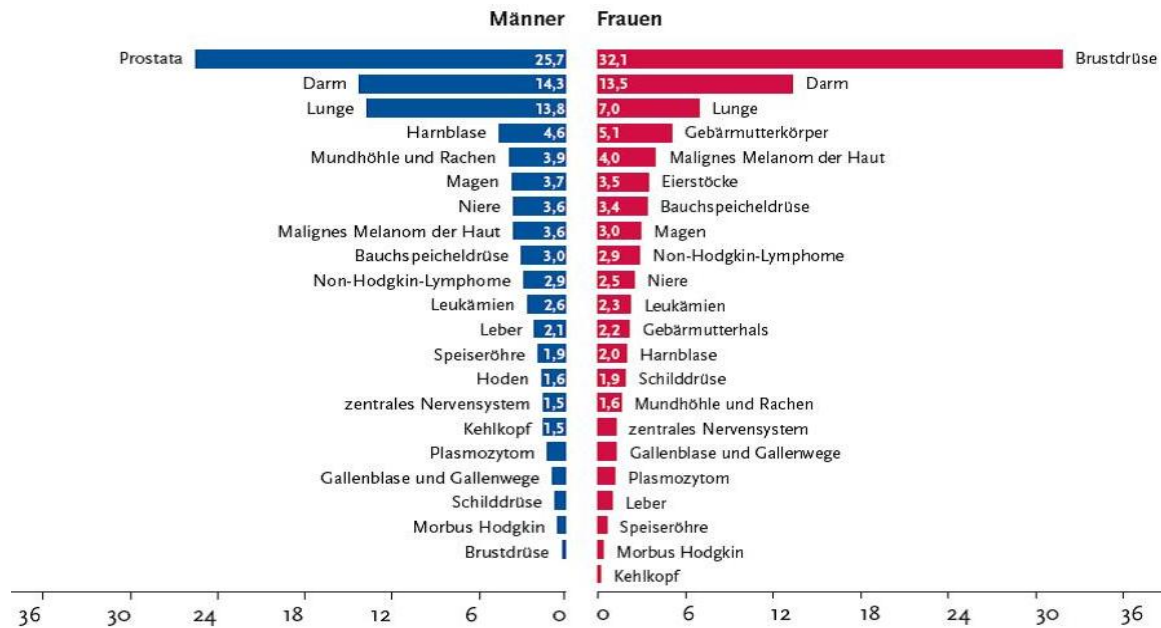


Abbildung 1-2: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen aller Krebs-Neuerkrankungen in Deutschland 2012 (GEKID, 8. Ausgabe 2012).

Laut der amtlichen Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden starben im Jahr 2008 in Deutschland 17.209 Frauen an Brustkrebs. Damit steht Brustkrebs mit einem prozentualen Anteil von 24% an erster Stelle der Krebs-bedingten Sterbefälle bei Frauen in Deutschland. Trotz der gestiegenen Erkrankungszahlen sterben heute weniger Frauen an Brustkrebs als noch vor 20 Jahren. Ein maligner Tumor der Brust, der frühzeitig entdeckt wird, hat eine gute Prognose mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 90%. Ist der Tumor bereits metastasiert, sinkt die Überlebensrate auf 20% (Etzioni *et al.* 2003). Die Überlebenschancen haben sich durch die Einführung der Routine-Mammographie im Jahr 2005 und Fortschritte in der Therapie verbessert, aber dennoch wird frühestens ab etwa 2015 erkennbar sein, ob das generelle Mammographie-Screening eine weitere Reduktion der Brustkrebssterblichkeit bewirken kann (GEKID, 8. Ausgabe 2012).

1.1.3 DIE HISTOLOGIE UND KLASSIFIZIERUNG DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS

Das Mammakarzinom stellt histopathologisch eine sehr heterogene Erkrankung dar, wobei zwischen invasiven und nicht-invasiven Formen unterschieden werden muss. Die weltweit häufigste Form eines invasiven Mammakarzinoms ist duktales Ursprungs (IDC, invasiv duktales Karzinom, Milchgangkarzinom), mit einem Anteil von 40%-75% aller diagnostizierten Karzinome. Das invasive lobuläre Karzinom (ILC, Läppchenkarzinom) wird

in 10%-14% der Brustkrebsfälle diagnostiziert. Seltenerer Formen sind die muzinösen, die medullären und die fibrozystischen Mammakarzinome (zusammen 5% - 10%) (Mallon *et al.* 2000). Die Entstehung und die Progression eines Mammakarzinoms beruht auf einer Häufung von genetischen und epigenetischen Modifikationen, die sich anfangs in benignen Läsionen der Epithelien äußern. Diese benignen Hyperplasien sind meist schlecht diagnostizierbar und können sich zu den malignen *in situ* Karzinomen entwickeln. Die *in situ* Karzinome werden als nicht-invasive Präkanzerosen eingestuft, welche im Verlauf der Tumorgenese die Basalmembran durchbrechen und schließlich in malignen Läsionen münden können (Fonseca *et al.* 1997). Das erste Modell zur Entstehung eines invasiven duktales Mammakarzinoms stammt von Wellings *et al.*, welche flache epitheliale Atypien (FEA), atypische duktales Hyperplasien (ADH) und duktales *in situ* Karzinome als nicht zwingend auftretende Vorstufen von invasiven und metastatischen duktales Karzinomen beobachteten (Wellings *et al.* 1975) (Abb. 1-3 A). Dabei scheint die Mehrzahl der Mammakarzinome von der terminalen duktolobulären Einheit (TDLE) auszugehen (Wellings *et al.* 1975). Um sich an die physiologischen Bedingungen der Brustdrüse anzupassen, unterliegen die Zellen der TDLE einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung. Daraus resultiert vermutlich eine höhere Anfälligkeit für genetische Mutationen, die in abnormer Zellaktivität und letztendlich einer Neoplasie münden können (Tavassoli 1992). Das lobuläre Karzinom zeigt ebenfalls atypische lobuläre Hyperplasien (ALH) und lobuläre *in situ* Karzinome (LCIS) als Vorstufen des ILC, wobei der Ursprung aus den lobulären *in situ* Karzinomen noch umstritten ist (Buerger *et al.* 2000). Die detaillierte histologische Beschreibung unterschiedlicher Formen und Stadien von gesundem bis neoplastischen Brustdrüsengewebe hat zu der Vorstellung eines *in vivo multi-step* Karzinogenese-Modells geführt (Russo *et al.* 1998). Dieses Modell verdeutlicht ausgehend von gesundem Brustgewebe die Tumorprogression über atypische Hyperplasien und den nicht-invasiven *in situ* Karzinomen zu den invasiven Karzinomen und schließlich der Metastasierung, deren Fortschreiten sich über 30 Jahre erstrecken kann (Abb. 1-3 B).

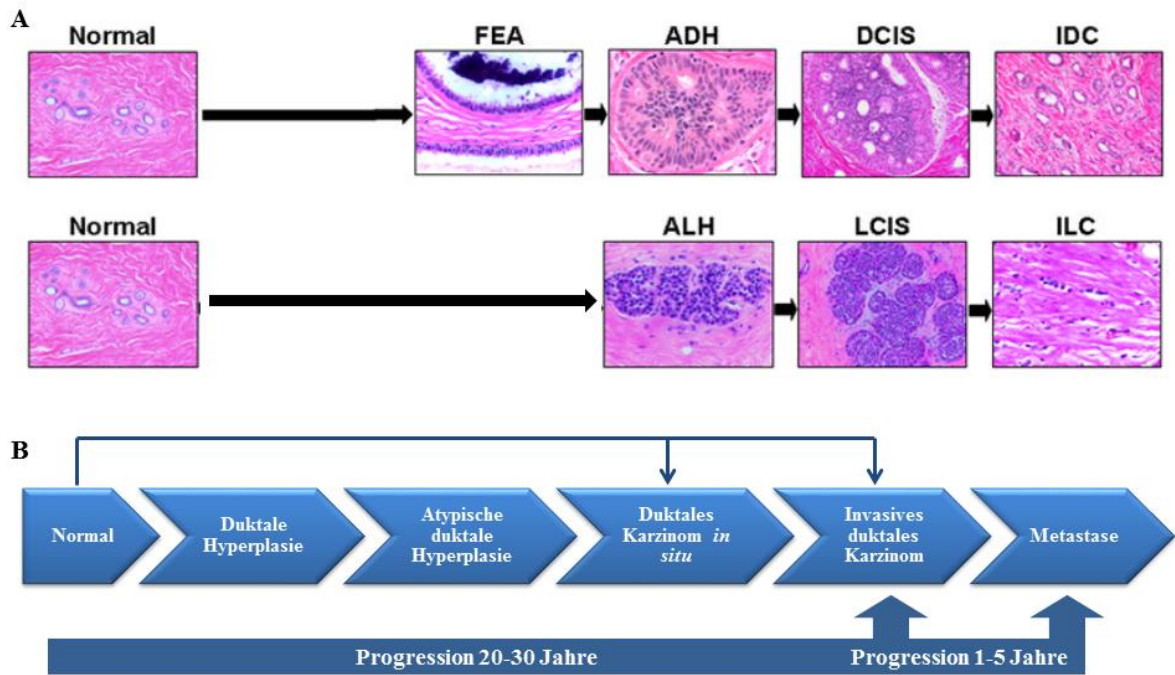


Abbildung 1-3: Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinoms. (A) Darstellung des klassischen Progressionsmodells eines IDC (obere Abb.) und eines ILC (untere Abb.) anhand einer Hämalaun-Eosin Färbung unterschiedlicher Progressionsstufen (verändert: nach Bombonati & Sgroi 2011). (B) Die Entwicklung von Brustkrebs als *in vivo multi-step*-Modell mit der duktalem Hyperplasie und der atypischen duktalem Hyperplasie als definierte Zwischenstufen. In der humanen Brust stellen diese Zwischenstufen zwar die initialen Stufen des neoplastischen Wachstums dar, können jedoch von gesunden Zellen übersprungen werden (verändert: nach Russo *et al.* 1998).

Neben den histologischen Klassifikationen des Mammakarzinoms werden maligne Tumoren hinsichtlich ihrer anatomischen Ausbreitung mit Hilfe des TNM-Systems (*Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) 2002) klassifiziert und verschiedenen Stadien (Größe eines soliden Primärtumors (pT), Befall von regionären und juxta regionären Lymphknoten (pN), Fernmetastasen-Status (pM)) zugeordnet (Tabelle 1-1). Weitere detaillierte Merkmale der TNM-Klassifikation werden im Anhang A.1 näher erläutert.

Tabelle 1-1: Tumor Staging nach der TNM-Klassifikation

| Staging | Tumorgröße (pT) | Befallene Lymphknoten (pN) | Fernmetastasen (pM) |
|-------------|---|----------------------------|---------------------|
| 0 | Karzinom <i>in situ</i> , nicht invasiv | keine | nein |
| I | < 2 cm | keine | nein |
| IIA | < 2 cm | 1-3 in der Achsel | nein |
| | 2 cm bis 5 cm | keine | nein |
| IIB | 2 cm bis 5 cm | 1-3 in der Achsel | nein |
| | > 5 cm | keine | nein |
| IIIA | < 5 cm | 4-9 in der Achsel | nein |
| | > 5 cm | bis 9 in der Achsel | nein |
| IIIB | < 5 cm | bis 9 in der Achsel | nein |
| IIIC | Tumor jeder Größe | ≥ 10 in der Achsel | nein |
| IV | Tumor jeder Größe | jede Anzahl | ja |

Ein weiterer Parameter der histologischen Einteilung von Tumoren ist die Tumorgraduierung (*Grading*). Klassifizierungsparameter sind die Größe und Form der Zellkerne, sowie deren Teilungsaktivität und Morphologie. Bei der Graduierung werden die Mitoseraten (1-3 Punkte), die Zellpolymorphie (1-3 Punkte) und das Ausmaß einer Drüsenbildung (1-3 Punkte) beurteilt, wodurch der Malignitätsgrad des Tumors in drei *Grading*-Stufen eingeteilt wird: G1 (3-5 Punkte) entspricht einem noch gut differenzierten Tumor. G2 (6-7 Punkte) steht für eine mäßige Differenzierung und die höchste Graduierung (G3, 8-9 Punkte) und ist mit einer schlechten Differenzierung, einer ungünstigen Prognose sowie der höchsten Malignität assoziiert (Elston & Ellis 1993).

Das Mammakarzinom zeigt nicht nur histopathologisch eine starke Heterogenität, sondern auch auf molekularer Ebene werden aufgrund differenzieller Genexpressionsprofile verschiedene Subtypen unterschieden. In cDNA-basierten *Microarray* Studien zeigte sich, dass die phänotypische Heterogenität mit einer Diversität molekularer Genexpressionsmuster einhergeht und Brusttumoren in fünf molekulare Subtypen unterteilt werden können, die mit verschiedenen klinischen Charakteristika assoziiert sind (Hu *et al.* 2006; Perou *et al.* 2000; Sorlie *et al.* 2001). Tabelle 1-2 zeigt die Einteilung der beschriebenen molekularen Subtypen in Verbindung mit der Tumordifferenzierung und deren zugrunde liegendes Expressionsmuster.

Tabelle 1-2: Subtypen-Klassifizierung (nach: Brouckaert *et al.* 2012)

| Subtyp | molekulares Expressionsmuster | | | Tumordifferenzierung |
|----------------------|-------------------------------|-----------|--------------|----------------------|
| | ER-Status | PR-Status | HER-2-Status | Stufe |
| Luminal A | + | + | - | 1 |
| Luminal B1 | + und / oder + | | - | 3 |
| Luminal B2 | + und / oder + | | + | 1 |
| Basal-like | - | - | - | 1 |
| HER-2-positiv | - | - | + | 1 |

HER-2: Humaner epidermaler Wachstumsfaktor; ER: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor.

Die beschriebenen molekularen Subtypen besitzen möglicherweise prognostische Relevanz im Mammakarzinom. So konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit einem Tumor des basalen, HER-2-positiven oder luminal B-Subtypen im Vergleich zu Patientinnen mit einem Tumor des luminal A-Subtyp, eine schlechtere Prognose besitzen (Perou *et al.* 2000). Auch wenn die Robustheit der Klassifizierungssysteme für die unterschiedlichen Subtypen noch fraglich ist (Bombonati & Sgroi 2011), so hat die Möglichkeit einer gezielten Therapie (engl. *targeted therapy*) mit einem monoklonalen Antikörper gegen den HER-2-Rezeptor (z.B. mit Herceptin) in der letzten Dekade zur Verbesserung der Prognose für den HER-2-positiven Subtyp geführt (Nicholson & Johnston 2005).

1.1.4 GENETISCHE URSACHEN DER ENTSTEHUNG DES MAMMAKARZINOMS

Das klonale Evolutions- (Nowell 1976) sowie das Krebsstammzellen-Modell (Reya *et al.* 2001) werden derzeit als führende Modelle in der Karzinogenese des Mammakarzinoms angesehen. Nowell vermutete bereits 1976 eine klonale Evolution von Tumor-Zellpopulationen, welche über einen gewissen Zeitraum zur Entstehung eines malignen Tumors führen können. Das Modell lehnt an die Grundprinzipien der klassischen Evolutionstheorie von Charles Darwin an (Wagener & Müller 2010). Nach diesem Modell kann jede Brustepithelzelle das Ziel zufälliger Mutationen darstellen. Die Zellsubpopulationen mit einem selektiven Wachstumsvorteil, bedingt durch genetische und epigenetische Veränderungen, tragen unter limitierenden Bedingungen wie z.B. Sauerstoff- oder Nährstoffmangel folglich zur Tumorprogression bei (Merlo *et al.* 2006; Nowell 1976). Das derzeit noch umstrittene, alternative Krebsstammzellen-Modell postuliert, dass hauptsächlich Stamm- und Vorläuferzellen eine Tumorprogression initiieren und fördern können (Reya *et al.* 2001). Für die Entstehung neoplastischer Veränderungen der Brustdrüse sind besonders die genetischen Veränderungen kritisch, welche die Expression und Funktionalität von Tumorsuppressorgenen (*loss-of-function*) und Proto-Onkogenen (*gain-of-function*) beeinflussen (Strachan & Read 1999).

1.1.4.1 TUMORSUPPRESSORGENE

Tumorsuppressorgene kontrollieren z.B. das Zellwachstum, fördern die DNA-Reparatur und sind maßgeblich an einer Zellzykluskontrolle beteiligt. Molekulare Veränderungen innerhalb von Tumorsuppressorgenen spielen daher eine kritische Rolle bei der Entstehung von Krebs. Die Arbeiten von Ruth Sager definierten im Jahr 1985 erstmalig den Begriff des Tumorsuppressorgens (Sager 1985). Sager fusionierte somatische Tumorzellen mit normalen Zellen und konnte die Entstehung eines nicht-tumorigenen Zellhybrid feststellen. Demnach musste die normale Zelle genetische Informationen besitzen, die den neoplastischen Phänotyp der Tumorzelle supprimieren konnten (Sager 1985).

Die bis heute am intensivsten erforschten Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastom-Gen (*RBI*) und das *TP53*-Gen. Das Retinoblastom, ein bösartiger Tumor der Netzhaut, tritt bei Kindern mit einer Inzidenz von 1:20.000 auf. Statistische Stammbaumanalysen von Alfred G. Knudson zur Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Retinoblastomen, führte zur Theorie der „zwei Ereignisse“ (*two-hit* Hypothese), die noch heute gültig ist (Knudson 1971). Die *two-hit* Hypothese besagt, dass auf beiden *RBI*-Allelen zwei unabhängige Mutationen auftreten müssen, damit es zur Entstehung eines Netzhauttumors kommt. Knudson erkannte, dass erbliche Retinoblastome im Vergleich zu

dem sporadischen Retinoblastom in einem jüngeren Alter auftraten. Zudem erkrankten jüngere Patienten häufiger an beiden Augen, was eine genetische Prädisposition vermuten ließ. Bei den jüngeren Patienten kam es folglich zu einer Vererbung eines mutierten Allels und einer zusätzlichen somatischen Mutation des zweiten Allels. Dabei können die Mutationen funktionell und zeitlich unabhängig voneinander auftreten. Das *RBI*-Gen, dessen Inaktivierung für die Entstehung von Retinoblastomen verantwortlich ist, wurde in den 1980er-Jahren identifiziert und bestätigte die *two-hit* Hypothese auch auf molekularer Ebene (Friend *et al.* 1987). Zu den somatischen Mutationen, durch die das zweite *RBI*-Allel ausgeschaltet werden kann, zählt der Verlust der Heterozygotie (engl. *loss of heterozygosity*, LOH), Rekombinationen und Deletionen im *RBI*-Lokus, Punktmutationen oder DNA-Hypermethylierungen in der Promotorregion (Wagener & Müller 2010).

Für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass noch gut differenzierte invasive duktale Karzinome häufig einen chromosomalen Verlust des 16q aufweisen, wobei schlecht differenzierte Tumoren mit einem chromosomalen Verlust von 8p, 11q und 13q (Buerger *et al.* 2001; Roylance *et al.* 1999) einhergehen. Auf den deletierten Chromosomenabschnitten sind Gene lokalisiert, die für wichtige tumorsuppressive Proteine kodieren. Zu nennen ist hier das Tumorsuppressorgen *TP53*, welches in 50% aller Mammakarzinome mutiert vorliegt (Valgardsdottir *et al.* 1997). Durch die Deletion eines *TP53*-Allels und einer unabhängigen Mutation des zweiten Allels kommt es zum Verlust dieses essenziellen Tumorsuppressorgens, was in einer Deregulation des Zellzyklus und somit in einer unkontrollierten Zellproliferation mündet (Levine 1997).

Die Mehrheit aller Mammakarzinome (90%-95%) tritt bedingt durch genetische Veränderungen somatischer Epithelzellen sporadisch auf, während 5%-10% der malignen Brusttumore auf Keimbahn-Mutationen „Brustkrebs-anfälliger-Gene“ zurückzuführen sind (Newman *et al.* 1988). Diese Tumoren treten gehäuft mit Keimbahn-Mutationen in den bekannten Tumorsuppressorgenen *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) oder einem *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*) auf. Frauen, die eine Keimbahn-Mutation in einem oder beiden dieser Tumorsuppressorgene tragen, besitzen ein Risiko von 80% innerhalb ihres Lebens an Brust- und/oder Eierstockkrebs zu erkranken (Friedenson 2005).

1.1.4.2 PROTO-ONKOGENE

Proto-Onkogene, die Vorläufer von Onkogenen, fördern z.B. das Zellwachstum, die Zellteilung und die Zelldifferenzierung. Durch Mutationen mit einem dominanten Phänotyp innerhalb der Gensequenz eines Proto-Onkogene können Onkogene entstehen, die den

Übergang des normalen Wachstumsverhaltens der Zelle zu einem ungebremsten Tumorwachstum fördern. Genetische Veränderungen in den Onkogenen *ERBB2*, *PI3KCA*, *MYC* und *CCND1* sind mit der Entstehung und Progression von Brustkrebs assoziiert. *ERBB2* gehört zur EGFR-Familie der Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs). Zu dieser Genfamilie gehören neben *ERBB2* (Neu, HER-2), *ERBB3* (HER-3), *ERBB4* (HER-4) und *EGFR* (Hynes & Stern 1994). Das *HER-2* Onkogen nimmt eine zentrale Rolle in der Pathogenese und Therapie des Mammakarzinoms ein (Slamon *et al.* 1987). Seine hohe Bedeutung resultiert aus der durch Amplifikation bedingten Überexpression des HER-2 Proteins, welche in 25%-30% der Mammakarzinome gezeigt werden konnte (Slamon *et al.* 1989). Die Überexpression von HER-2 korreliert mit einer schlechteren klinischen Prognose in Lymphknoten-positiven (Antoniotti *et al.* 1994; Mansour *et al.* 1994; Ravdin & Chamness 1995) sowie Lymphknoten-negativen (Andrulis *et al.* 1998) Patientinnen. Ein weiteres für die Progression des Mammakarzinoms wichtiges Onkogen ist *MYC*, dessen Amplifikation und Überexpression im humanen Brustkrebs im Jahr 1986 erstmalig beschrieben wurde (Escot *et al.* 1986). In zahlreichen Studien konnte bisher gezeigt werden, dass eine *MYC*-Amplifikation mit einer schlechteren Prognose der Patientin assoziiert ist (Berns *et al.* 1992a; Berns *et al.* 1992b; Borg *et al.* 1992; Roux-Dosseto *et al.* 1992).

Bei der Erforschung und dem Verstehen von Brustkrebs lag der Fokus der molekularen Biologie Jahrzehnte lang auf der genetischen Forschung. Heute wissen wir jedoch, dass neben genetischen Aberrationen auch epigenetische Veränderungen bei der Entwicklung und Progression von Brustkrebs eine zentrale Rolle spielen. Im folgenden Kapitel sollen die Grundlagen sowie die klinische Relevanz der Epigenetik für humane Tumorerkrankungen, insbesondere für das Mammakarzinom, näher erläutert werden.

1.2 EPIGENETIK

1.2.1 GRUNDLAGEN DER EPIGENETIK

Der Begriff Epigenetik wurde im Jahr 1942 erstmalig von Conrad Waddington als eine „kausale Interaktion zwischen den Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp in Erscheinung bringen“ beschrieben (Waddington 1942). Jahrzehnte später definierte Holliday die Epigenetik als eine vererbare Modifikation der Expression von Genen, die nicht mit einer Veränderung innerhalb der DNA-Primärsequenz einhergeht (Holliday 1987). Heute wissen wir, dass epigenetische Regulationen an einer Vielzahl von wichtigen Entwicklungsprozessen innerhalb des Organismus beteiligt sind. Die Inaktivierung eines X Chromosoms in weiblichen Zellkernen erfolgt über eine epigenetische Modifikation (Chow *et al.* 2005).

Ebenso unterliegt das genomische *Imprinting* paternaler und maternaler Gene einem epigenetischen Prozess (Feil & Khosla 1999). Weiterhin werden spezifische Expressionsmuster während der Embryonalentwicklung durch epigenetische Modifikationen reguliert (Ehrlich 2003). Zu den markantesten epigenetischen Ereignissen gehören die chemischen Modifikationen von DNA und Histonproteinen (Bird 2002; Egger *et al.* 2004; Herman & Baylin 2003; Jones & Baylin 2002).

1.2.1.1 HISTON-MODIFIKATIONEN

Histone sind eukaryotische Proteine im Zellkern, die maßgeblich an der Organisation des Chromatins beteiligt sind. Sie sind die zentralen Bestandteile des Nukleosoms, der zentralen Verpackungseinheit des Chromatins. Das Nukleosom ist ein oktamerer Komplex, aufgebaut aus jeweils zwei *Core* Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4, um welches sich jeweils eine DNA-Schleife aus 146 bp windet. Die Modifikationen der Histonproteine erfolgen am N-terminalen Anteil der Histone, welcher unstrukturiert vorliegt und aus dem kompakten Nukleosomenkern herausragt. Dieser Teil ist zugänglich für posttranslationale Modifikationen, welche die Struktur des Chromatins maßgeblich verändern und damit zu einer Aktivierung oder Repression der Transkription führen können. Zu den spezifischen posttranslationalen Modifikationen der N-terminalen Aminosäuren gehören die Acetylierung und Methylierung sowie die Ubiquitylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung (Kouzarides 2007). Besonders die Aminosäuren Lysin, Arginin und Serin spielen eine entscheidende Rolle innerhalb der Histon-Modifikationen (Cosgrove *et al.* 2004; Esteller & Almouzni 2005; Strahl & Allis 2000). Die spezifische Acetylierung von Lysinen führt zur Neutralisation der positiven Ladung der basischen Lysinreste in Folge dessen die Interaktion der Histone mit der negativ geladenen DNA reduziert wird. Hierdurch kommt es zur Auflockerung des Chromatingerüsts, wodurch die nukleäre DNA für Transkriptionsfaktoren zugänglich wird. Histondeacetylierungen hingegen führen zu einer Kondensation des Chromatins, die mit einer transkriptionellen Repression einhergeht (Imhof & Becker 2001; Kouzarides 2007). Die Acetylierung wird von Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert, während die Deacetylierung von Histon-Deacetylasen (HDACs) reguliert wird (Kouzarides 2007). Bisher wurden 18 humane HDACs identifiziert, welche basierend auf ihrer zellulären Lokalisation, ihrer enzymatischen Aktivität sowie ihrer Homologie zu den HDACs der Hefe in vier Klassen unterteilt werden (Kim *et al.* 2006; Minucci & Pelicci 2006). Die globale Hypoacetylierung von Histon 4 ist ein allgemeines Kennzeichen von humanen Tumoren, für dessen Tumorgenese-basierte Etablierung die HDACs eine entscheidende Rolle spielen (Gao *et al.* 2002).

Ebenso sind Histonmethylierungen wesentlich an der transkriptionellen Kontrolle von Genen beteiligt (Bernstein *et al.* 2007). Die funktionelle Konsequenz der Histonmethylierungen basiert auf dem spezifischen Aminosäurerest sowie der Position, welche die Methylierung modifiziert (Bernstein *et al.* 2007). Hierbei können Lysin- und Argininreste bis zu drei Methylgruppen tragen. Eine Monomethylierung von Histon 3 an den Lysinresten 9, 27 und 79 (kurz: H3K9me1, H3K27me1 und H3K79me1) ist mit einer Genaktivierung assoziiert. Die Trimethylierung von Lysinresten des Histons 3 in Position 4 wirkt fördernd, in den Positionen 9, 27 und 79 hingegen hemmend auf die Transkription (Barski *et al.* 2007). Die Dynamik der Histonmethylierung wird von Histon-Methyltransferasen (HMTs) und Histon-Demethylasen (HDMTs) katalysiert.

Die spezifischen Modifikationsmuster der Histone, die zusammenfassend als „Histon Code“ bezeichnet werden, erfüllen somit essentielle regulatorische Funktionen bei der transkriptionellen Aktivität von Genen. Neben diesen Histon-Modifikationen spielt die DNA-Methylierung eine ebenso fundamentale Rolle innerhalb der transkriptionellen Genregulation.

1.2.1.2 DNA-METHYLIERUNG

Die DNA-Methylierung ist neben den Histon-Modifikationen und den nukleosomalen Veränderungen eine weitere epigenetische Kontrolleebene der Keimbahn- und Gewebespezifischen Genexpression. Die Methylierungsreaktion findet primär an Cytosinen in der palindromischen Abfolge eines Dinukleotides aus Cytosin und Guanin (sog. CpG; p=Phosphat-Rückgrat der DNA) statt. Die Übertragung einer Methylgruppe auf das 5'-Kohlenstoffatom eines Cytosins (m5C) wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Dabei fungiert der Kofaktor S-adenosyl-L-methionin (SAM) als Methylgruppen-Donor (Brenner & Fuks 2006). Das Muster der Methylierung an den Cytosinresten in den CpG-Sequenzen wird während der frühen Embryonalentwicklung aufgebaut, ist vererbbar (Turker 1999) und Gewebespezifisch (Esteller *et al.* 2002; Esteller & Herman 2002). In Vertebraten sind heute die DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b und DNMT3L bekannt. Die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) katalysiert die Erhaltung existierender Methylierungsmuster. Sie kopiert die spezifischen Muster während der Replikation und überträgt diese auf den neu synthetisierten DNA-Strang (Jeltsch 2006). Dahingegen gehören DNMT3a, DNMT3b und DNMT3L zur Gruppe der *de novo* Methyltransferasen, Enzyme, die vorrangig unmethylierte CpG-Dinukleotide methylieren (Okano *et al.* 1999). DNMT3L stimuliert die *de novo* Methylierung von DNMT3a, da das Enzym nicht an den Kofaktor SAM binden kann (Aapola *et al.* 2000; Chedin *et al.* 2002). Die

biologische Funktion von DNMT2 konnte noch nicht eindeutig gezeigt werden, jedoch besitzt das Enzym nur eine schwache DNA-Methyltransferase Aktivität (Dong *et al.* 2001).

Beim Menschen sind ungefähr 70% aller CpG-Dinukleotide methyliert, wobei 5'-Methylcytosin nur etwa 3-4% aller DNA-Basen ausmacht (Esteller & Herman 2002). Grund hierfür ist die häufig und spontan auftretende hydrolytische Desaminierung von 5'-Methylcytosin (Duncan & Miller 1980). Die Basenmodifikation wird von dem Reparatursystem (DNA-Glykosylasen) nicht erkannt wodurch es zur Transition von Cytosin nach Thymin, welches sich im Zuge folgender Replikationsrunden als Mutation manifestiert (Rideout, III *et al.* 1990). Die CpG-Dinukleotide sind nicht zufällig im humanen Genom verteilt. Etwa 70% aller Gene besitzen Promotorregionen mit einem sehr hohen Gehalt an CpG-Dinukleotiden, die sogenannten CpG-Inseln, die das 5'-Ende der regulatorischen Region (Promotor, nicht translatierte Region, Exon 1) vieler Gene umspannen (Saxonov *et al.* 2006). Nach heutiger Auffassung sind CpG-Inseln DNA-Regionen, welche größer als 500 bp sind und einen GC-Gehalt von mehr als 55% aufweisen (Takai & Jones 2002). Im humanen Genom gibt es ungefähr 45.000 CpG-Inseln (Antequera & Bird 1993), wobei die Hälfte von ihnen in Promotoren der Haushaltsgene vorkommen, die in der Regel konstitutiv exprimiert werden und somit unmethyliert vorliegen. Dahingegen können die Promotoren inaktiver Entwicklungs- oder Gewebespezifischer Gene methyliert sein (Kundu & Rao 1999).

Zu den Prozessen der DNA-Methylierung gehören die globale DNA-Hypomethylierung und die lokale DNA-Hypermethylierung. Während die globale DNA-Hypomethylierung mit einer Aktivierung der Genexpression einhergeht, hat die DNA-Hypermethylierung von CpG-Dinukleotiden zumeist eine vollständige Unterdrückung der Genexpression zur Folge. Ein direkter Mechanismus der DNA-Hypermethylierung basiert auf der räumlichen Veränderung von Erkennungssequenzen spezifischer Transkriptionsfaktoren. Dadurch können diese nicht mehr an die DNA-Sequenzen binden und im Folgenden kommt es zu einer teils graduellen Hemmung der Transkription (Campanero *et al.* 2000; Iguchi-Arigo & Schaffner 1989). Hier werden methylierungsabhängige Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F1, NFκB, ERS-2, CREB, c-Myc/Myn und AP-2 (Bergman & Mostoslavsky 1998) und methylierungsunabhängige Transkriptionsfaktoren unterschieden, dessen DNA-Bindung nur schwach von der DNA-Methylierung beeinflusst wird (z.B. YY1, CTF und Sp1) (Mostoslavsky & Bergman 1997). Ein komplexerer Mechanismus der epigenetischen Stilllegung von Genen ist charakteristisch für die Rekrutierung von Methyl-Cytosin-Bindungsproteinen (MBPs), welche über konservierte Bindungsdomänen mit Histon-Modifikatoren interagieren und somit eine synergistische Verbindung zwischen der DNA-

Methylierung und den Histon-Modifikationen bewirken. Dieses Netzwerk aus Enzymen führt zur Remodelierung der Chromatinstruktur und in Folge dessen zur Suppression der initialen Gentranskription (Bird 2002; Hendrich & Bird 1998; Nan *et al.* 1998). Es ist bekannt, dass in DNA-Sequenzen mit einer DNA-Hypermethylierung die aktive Histon 3 Markierung H3K4me2 und H3K4me3 nicht mehr vorhanden ist, was den Einfluss von DNA-Methylierungsprozessen auf die Histon-Modifikationen verdeutlicht (Okitsu & Hsieh 2007; Weber *et al.* 2007). Die Wechselwirkung zwischen DNA-Methylierung und Histon-Modifikation ist aber nicht einseitig. In einer Studie von Jones und Baylin konnte gezeigt werden, dass eine durch die Histon-Methyltransferase bedingte Trimethylierung von H3K9me3 die Rekrutierung von DNMTs bewirkt, welche im Folgenden gezielt CpG-Dinukleotide in einer spezifischen Region methylieren (Jones & Baylin 2002). Die Wechselwirkung zwischen der DNA-Methylierung und den Histon-Modifikationen wird in Abbildung 1-4 schematisch am Beispiel der Tumorgenese zusammengefasst.

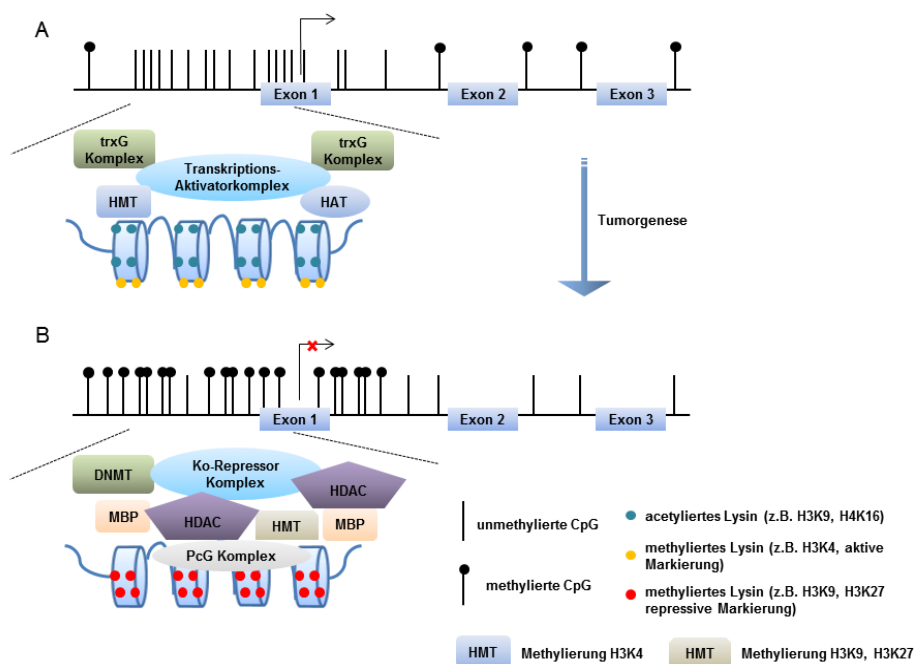


Abbildung 1-4: Stilllegung der Genexpression durch die Interaktion von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen innerhalb der Tumorgenese. (A) In gesunden Zellen liegen die CpG-Inseln von Genpromotoren z.B. wichtiger Tumorsuppressorgene normalerweise unmethyliert vor, wodurch der euchromatische Zustand aufrechterhalten und das Gen transkribiert wird. Stabilisiert wird dieser Zustand durch einen Transkriptions-Aktivator Komplex aus HMTs, HATs und Proteinen der Trithorax-Gruppe (trxG). Diese Proteine di- und trimethylieren H3K4, eine aktive Transkriptionsmarkierung. (B) In Tumorzellen hingegen liegen die CpG-Inseln von Genpromotoren häufig methyliert vor, wodurch die Transkription unterbunden wird. Methyl-CpG-Bindeproteine verstärken die Stilllegung von Genen, indem sie direkt oder indirekt mit DNMTs, HDACs und HMTs assoziieren und so den heterochromatischen Zustand herstellen. Proteine der Polycomb-Gruppe (PcG) katalysiert, durch die Rekrutierung von HMTs, die Trimethylierung von H3K27, einer repressiven Transkriptionsmarkierung (verändert: nach Lo & Sukumar 2008).

Die Etablierung eines exakten Methylierungsmusters ist essentiell für die Regulation und die Kontrolle vieler zellulärer Prozesse. Das breite Spektrum an Funktionalität der DNA-Methylierung fordert das Vorhandensein eines stringenten Regulationsmechanismus. An diesen Regulationsprozessen sind eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, welche ein komplexes Zusammenspiel zwischen den Histon-Modifikationen und der DNA-Methylierung bewerkstelligen. Eine Störung dieses Netzwerkes hat dramatische Konsequenzen für die Zelle und begünstigt u.a. die Entstehung von Krebs (vergl. Abb. 1-4).

1.2.2 DIE DNA-METHYLIERUNG IN DER TUMORGENESE

Die Veränderung der Genexpression ist ein kennzeichnendes Merkmal bei der Entstehung von Krebs. Dabei sind die epigenetischen DNA-Modifikationen von gleicher Relevanz wie die genetischen Veränderungen innerhalb der DNA-Sequenz. Ein aberratives DNA-Methylierungsmuster kann zur Initiation, Promotion und Aufrechterhaltung der Karzinogenese führen und ist charakteristisch für eine Vielzahl von Tumorentitäten (Esteller 2008). In der Karzinogenese tragen die lokale DNA-Hypermethylierung von CpG-Inseln innerhalb der Promotoren und die globale DNA-Hypomethylierung zu einer Veränderung des spezifischen Methylierungsmusters von Genen bei. Der Fokus der epigenetischen Forschung liegt vermehrt auf der Analyse lokaler DNA-Hypermethylierungen, obgleich auch die Hypomethylierung der DNA einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung von Tumoren hat. Eine geringere Methylierungsfrequenz im Tumorgewebe verglichen mit dem Methylierungsmuster im korrespondierenden Normalgewebe war eine der ersten epigenetischen Veränderungen, die in humanen Tumoren gezeigt wurde (Feinberg & Vogelstein 1983). Im Verlauf der neoplastischen Entwicklung von benignen Gewebeveränderungen bis zum invasiven Karzinom nimmt der Grad der DNA-Hypomethylierung zu (Fraga *et al.* 2004). Betroffen sind dabei vor allem repetitive DNA-Elemente und Transkriptions-Kontrollsequenzen. Die DNA-Hypomethylierung begünstigt eine chromosomale Instabilität bedingt durch Veränderungen der DNA-Rekombination in deren Folge Deletionen und Translokationen auftreten können. Dies macht sich insbesondere an strukturell instabilen Elementen wie dem Zentromer bemerkbar sowie in einer Reaktivierung von Transposons wie z.B. bei der MAGE Genfamilie (Eden *et al.* 2003; Esteller & Herman 2002). Weiterhin kann der Verlust von Methylgruppen an CpG-Dinukleotiden das genomische *Imprinting* unterbrechen (engl. *loss of imprinting*, LOI) und Proto-Onkogene aktivieren. So ist der LOI des *IGF2* (*insulin-like growth factor gene*) Gens mit einem gesteigerten Risiko für intestinale Tumoren assoziiert (Cui *et al.* 2003; Kaneda &

Feinberg 2005). Die aberrante Hypomethylierung von spezifischen Onkogenen wie *H-RAS* oder *MYC* fördert ebenfalls die Tumor-Progression (Esteller & Herman 2002).

Eine aberrante DNA-Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen spezifischer Tumorsuppressorgene, die mit einer Geninaktivierung einhergeht, begünstigt häufig die Karzinogenese in zahlreichen Tumorentitäten (Esteller & Herman 2002). Viele der in humanen Tumoren identifizierten methylierten Gene sind klassische Tumorsuppressorgene, die entsprechend der *two-hit*-Hypothese von Knudson durch die Hypermethylierung des verbliebenen Wildtyp-Allels inaktiviert werden. Zu den inaktivierten Tumorsuppressorgenen zählen Zellzyklusregulatoren (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14ARF*), Reparaturgene (*BRCA1*, *MGMT*, *MLH1*) und Gene, welche bei apoptotischen Prozessen eine essentielle Rolle spielen (*DAPK*, *TMS1*) (Das & Singal 2004; Momparler & Bovenzi 2000). Bis heute sind eine Vielzahl aberrant methylierter Gene in humanen Tumoren gefunden worden (zusammengefasst in: Baylin 2005; Herman & Baylin 2003; Jones & Baylin 2002; Plass 2002). Die Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen kann bereits in Präkanzerosen auftreten. So ist z.B. der frühe Verlust der *p16*-Expression ein ausschlaggebendes Ereignis in der Progression vieler Tumorentitäten (Jones & Baylin 2002). Doch auch Proteine, die maßgeblich an der Stabilität und Integrität von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen beteiligt sind, können von einer aberranten Veränderung des Methylierungsprofils betroffen sein. Dabei rücken vor allem Zelladhäsions-Moleküle wie E-Cadherin und CD44 (Das & Singal 2004; Momparler & Bovenzi 2000) in den Vordergrund. In diesem Bereich könnte auch das potentielle Metastasierungssuppressorgen *ITIH5* von Bedeutung sein (Veeck *et al.* 2008b). Der Transkriptionsverlust dieser aufgezeigten essentiellen Proteine beeinflusst entsprechend das zelluläre Netzwerk regulatorisch relevanter Prozesse und fördert damit die Tumor-Progression. Die DNA-Hypermethylierungen interagieren zudem mit genetischen Läsionen. Werden die CpG-Inseln von Promotoren verschiedener DNA-Reparaturgene wie *MLH1*, *BRCA1* oder *MGMT* durch DNA-Hypermethylierung inaktiviert, wird eine Reparatur von DNA-Replikaten blockiert. Der Verlust wichtiger Reparaturmechanismen öffnet den Weg für neoplastische Veränderungen der Zelle. Die veränderten Methylierungsmuster spezifischer Gene können sich in vielen verschiedenen Tumorentitäten, wie es bei *CDKN2A* der Fall ist, wiederfinden. Andere Gene hingegen sind spezifisch für eine einzige Tumorentität (Das & Singal 2004). Das Profil an Hypermethylierungen der CpG-Inseln in Tumorsuppressorgenen ist spezifisch für jede Tumorentität (Costello *et al.* 2000; Esteller *et al.* 2001). Jeder Tumorentität kann somit möglicherweise ein spezifisches „Hypermethylom“ zugeschrieben werden (Esteller 2008) (Abb. 1-5). Heute können mittels neuer genomweiter Techniken

bereits Methylierungs-Landkarten für humane Tumorentitäten erstellt werden. Geschätzt werden 100 bis 400 hypermethylierte CpG-Inseln in den Promotoren eines individuellen Tumors (Esteller 2008).

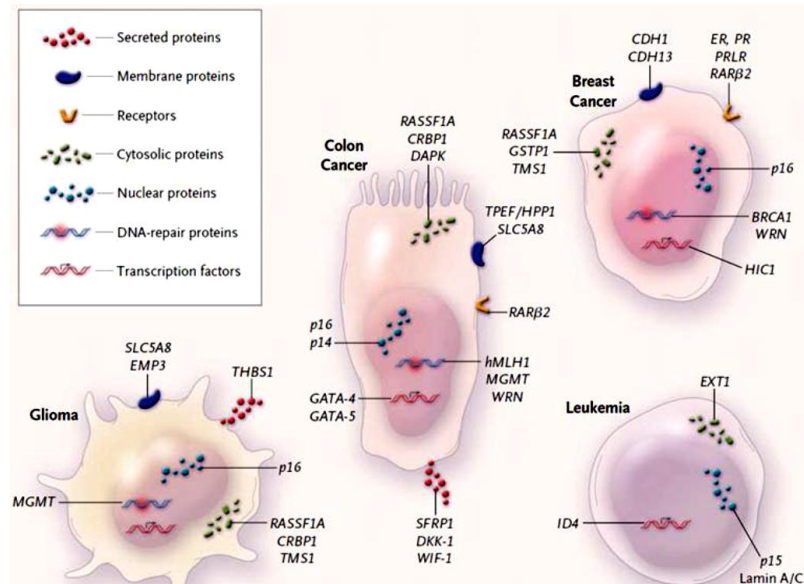


Abbildung 1-5: Das Hypermethylierungs-Profil von CpG-Inseln relevanter Tumorsuppressorgene in humanen Krebsentitäten. In Brustkrebs, Darmkrebs, Leukämien und Gliomen werden regulatorische Regionen wichtiger Tumorsuppressorgene häufig durch DNA-Hypermethylierung abgeschaltet. Dabei findet sich ein aberrantes Methylierungsmuster von *p16* und *RASSF1A* in vielen Tumorentitäten wieder, während andere Gene (z.B. *BRCA1*) in nur wenigen Entitäten methyliert vorliegen. So ist es möglich für verschiedene Krebsarten spezifische Methylierungsprofile zu erstellen (verändert: nach Esteller 2008).

1.2.3 DIE DNA-METHYLIERUNG IM HUMANEN MAMMAKARZINOM

Das Vorhandensein eines Brustkrebs-spezifischen DNA-Methylom verdeutlicht die evidente Rolle der DNA-Methylierung, die kooperativ und synergistisch mit genetischen Mutationen Einfluss auf die Tumorgenese von Brustkrebs hat (Lo & Sukumar 2008). Eine Veränderung des Methylierungsmusters kann bereits in benignen Vorstufen des Mammakarzinoms auftreten und manifestiert sich im Verlauf der Tumor-Progression (Euhus *et al.* 2008; Umbricht *et al.* 2001). Sowohl die globale DNA-Hypomethylierung als auch die lokale DNA-Hypermethylierung tragen zur Entstehung und abnormalen Proliferation maligner Zellen bei. Bis heute haben zahlreiche Studien eine Vielzahl verschiedener Gene identifiziert, welche beim Mammakarzinom entweder hypo- oder hypermethyliert vorliegen. Diese Gene fallen in einzelne definierte Funktionskategorien wie Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose, Metastasierungssuppression, Zell-Adhäsion, Aufbau der ECM und DNA-Reparatur. Tabelle 1-3 zeigt eine Übersicht putativer Tumorsuppressorgene, die im Brustkrebs hypermethyliert vorliegen.

Tabelle 1-3: Beispiele für hypermethylierte Tumorsuppressorgene im Mammakarzinom

| Gen | Bezeichnung | funktionelle Zuordnung |
|-----------------|---|---|
| <i>BRCA1/2</i> | Breast cancer 1/2 | DNA-Reparatur |
| <i>CDH1</i> | E-cadherin | Zelladhäsion |
| <i>DAPK1</i> | Death-associated protein kinase 1 | Induktion der Apoptose |
| <i>ER</i> | Estrogen receptor | Östrogen-Signalweg |
| <i>GSTP1</i> | Glutathione-S-transferase P1 | Detoxifikation |
| <i>ITIH5</i> | Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 5 | Suppression der Metastasierung und Invasion |
| <i>NDRG2</i> | N-Myc downstream regulated gene 2 | Suppression der Metastasierung und Invasion |
| <i>p16INK4a</i> | Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A | Zell-Zyklus Kontrolle |
| <i>PR</i> | Progesterone receptor | Wachstumsregulation |
| <i>RASSF1A</i> | Ras association domain family protein 1 | Zell-Zyklus Kontrolle, Apoptose |
| <i>SFN</i> | Stratifin | Zell-Zyklus Regulation |
| <i>SFRP1</i> | Secreted frizzled-related protein 1 | Inhibition des Wnt-Signalwegs |
| <i>SFRP2</i> | Secreted frizzled-related protein 2 | Inhibition des Wnt-Signalwegs |
| <i>SFRP5</i> | Secreted frizzled-related protein 5 | Inhibition des Wnt-Signalwegs |
| <i>WIF1</i> | WNT inhibitory factor 1 | Inhibition des Wnt-Signalwegs |

zusammengefasst in: Lo & Sukumar 2008

Manche dieser Gene zeigen eine gewisse Spezifität für Tumoren der Brust. Epigenetische Veränderungen in dem für Brustkrebs prädisponierenden Gen *BRCA1* sind bei 50% aller familiären und 39% aller sporadischen Mammakarzinome aufzuweisen (Birgisdottir *et al.* 2006; Elstrodt *et al.* 2006). Dahingegen ist *BRCA1* im Kolonkarzinom, im hepatozellulären Karzinom oder in Leukämien nicht methyliert (Yang *et al.* 2001).

Der Methylierungsgrad von Tumorsuppressorgenen kann einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer Brustkrebserkrankung (Prognose) und das Ansprechen der Patientin auf eine Therapie (Prädiktion) haben. Veeck *et al.* zeigten, dass die *ITIH5*-Hypermethylierung mit einem verkürzten Gesamtüberleben der Patientin assoziiert ist (Veeck *et al.* 2008b). Das putative Tumorsuppressorgen *ITIH5* hat somit eine mögliche prognostische Relevanz im Mammakarzinom. Neben *ITIH5* gibt es eine Reihe weiterer putativer Tumorsuppressorgene deren Hypermethylierung prognostischen Wert (Cho *et al.* 2012; Hill *et al.* 2011) besitzen und somit eine für die Patientin individuelle Prognose der Erkrankungen erlauben. Neben der Prognose kann das Methylierungsmuster spezifischer Gene auch Rückschlüsse auf den therapeutischen Nutzen einer gezielten Chemotherapie aufzeigen. Ein klassisches Beispiel eines wichtigen Prädiktor für das Ansprechen der Patientin auf eine endokrine Therapie (z.B. Tamoxifen) ist die Expression des Östrogenrezeptors (engl. *estrogen receptor*, ER). In etwa 30% der Brusttumoren fehlt die ER-Expression wodurch die Patientin keinen Nutzen von der endokrinen Therapie hat. Der Verlust der ER-Expression ist häufig mit einer DNA-Hypermethylierung des *ER*-Promotors assoziiert (Lapidus *et al.* 1998; Ottaviano *et al.* 1994). Neben der immunhistochemischen ER-Detektion könnte die Analyse der *ER*-Methylierung ein alternativer prädiktiver Ansatz sein (Widschwendter *et al.* 2004). Eine

Studie von Iorns *et al.* zeigte, dass eine geringe Expression der Cyklin abhängigen Kinase 10 (CDK10) zu einer Tamoxifen-Resistenz führen kann und das Patientinnen mit ER-positivem Brustkrebs und einer geringen CDK10-Expression unter Tamoxifen früher Rezidive entwickeln (Iorns *et al.* 2008). Die verminderte CDK10-Expression ist mit einer Hypermethylierung des *CDK10*-Promotors assoziiert, weshalb die *CDK10*-Methylierung ebenfalls ein wertvoller prädiktiver Marker einer endokrinen Therapie darstellen könnte. Dennoch, die Bedeutung der Epigenetik für die Entstehung und Entwicklung von Tumoren wurde erst in jüngster Zeit richtig erkannt und die Entwicklung von epigenetischen Markern steht deshalb noch weitgehend in den Anfängen (Lichter 2008).

Das epigenomische Profil von Brustkrebs könnte neben der Prognose und der Prädiktion auch in der Früherkennung des Mammakarzinoms Anwendung finden. Das spezifische Hypermethylom eines Tumors spiegelt sich in der frei zirkulierenden DNA (engl. *circulating free DNA*, cfDNA) im Blut wider und methylierte Tumorsuppressorgene besitzen ein hohes Potential als mögliche Früherkennungs-Biomarker zu fungieren.

1.2.4 DIE KLINISCHE RELEVANZ DER DNA-METHYLIERUNG ALS BIOMARKER FÜR DIE BLUT-BASIERTE BRUSTKREBS-FRÜHERKENNUNG

Biomarker sind messbare biochemische oder molekulare Größen, die einen normalen oder pathologischen Prozess oder die Antwort auf eine therapeutische Intervention beschreiben (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Charakteristisch werden Biomarker als krankheitsspezifische Marker für die Diagnostik und Prognose herangezogen sowie als therapiespezifische Marker, die eine Arzneimittelwirkung widerspiegeln (Rolan *et al.* 2003). Ein Früherkennungs-Biomarker kennzeichnet sich aus, durch sein Potential eine mögliche Erkrankung spezifisch in asymptomatischen Individuen in einer frühen Stufe aufzuzeigen. Zudem sollte ein idealer Biomarker günstig und relativ einfach in Körperflüssigkeiten wie Serum oder Urin zu detektieren sein (Pepe *et al.* 2001; Pepe *et al.* 2008) und damit eine nicht-invasive Methode zur Früherkennung von Tumoren bieten. Das von malignen Brusttumoren sekretierte Protein CA-27.29 (engl. *cancer antigen 27.29*) zeigt bereits klinischen Nutzen als Serum-basierter Tumormarker hinsichtlich der Verlaufskontrolle einer Mammakarzinom-Erkrankung sowie dem Ansprechen der Patientin auf eine spezifische Therapie (Perkins *et al.* 2003). Die klinische Sensitivität von CA-27.29 in frühen Brustkrebsstadien ist jedoch gering (Gion *et al.* 1999; Perkins *et al.* 2003), so dass ein Einsatz als Biomarker zur Brustkrebs-Früherkennung von der *European Group on Tumor Markers* (EGTM) nicht empfohlen wird.

Ein für die klinische Anwendung der Brustkrebs-Früherkennung vielversprechendes Biomarker-Potential bietet die DNA-Methylierung. Die DNA-Methylierungsmuster sind mit

frühen Entwicklungsstufen und dem Verlauf der Brustkrebs-Tumorgenese assoziiert (Esteller 2007), wodurch die Korrelation epigenetischer Veränderungen der Tumorgewebe-DNA mit denen der Serum-cfDNA die Grundlage für die Entwicklung klinisch relevanter Biomarker aufweist. Der Nachweis von DNA-Methylierungsmustern putativer Tumorsuppressorgene ist besonders geeignet, da sie den klinischen und technischen Vorteil eines *gain-of-signal* (Zugewinn an Signal) aufweisen, d.h. im Normalgewebe liegt der entsprechende DNA-Bereich unmethyliert vor, welcher erst im Laufe der Tumorgenese einen Zugewinn der Methylierung erfährt (Esteller 2008). Ein weiterer Vorteil DNA-basierter Biomarker gegenüber Markern auf Protein- oder RNA-Ebene liegt darin begründet, dass die DNA von Natur aus sehr stabil und aufgrund dessen zuverlässig aus Tumorgewebe sowie Körperflüssigkeiten isoliert werden kann (Kagan *et al.* 2007). Die DNA-Methylierung kann mittels molekularbiologischer Techniken amplifiziert und folglich auch noch in kleinsten Konzentrationen nachgewiesen werden (Kagan *et al.* 2007).

1.2.4.1 DIE NOTWENDIGKEIT DER BRUSTKREBS-FRÜHERKENNUNG

Der Früherkennung eines bösartigen Brusttumors kommt ein hoher Stellenwert zu, da die rechtzeitige Erkennung entscheidend für eine erfolgreiche Behandlung der Patientin ist (Etzioni *et al.* 2003). So haben Frauen mit kleinen Tumoren ohne Befall der axillären Lymphknoten eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 90% und können üblicherweise brusterhaltend operiert werden. Bei weiter fortgeschrittenen Tumorstadien fällt die Überlebensrate dagegen deutlich ab (Etzioni *et al.* 2003). Das Abtasten der Brust (Palpation) und die Ultraschalluntersuchung bieten eine erste Untersuchungsgrundlage, wobei die Mammographie und die Magnetresonanztomographie (engl. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) die beiden sensitivsten und spezifischsten Detektions-Methoden sind. Die Mammographie ist derzeit die Standard-Vorsorgeuntersuchung im *Screening* von Brustkrebs. Neben klaren Vorteilen wie der sensitiven Detektion von duktalem Karzinomen *in situ* zeigt das Mammographie-Screening allerdings auch einige Schwachpunkte. Herauszustellen sind vor allem die Problematik der mammographischen Tumordetektion bei Frauen mit einem sehr dichten Brustgewebe und die hohe Rate an Falsch-Positiven Befunden mit anschließender klinischer Konsequenz (Armstrong *et al.* 2007; Berg 2009). Weiterhin werden in Abhängigkeit der Dichte des Brustgewebes mehr als 10% der Tumoren im Mammogramm nicht entdeckt, was in einer Sensitivität von 70% bis 91% resultiert (Houssami *et al.* 2002). Diese kritische Einschätzung der Mammographie basiert jedoch auf Erhebungen aus Ländern, in denen ein umfassendes Mammographie-Screening bereits seit über 10 Jahren praktiziert wird (z. B. Niederlande und Großbritannien). In Deutschland hingegen wurde ein

flächendeckendes Mammographie-*Screening* erst im Jahr 2005 eingeführt. Die Qualität der bildgebenden Verfahren ist heute deutlich besser als vor 15-20 Jahren, trotzdem wird sich die Effizienz der heutigen Mammographie-Versorgung erst in einigen Jahren sicher bewerten lassen (Diekmann & Diekmann 2008). Im Gegensatz zur Mammographie erfordert die MRI-Untersuchung keine Kompression der Brust und bietet eine exzellente Bildgebung bei dichtem Brustgewebe. Leider führt die hohe Sensitivität (85% bis 100%) dieser Methode zu einer hohen Rate Falsch-Positiver Befunde (37% bis 100%) mit unnötigen Folgeuntersuchungen und invasiven Biopsien (Hooley *et al.* 2011).

Die Korrelation von epigenetischen Veränderungen innerhalb der Gewebe-DNA eines Brusttumors mit denen der frei zirkulierenden Tumor-DNA des Blutes bietet die Möglichkeit, klinisch relevante Biomarker zu entwickeln.

1.2.4.2 FREI ZIRKULIERENDE DNA IM BLUT (cfDNA)

Die Präsenz zirkulierender DNA wurde 1966 erstmalig im Serum von Lupus-Patienten beschrieben (Tan *et al.* 1966). Im Jahr 1977 wiesen Leon *et al.* cfDNA zum ersten Mal im Serum von Krebspatienten nach (Leon *et al.* 1977). Kennzeichnend war eine erhöhte cfDNA-Konzentration in Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Individuen. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die gemessene cfDNA-Konzentration je nach Tumorentität zwischen 0 und 5.000 ng/ml Blutserum schwankte, während die cfDNA-Konzentration gesunder Individuen gering war (25 bis 50 ng/ml Blutserum). Besonders Patienten mit einem Tumor der Lunge, der Brust, der Eierstöcke und des Uterus zeigten sehr hohe DNA-Konzentrationen im Blutserum (>500 ng/ml Blutserum), während Patienten beispielsweise mit einem gastrointestinalen Karzinom geringere DNA-Mengen (<500 ng/ml Blutserum) im Blutserum aufwiesen. Gal *et al.* zeigten 2004, dass die mediane cfDNA-Konzentration im Serum von Brustkrebs-Patientinnen (221 ng/ml) im Vergleich zu gesunden Probandinnen etwa viermal höher ist (63 ng/ml) (Gal *et al.* 2004). Obwohl die Zirkulation freier DNA im Blut von sowohl gesunden wie auch erkrankten Individuen erwiesen ist, bleibt die Quelle dieser DNA unklar. Maligne nekrotische und apoptotische Zellen werden als eine mögliche Quelle für cfDNA in der Blutbahn vermutet (Jahr *et al.* 2001; Leon *et al.* 1977). Eine häufig angenommene Hypothese vermutet die Lysis metastasierender Tumorzellen als potentielle Quelle für die cfDNA im Blut, wobei die geringe Anzahl zirkulierender Tumorzellen inadäquat scheint, um die ermittelten cfDNA-Konzentrationen in Serum- und Plasmaproben zu erklären (Stroun *et al.* 2000). In Betracht gezogen werden muss zudem ein aktiver Mechanismus von Tumorzellen zur Freilassung von DNA ins Blut (Stroun *et al.* 2000).

1.2.4.3 POTENTIELLE BLUT-BASIERTE DNA-METHYLIERUNGS-BIOMARKER IN DER BRUSTKREBS-FRÜHERKENNUNG

Bis heute gibt es eine Vielzahl von Studien, die potentielle Früherkennungs-Biomarker im Blut von Brustkrebs-Patientinnen beschreiben. Das diagnostische Potential der *RASSF1A*- und *APC*-Promoter-Methylierung in frei zirkulierender DNA von Brustkrebs-Patientinnen wurde in zahlreichen Studien untersucht (Brooks *et al.* 2010; Dulaimi *et al.* 2004; Hoque *et al.* 2006; Radpour *et al.* 2011). In diesen Studien wurde die *RASSF1A*-Methylierung mit einer Sensitivität zwischen 15% und 75% und die *APC*-Methylierung mit einer Sensitivität zwischen 2% und 47% beschrieben. Die Spezifität beider Gene in gesunden Kontrollen wurde als hoch gezeigt (90% bis 100%). Tabelle 1-4 zeigt, neben *RASSF1A* und *APC*, eine Zusammenfassung weiterer potentieller Serum-basierter Brustkrebs Früherkennungs-Biomarker, die in unterschiedlichen Brustkrebs-spezifischen Studien analysiert wurden.

Tabelle 1-4: Publierte potentielle Brustkrebs Früherkennungs-Biomarker

| Gen | Sensitivität [%] | Spezifität [%] | Kollektivgröße (n=Patientengruppe / n=Kontrollen) | Referenz |
|----------------|------------------|----------------|---|-----------------------------|
| <i>APC</i> | 29 | 95 | n=79 / n=20 | (Van, I <i>et al.</i> 2009) |
| <i>BRCA1</i> | 22 | 98 | n=100 / n=30 | (Sharma <i>et al.</i> 2010) |
| <i>ESR2</i> | 46 | 90 | n=50 / n=50 | (Jing <i>et al.</i> 2010) |
| | 55 | 100 | n=100 / n=30 | (Sharma <i>et al.</i> 2010) |
| <i>MGMT</i> | 26 | 97 | n=100 / n=30 | (Sharma <i>et al.</i> 2010) |
| <i>PR</i> | 55 | 93 | n=100 / n=30 | (Sharma <i>et al.</i> 2010) |
| <i>RARB</i> | 87 | 94 | n=119 / n=125 | (Kim <i>et al.</i> 2010) |
| <i>RASSF1A</i> | 33 | 95 | n=119 / n=125 | (Kim <i>et al.</i> 2010) |
| | 74 | 94 | n=50 / n=50 | (Jing <i>et al.</i> 2010) |
| <i>SFN</i> | 82 | 100 | n=102 / n=20 | (Jing <i>et al.</i> 2007) |

Kennzeichnend für alle Gene ist eine hohe Spezifität zwischen 90% und 100%, die zum Teil (*RASSF1A*, *RARB*, *SFN*) mit einer hohen Sensitivität einhergeht. Dennoch findet noch keiner dieser potentiellen Biomarker eine Anwendung in der klinischen Routine. Die Problematik bisheriger Identifizierungs- und Validierungsstudien möglicher klinisch nutzbarer Biomarker liegt in der geringen Fallzahl analysierte Proben, die zudem in vielen Studien im Hinblick auf eine passende Kontrollkohorte nicht adäquat analysiert werden konnten (Van, V *et al.* 2012). Zudem analysierten nur wenige Studien weitere Quellen methylierter cfDNA wie benigne Brusttumoren oder Tumoren anderer Krebsentitäten, wodurch eigentlich keine Aussage über die klinische Spezifität möglich ist. Ein weiterer Grund ist die genotypische Heterogenität von Brustkrebs. Interessanterweise zeigen Mammakarzinome mit einer luminal A, luminal B und HER-2-positiven Klassifikation deutlich höhere Methylierungsfrequenzen putativer Tumorsuppressorgene im Tumorgewebe als Tumoren des basalen Subtyps (Holm *et al.* 2010; Park *et al.* 2012). Potentielle Biomarker wie *RASSF1A*, *APC* oder *RARB* zeigen

allerdings nur eine geringe oder keine Methylierung in Tumoren des basalen Subtyps (Holm *et al.* 2010; Park *et al.* 2012), wodurch die 15% der Frauen mit der Diagnose eines basalen Mammakarzinoms (Foulkes *et al.* 2010) möglicherweise unzureichend im Blut erfasst werden können. Daher ist es von entscheidender Bedeutung Biomarker zu entwickeln, die alle Subtypen des Mammakarzinoms abdecken können und sowohl analytisch als auch klinisch sehr spezifisch und sensitiv DNA-Methylierungen im Serum von Brustkrebs-Patientinnen nachweisen können.

Potentielle Früherkennungs-Biomarker können zahlreichen Signalwegen zugeordnet werden, die durch epigenetische Veränderungen dereguliert vorliegen. Der WNT-Signalweg liegt in malignen Tumoren der Brust häufig verändert vor, wodurch besonders die Zellproliferation gefördert wird. Aber auch potentielle Metastasierungssuppressorgene wie *ITIH5* und *NDRG2* stellen interessante Biomarker in der Brustkrebs-Früherkennung und in einer möglichen therapeutischen Nutzung für das Mammakarzinom dar.

1.3 WINGLESS AND INTEGRATION SITE GROWTH FACTOR- (WNT) SIGNALWEG

Der Wnt-Signalweg ist neben embryonalen Differenzierungsprozessen auch an der stetigen Erneuerung adulten Gewebes beteiligt, wodurch fundamentale Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellpolarität, Motilität und Proliferation präzise reguliert werden (Cadigan & Nusse 1997). Nach heutigem Wissensstand werden die Wnt-Proteine über drei verschiedenen Signalkaskaden aktiviert: den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg, den nicht-kanonischen Planar Cell Polarity- (PCP) Signalweg sowie den Wnt/ Ca^{2+} -Signalweg. Die intrazelluläre Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs wird über Wnt-Proteine aktiviert, welche an die extrazelluläre N-terminale Domäne membranständiger Rezeptoren der *Frizzled* (Fz)-Familie binden (Rao & Kuhl 2010). Die Wnt-Proteine benötigen zudem Ko-Rezeptoren (z.B. LRP 5/6, *lipoprotein receptor-related protein*) für die Interaktion mit den Fz-Rezeptoren. Nachdem der Rezeptor/Ko-Rezeptor-Komplex aktiviert wurde, erfolgt die Signaltransduktion über das zytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled (Dsh), welches direkt mit den Fz-Rezeptoren interagiert. Es gibt drei humane Dsh-Proteine (Dsh-1, Dsh-2 und Dsh-3), welche durch drei konservierte Proteindomänen gekennzeichnet sind: eine Amino-terminale DIX-Domäne, eine zentrale PDZ-Domäne und eine Carboxy-terminale PDZ-Domäne (Habas & Dawid 2005). Die Signalinduktion bewirkt eine Inhibition des sogenannten Destruktionskomplexes bestehend aus dem Protein Adenomatosis Polyposis Coli (APC), Axin und der Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β), infolgedessen die Menge an zytosolischem β -Catenin stark ansteigt. Das akkumulierte β -Catenin wird in den Nukleus transloziert und induziert durch die Bindung an die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF eine

zelluläre Antwort (Behrens *et al.* 1996). Auf diese Weise wird die Expression von Zielgenen induziert, welche überwiegend die Zellproliferation fördern (z.B. *MYC* und *Cyclin D1*) (Mann *et al.* 1999; Tetsu & McCormick 1999). Erfolgt keine Aktivierung des Wnt-Signalwegs wird das β -Catenin durch den Destruktionskomplex ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut.

Inhibiert wird der kanonische Wnt-Signalweg über sezernierte Antagonisten der *Secreted frizzled receptor family (SFRP)* sowie dem *Wnt inhibitory factor 1 (WIF1)*, welche die Wnt-Proteine aufgrund einer homologen Proteindomäne (*cystein-rich domain, CRD*) binden können und so die Aktivierung des Fz-Rezeptors und Ko-Rezeptors verhindern (Bafico *et al.* 1999). *Dickkopf 3 (DKK3)* wirkt ebenfalls als ein Antagonist des Wnt-Signalwegs. Allerdings wird derzeit angenommen, dass *DKK3* primär den nicht-kanonischen PCP-Signalweg inhibiert, der maßgeblich wichtige zelluläre Eigenschaften wie Adhäsion, Motilität und die Zellpolarität reguliert (Veeck & Dahl 2012). In vielen humanen Tumorentitäten, wie auch im Mammakarzinom, ist der Wnt-Signalweg einer der am häufigsten deregulierten Signalwege, dessen Überaktivierung mit der Entstehung von Tumoren assoziiert ist. Veeck *et al.* zeigten das der Verlust der SFRP1- und der SFRP5-Expression mit einer schlechteren Prognose bei Mammakarzinom-Patientinnen einhergeht (Veeck *et al.* 2008c; Veeck *et al.* 2006). Die putativen Tumorsuppressorgene *SFRP1* und *SFRP5* werden durch DNA-Hypermethylierung transkriptionell stillgelegt und können als wichtige Inhibitoren des Wnt-Signalwegs nicht mehr agieren. Die Moleküle *SFRP2* und *DKK3* werden ebenfalls hypermethyliert, infolgedessen der Wnt-Signalweg dauerhaft aktiviert vorliegt (Veeck *et al.* 2008a; Veeck *et al.* 2008d).

1.4 DIE INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR (ITI) PROTEIN FAMILIE

Die ITI-Moleküle, die zur Familie der „Kunitz-Typ-Protease-Inhibitoren“ (Salier 1990) gehören, wurden seit Ende der 70er Jahre hinsichtlich ihrer physiologischen und pathologischen Bedeutung intensiv untersucht. Die Analysen identifizierten die ITI-Moleküle in der Blutzirkulation wie auch in der extrazellulären Matrix (engl. *Extracellular Matrix, ECM*) unterschiedlicher Gewebe (Zhuo & Kimata 2008) und konnten ihnen eine Rolle in zahlreichen pathologischen Prozessen wie z.B. inflammatorische Erkrankungen, Atherosklerose sowie der Karzinogenese verschiedener Entitäten zuschreiben.

Der Inter- α -Trypsin Inhibitor (ITI) ist ein multifunktionaler Proteinkomplex, der aus zwei verschiedenen prozessierten Vorläuferproteinen zusammengesetzt wird: einer leichten Kette (*Bikunin*) sowie einer oder zwei homologen schweren Ketten (*heavy chains, ITIH*), die über ein Chondroitinrückgrat kovalent miteinander verknüpft sind (Enghild *et al.* 1991; Salier *et al.* 1996). Das *AMBIP* (*alpha-1-microglobulin/bikunin precursor*) Gen kodiert für die

leichte Kette Bikunin, während für die schweren Ketten bis heute fünf homologe kodierende Gene bekannt sind. Lokalisiert sind diese Gene auf zwei unterschiedlichen Chromosomen. *ITIH1*, *ITIH3* und *ITIH4* liegen benachbart auf Chromosom 3, wohingegen *ITIH2* und *ITIH5* tandemartig auf Chromosom 10 angeordnet sind (Hamm *et al.* 2008). Die inhibitorische Wirkung gegen Plasmaproteasen wie Trypsin und Plasmin geht dabei vom Bikunin aus, dem metastasierungshemmende Eigenschaften nachgewiesen wurden (Kobayashi *et al.* 2003). Die schweren Ketten hingegen tragen über eine Veresterung mit der Hyaluronsäure (HA) zur Integrität und Stabilität der ECM bei (Huang *et al.* 1993). Dabei bewirkt die Bindung der schweren Kette an Hyaluronsäure, dass diese zu stabilen Fibrillen vernetzen, den sog. *cabellike structures* (de la Motte *et al.* 2003). Dieser kovalente Komplex wird auch als SHAP- (*serum-derived hyaluronan-associated proteins*) Komplex bezeichnet, in der differenziellen Abgrenzung des Bikunin-gebundenen Komplexes. Bereits 1990 entdeckten Yoneda und Mitarbeiter in der ECM von *in vitro* kultivierten Maus-Fibroblasten ein ca. 85 kDa großes Protein, das als Komplex mit der Hyaluronsäure in der ECM vorlag (Yoneda *et al.* 1990). Der Komplex konnte als schwere Kette der ITI-Familie identifiziert werden, wobei die Esterbindung zwischen HA und schwerer Kette äquivalent zu der von ITI-Proteinkomplexen war. Diese Untersuchungen erbrachten den Hinweis, dass ein Transfer der schweren Ketten vom Chondroitinsulfat des Bikunins auf die HA unter Freisetzung des Bikunins erfolgen kann. Weitere *in vitro* Experimente konnten den Transfer bestätigen (Zhao *et al.* 1995). Katalysiert wird die Bindung der schweren Kette an die HA durch das Tumor Nekrose Faktor induzierte Protein 6 (TNFAIP6) (Odum *et al.* 2002). TNFAIP6, das über die PTR Domäne selbst mit HA interagiert, kann eine kovalente Bindung mit den schweren Ketten eingehen. So formiert sich während der Transferreaktion ein stabiler Komplex aus ITIH, TSG-6 und HA (Rugg *et al.* 2005; Sanggaard *et al.* 2005).

Neuere Studien vermuten, dass die Esterbindung zwischen der HA und den ITIHs die CD44-HA-Interaktion modifiziert und möglicherweise spezifische Signaltransduktionswege in der Zelle verändert (Ruffell & Johnson 2008). Garantziotis *et al.* konnten zudem zeigen, dass die Verbindung zwischen der HA und den ITIHs ein Mediator angiogenetischer Prozesse darstellt (Garantziotis *et al.* 2008). Vitronektin, ein weiterer Bestandteil der ECM, wurde ebenfalls als ein möglicher Interaktionspartner der ITIHs diskutiert (Adair *et al.* 2009). Diesen Daten zu Folge besitzen die ITIH-Moleküle eine mögliche zentrale Bedeutung für die Entstehung unterschiedlicher Tumorentitäten (Zhuo & Kimata 2008) und wurden bereits als potentielle Serum-basierte Früherkennungs-Biomarker beschrieben (Chong *et al.* 2010).

1.4.1 *ITIH5* ALS PUTATIVES METASTASIERUNGSSUPPRESSORGEN DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS

ITIH5 konnte mittels bioinformatischer Analysen als neues Mitglied der ITI-Genfamilie identifiziert werden (Himmelfarb *et al.* 2004). Das Gen kodiert für ein Polypeptid bestehend aus 942 Aminosäuren und enthält die ITIH typische Proteindomäne *Vault Protein Inter-alpha-Trypsin-* (VIT) Domäne, deren Funktion noch nicht geklärt ist. Weiterhin enthält das Protein eine *Willebrand type A-* (vWA) sowie eine *Multicopper Oxidase-* (MCO) Domäne, ebenso wie eine konservierte Protease-Spaltstelle (D\PHFVV) im C-terminalen Segment und ein 18 Aminosäuren (AS) langes N-terminales Signalpeptid für eine mögliche Sekretion (Himmelfarb *et al.* 2004) (Abb. 1-6).

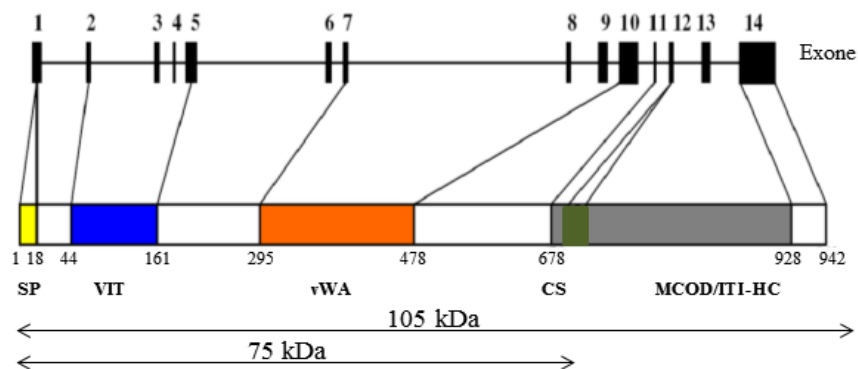


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der genomischen Organisation und Domänen Struktur des *ITIH5*-Gens. Die schwarzen Rechtecke repräsentieren die 14 Exone des *ITIH5*-Gens. Die Linie zwischen den Exone deuten in einem reduzierten Maßstab die Introns an. Die Domänen der Proteinstruktur sind farblich gekennzeichnet: gelb: Signalpeptidsequenz (SP); blau: VIT-Domäne; orange: vWA-Domäne; grün: Spaltstelle (engl. *cleavage site*, CS) und grau: ITI *Heavy Chain* Domäne (ITI-HC), welche nach Himmelfarb *et al.* die Multicopper Oxidase Domäne (MCO) enthält, aber im Zuge der Reifung abgespalten wird. Die Doppelkopfpfeile unterhalb der Domänen geben die Größe des gesamten Proteins und des N-terminalen Spaltprodukts wieder (verändert: nach Himmelfarb *et al.* 2004).

Das Expressionsmuster von *ITIH5* unterscheidet sich von dem der anderen ITIHs mit einer starken Expression in der Plazenta und einer moderaten Expression in verschiedenen Organen wie Uterus und Brustdrüse (Himmelfarb *et al.* 2004). Das biologische Wirkungsspektrum von *ITIH5* konnte bisher noch nicht entschlüsselt werden. Eine klare tumorsuppressive Funktion konnte bereits im Mammakarzinom gezeigt werden, wo die *ITIH5*-Expression bedingt durch eine aberrante DNA-Methylierung drastisch herunterreguliert wird. Die verminderte Expression ist mit der malignen Progression von Brustkrebs assoziiert und korreliert mit einem geringen Rezidiv-freien- und Gesamtüberleben der Patientinnen (Veeck *et al.* 2008b). Weiterhin konnte eine DNA-Methylierung des *ITIH5*-Promotors in der akuten myeloischen Leukämie (AML) dargelegt werden (Oing *et al.* 2011).

Eine aktuelle Studie konnte *ITIH5* mit einer erhöhten Expression im Fettgewebe nachweisen und erstellte somit eine mögliche Verbindung zum Fettsäurestoffwechsel (Anveden *et al.* 2012). Die DNA-Methylierung des *ITIH5*-Promotors in verschiedenen Tumorentitäten gibt einen Hinweis auf eine mögliche zentrale Rolle von *ITIH5* in der Progression von Tumoren.

1.5 N-MYC DOWNSTREAM REGULIERTE GENFAMILIE (NDRG)

Die humane *N-Myc downstream regulated* Genfamilie (NDRG) umfasst die Moleküle NDRG1, NDRG2, NDRG3 und NDRG4. Das erste beschriebene Mitglied dieser Familie, NDRG1, ist aufgrund seiner Expressionshemmung durch die Onkogene *N-MYC* und *c-MYC* namensgebend für die Genfamilie (Shimono *et al.* 1999). Shimono *et al.* identifizierten NDRG1 mit einer erhöhten Expression in *N-MYC* defizienten Mäusen. Okuda und Kondoh identifizierten in einer zweiten Studie erstmalig NDRG2 und NDRG3, deren Regulation scheinbar differenziell zu NDRG1 verläuft, da eine erhöhte Expression von NDRG2 und NDRG3 in *N-MYC knock-out* Mäusen nicht gezeigt werden konnte (Okuda & Kondoh 1999). Lokalisiert sind die humanen *NDRG*-Moleküle auf vier unterschiedlichen Chromosomen: *NDRG1* liegt auf Chromosom 8, *NDRG2* auf Chromosom 14, *NDRG3* auf Chromosom 20 und *NDRG4* ist auf Chromosom 16 angeordnet. *NDRG2* kodiert für ein Polypeptid bestehend aus 371 Aminosäuren. Kennzeichnend zeigen alle NDRG-Proteine mit hoher Homologie eine α/β Hydrolase Domäne, die jedoch keine Funktionalität aufweist, da das charakteristische Aminosäure Motiv (Ser-His-Asp/Glu), wie es in anderen Hydrolasen vorkommt (Wagner *et al.* 1996), fehlt. Potentielle Phosphorylierungsstellen verknüpfen NDRG2 mit wichtigen intrazellulären Signaltransduktions-Prozessen wie dem AKT- und dem SGK1-Signalweg (Burchfield *et al.* 2004; Chen *et al.* 2007; Murray *et al.* 2004).

Die Genfamilie zeigt ein differenzielles Gewebe-Expressionsmuster, welches auf alternative Funktionen der Moleküle hinweisen könnte (Qu *et al.* 2002). Im adulten Gewebe besitzt NDRG2 eine hohe Expression in der Speicheldrüse, in verschiedenen neuronalen Geweben und in der Skelettmuskulatur, während die NDRG2-Expression im Thymus, Knochenmark sowie in den Hoden und den peripheren Blut Leukozyten gering ist (Deng *et al.* 2003). Im Gegensatz zu NDRG2 besitzt NDRG1 ein relativ ubiquitäres Expressionsmuster, wohingegen NDRG3 im Gehirn und in den Hoden, NDRG4 im Gehirn und im Herzgewebe stark exprimiert wird (Qu *et al.* 2002).

Die NDRG-Moleküle sind in wichtigen biologischen Prozessen, wie der zellulären Differenzierung und Entwicklung (Choi *et al.* 2003) sowie der Regulation neuronaler Erkrankungen (Hirata *et al.* 2004; Mitchelmore *et al.* 2004; Okuda *et al.* 2004) involviert. Darüber hinaus geben zahlreiche Studien Hinweise auf eine tumorsuppressive Eigenschaft

einzelner Moleküle, wodurch zusätzlich eine bedeutende Rolle dieser Moleküle innerhalb der Karzinogenese deutlich wird. Eine signifikante, differenziell verminderte NDRG2-Expression konnte bisher in verschiedenen humanen Krebszelllinien (Liu *et al.* 2007) und primären Tumoren wie dem Glioblastom (Li *et al.* 2011), dem Kolonkarzinom (Lorentzen *et al.* 2007), dem Pankreaskarzinom sowie dem Leberkarzinom (Hu *et al.* 2004), dem klaren kleinzelligen Nierenkarzinom (Ma *et al.* 2008), dem Lungenkarzinom (Li *et al.* 2013) und dem Meningiom (Lusis *et al.* 2005) gezeigt werden. Choi *et al.* zeigten, dass NDRG2-positive Kolonkarzinom-Patienten eine höhere Überlebensrate gegenüber NDRG2-negativen Patienten aufweisen und dass der Verlust der NDRG2-Expression ein signifikanter, unabhängiger prognostischer Indikator für das Kolonkarzinom darstellt (Choi *et al.* 2007). Ebenso prognostiziert eine hohe NDRG2-Expression ein höheres Rezidiv-freies Überleben von Mammakarzinom-Patientinnen, während der Verlust der NDRG2-Expression in einer erhöhten Lymphknoten-Metastasierung resultiert (Oh *et al.* 2012). Die DNA-Hypermethylierung des *NDRG2*-Promotors ist ein kennzeichnendes Merkmal einer verringerten NDRG2-Expression, die in Zelllinien des Mammakarzinoms, Kolonkarzinoms und des Lungenkarzinoms (Piepoli *et al.* 2009) sowie im primären Magenkarzinom (Chang *et al.* 2013), Mammakarzinom (Jeschke *et al.* 2012), Glioblastom (Tepel *et al.* 2008) und Kolonkarzinom (Feng *et al.* 2011; Piepoli *et al.* 2009) gezeigt wurde. Die Bedeutung von NDRG2 in der Karzinogenese der unterschiedlichen Tumorentitäten wurde durch Überexpressions- und *knock-down* Studien *in vitro* und *in vivo* analysiert. Zahlreiche Studien zeigten eine tumorsuppressive Eigenschaft von NDRG2, dessen Verlust mit einer erhöhten Proliferationsrate und Metastasierungsfähigkeit von Tumorzellen einhergeht (Deng *et al.* 2003; Gao *et al.* 2011; Guo *et al.* 2013; Kim *et al.* 2009b; Lee *et al.* 2008; Ma *et al.* 2010; Mordalska *et al.* 2010; Song *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Yu *et al.* 2011; Zheng *et al.* 2011). Im Folgenden soll die potentielle Rolle von NDRG2 in der Tumorgenese, insbesondere im Mammakarzinom, näher erläutert werden, da die funktionelle Analyse dieses putativen Tumorsuppressorgens in Bezug einer möglichen ITIH5-Assoziation in der vorliegenden Arbeit im Mammakarzinom angestrebt wurde.

1.5.1 NDRG2 IN DER TUMORGENESE MIT DEM FOKUS AUF DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM

Eine eindeutige tumorsuppressive Rolle von NDRG2 innerhalb von Proliferations- und Metastasierungsprozessen im Mammakarzinom konnte in mehreren Studien *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (Oh *et al.* 2012; Shon *et al.* 2009; Zheng *et al.* 2010). Dabei ist NDRG2 intrazellulär in zentralen Karzinogenese-assoziierten Signalwegen involviert. Oh *et al.* identifizierten NDRG2 als negativen Regulator des TGF- β - (*Transforming Growth Factor-*

Beta) Signalwegs. TGF- β 1, ein Ligand der TGF- β -Superfamilie, spielt eine wichtige wie auch kontroverse Rolle innerhalb der Tumorgenese des Mammakarzinoms (Jakowlew 2006; Taylor *et al.* 2011). Vor allem in der frühen Tumorgenese besitzt TGF- β 1 tumorsuppressive Eigenschaften und wirkt präventiv als negativer Regulator der Proliferation durch die Induktion apoptotische Prozesse und die Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellen und Gewebe. Genetische und epigenetische Veränderung im Verlauf der Karzinogenese des Mammakarzinoms inaktivieren die tumorsuppressiven Eigenschaften von TGF- β 1 und dessen pro-onkogene Eigenschaft wird deutlich (Taylor *et al.* 2011). Dabei fördert der Ligand die Invasion, Angiogenese und Metastasierung von Brustkrebs u.a. durch die Umstrukturierung der ECM (Taylor *et al.* 2011). In einer NDRG2-überexprimierenden murinen Mammakarzinom-Zelllinie reduzierte NDRG2 die Produktion von aktivem, pro-onkogenem TGF- β 1 in der Zelle und inhibierte die Tumordinvasion *in vitro* und die Metastasierung *in vivo* (Oh *et al.* 2012). Im Einklang damit steht eine reduzierte Expression von PAI-1 und Integrin β 6 (Oh *et al.* 2012). Integrin β 6 kontrolliert das Umschalten (*switch*) zwischen der latenten und der aktiven Form von TGF- β 1 (Munger *et al.* 1999), während PAI-1, ein TGF- β 1-reguliertes Zielgen, in der Aufrechterhaltung der Matrix-Homöostase involviert ist (Massague 2012). Die mögliche antagonistische Wirkung von NDRG2 in der TGF- β -vermittelten Tumordinvasion und -Migration konnte ebenfalls im Leberkarzinom gezeigt werden (Lee *et al.* 2008). Tumordinvasive und -migratorische Prozesse verlangen zudem eine Umstrukturierung und Degradation der ECM und der ECM-basierten Zellmotilität (Wagener & Müller 2010). Wesentlich beteiligt an diesen Vorgängen sind neben dem TGF- β -Signalweg Matrix-Metalloproteinasen wie MMP2 und MMP9, die ECM Komponenten degradieren (Egeblad & Werb 2002) und zudem die latente Form von TGF- β aktivieren können (Wang *et al.* 2006). Eine Inhibition der enzymatischen Aktivität von MMP9 konnte in MDA-MB-231-Brustkrebszellen, die NDRG2 überexprimieren, gezeigt werden (Shon *et al.* 2009). Die Inhibition von MMP9 ist dabei von der durch NDRG2 induzierten BMP-4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) Aktivierung abhängig. Eine durch NDRG2 induzierte Inhibition der MMP2- und MMP9-Aktivität konnte ebenfalls in Fibrosarkom- und Melanom-Zellmodellen gezeigt werden (Kim *et al.* 2009a).

Die zentrale tumorsuppressive Funktion von NDRG2 wird in der vielfach beschriebenen Assoziation mit dem Zelloberflächen-Rezeptors CD24 untermauert. Aggressive Brusttumoren zeigen häufig eine hohe Expression des Zelloberflächen-Glykoprotein CD24, welches eine fundamentale Bedeutung in der Progression, Migration und Metastasierung von Brustkrebs hat (Kristiansen *et al.* 2003). Im Mammakarzinom wurde

bereits gezeigt, dass die NDRG2-Expression negativ mit der CD24-Expression korreliert und auf diese Weise die Adhäsion und Invasion von Brustkrebszellen *in vitro* vermindert (Zheng *et al.* 2010). Die negative Regulation der CD24-Expression durch das putative Tumorsuppressorgen *NDRG2* konnte zudem bereits im Leberkarzinom, im Lungenkarzinom sowie im Karzinom der Gallenblase beschrieben werden (Song *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Zheng *et al.* 2011). Weiterhin gibt es Hinweise, dass *NDRG2* die Expression von Wachstumsfaktoren wie dem vaskulären endothelialen (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) (Ma *et al.* 2012) und dem Plättchen-abgeleiteten Wachstumsfaktor (*Platelet-derived growth factor*, PDGF) (Liu *et al.* 2010) durch eine negative Regulation des ERK1/2-Signalwegs inhibiert. Der Datenlage entsprechend besitzt das *NDRG2*-Molekül eine klinische und molekulare Relevanz für die Suppression unterschiedlicher Tumorentitäten und bildet so ein mögliches Target innerhalb des tumorsuppressiven *ITIH5*-Wirkungsspektrums.

1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Das Mammakarzinom steht mit einem prozentualen Anteil von 24% an erster Stelle der Krebs-bedingten Sterbefälle bei Frauen in Deutschland. Dabei ist besonders die Erkennung eines Brusttumors in einer frühen Phase ohne Befall der axillären Lymphknoten von enormer Bedeutung für das Überleben der Patientin. Unser Wissen über die Tumorgenese der Brust hat sich in den letzten Jahrzehnten zwar deutlich erweitert, jedoch wurde dieses Wissen bisher nicht effizient genug in eine optimale Strategie für eine frühe Detektion von Brustkrebs umgesetzt. Für die Verbesserung sowie die Unterstützung bestehender Methoden zur Brustkrebs-Früherkennung ist die Analyse Blutserum-assoziiertes DNA-Methylierungsmarker besonders vielversprechend.

Die in dieser Arbeit angestrebte Identifizierung und Validierung neuer Blutserum-basierter potentieller DNA-Methylierungsmarker sollte einen Beitrag zur Früherkennung des Mammakarzinoms leisten. Um das Vorhaben umzusetzen, sollten initial in einer Identifizierungsphase sechs potentielle Kandidatengene (*ITIH5*, *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP5*, *DKK3* und *WIF1*) im Hinblick auf eine aberrante DNA-Methylierung in der cfDNA des Serums von Mammakarzinom-Patientinnen untersucht werden. Gefordert war dabei eine hohe analytische sowie klinische Leistungsfähigkeit der potentiellen Biomarker. Grundlage für die Analysen bildete das mit 604 Proben größte beschriebene Kollektiv an humanen Seren im Bereich der Mammakarzinom-Früherkennungsforschung weltweit. Diese Proben wurden unterteilt in Seren von Frauen mit einem Mammakarzinom (n=250) sowie Seren wichtiger Kontrollgruppen (Seren von gesunden Frauen und von Frauen mit benignen Brusterkrankungen sowie Seren von Kolonkarzinom-Patienten, n=354). Überdies sollten 112

humane Tumorgewebe-DNA-Proben derselben Patientinnen, von denen auch Serum vorlag, untersucht werden, um eine mögliche Korrelation zu dem Methylierungsstatus in der Serum-cfDNA aufzeigen zu können. Die qualitative methylierungsspezifische PCR (MSP) sollte in der Identifizierungsphase zum Einsatz kommen, wohingegen diese in Anbetracht einer möglichen klinischen Nutzbarkeit identifizierter hoch spezifischer Biomarker in der folgenden Validierungsphase durch die objektivere quantitative MSP ersetzt werden sollte. In der Validierungsphase sollten die potentiellen Kandidatengene, die in der ersten Phase durch eine hohe Spezifität herausragten, unabhängig validiert werden. Der im Serum von Brustkrebs-Patientinnen bereits als hoch spezifisch dargelegte potentielle Biomarker *RASSF1A* sollte im Validierungskollektiv als interner Standard die neu identifizierten, potentiellen Biomarker dieser aktuellen Studie komplementieren. Potentielle spezifische Biomarker-Kandidaten sollten abschließend mittels statistischer *Receiver Operating Characteristics* (ROC) Analysen hinsichtlich ihrer klinischen Effizienz für einen möglichen Blut-basierten Tests optimiert werden, um auf diese Weise ein robustes, sensitives und spezifisches Biomarker-*Panel* aufstellen zu können.

Die Brustkrebs-assoziierte hohe Sterberate basiert vor allem auf einer hohen Tendenz der Metastasierung in entfernt-liegende Organe. Die Aufschlüsselung Metastasierungs-relevanter Signalwege impliziert einen zentralen Ansatzpunkt der individuellen Therapie, um zukünftig die hohe Brustkrebs-Sterberate zu reduzieren. Neben der potentiellen Funktion von *ITIH5* als Brustkrebs-assoziiertes Früherkennungs-Biomarker besteht der Hinweis, dass der im Mammakarzinom durch DNA-Methylierung bedingte *ITIH5*-Expressionsverlust, insbesondere bei Mammakarzinom-Patientinnen ohne Befall der axillären Lymphknoten, mit einem verkürzten Rezidiv-freien Überleben verknüpft ist. Aufgrund dieser Datenlage könnte *ITIH5* die Rolle eines putativen Metastasierungssuppressorgens im humanen Mammakarzinom zugetragen werden. Ein zugrunde liegender Signalweg, der die zentrale Stellung von *ITIH5* im Mammakarzinom funktionell einordnet, wurde bisher noch nicht gezeigt. Zur Aufschlüsselung des biologischen *ITIH5*-Wirkungsspektrums in der Zelle sollte ein *ITIH5 gain-of-function* Modell in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie BT20 etabliert werden. Hinsichtlich der forcierten *ITIH5*-Expression sollten nachfolgend die migratorischen und proliferativen Zelleigenschaften sowie die Zell-Matrix-Adhäsion und die Kolonienbildung der BT20-Zellen charakterisiert werden. Das generierte Tumormodell sollte in Kombination mit einem weiteren zellulären *ITIH5*-basierten Mammakarzinom-Modell (MDA-MB-231) in einer Genexpression *Microarray* Analyse eingesetzt werden. Ziel dieser Analyse war die erstmalige Identifizierung differenzieller *ITIH5*-assoziiertes Zielgenmuster.

Anhand der aufgezeigten ITIH5-assoziierten Zielgene sollte abschließend die tumorsuppressive Funktion von ITIH5 in einen Signalweg-basierten Kontext gestellt werden, um so das zelluläre Wirkungsspektrum von ITIH5 im Brustkrebs zum ersten Mal klarer definieren zu können.

Die angestrebten Ziele dieser Arbeit, die Identifizierung und Validierung neuer Blut-basierter Brustkrebs Früherkennungs-Biomarker sowie die Aufschlüsselung des ITIH5-Wirkungsspektrums im Brustkrebs, sollte einen wichtigen Beitrag zur klinischen Anwendbarkeit potentieller Biomarker leisten, um zukünftig die Behandlung von Brustkrebs-Patientinnen zu verbessern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 KLINISCHES PROBENMATERIAL

2.1.1 KRYOKONSERVIERTES HUMANES FRISCHGEWEBE

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurde ein Kollektiv mit 112 Gewebeproben von Brustkrebs-Patientinnen bearbeitet. Die Gewebeproben konnten in Kooperation mit der Frauenklinik der Uniklinik RWTH Aachen (Direktor Prof. Nicolai Maass) zusammengestellt werden und wurden nach der Diagnosestellung eines primären Mammakarzinoms zwischen den Jahren 2005 und 2009 entnommen. Alle Patientinnen hatten eine Einverständniserklärung zur Konservierung ihres Gewebes für Forschungszwecke unterzeichnet. Für Untersuchungen von Brusttumormaterial zur Erforschung des Brustkrebses lag ein positives Votum seitens der Ethikkommission der Uniklinik RWTH Aachen (EK104/05) vor. Nach der Gewebe-Resektion wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Bearbeitung bei -80°C gelagert. Mittels HE-Färbung an Schnitten ($10\ \mu\text{m}$) wurde der Anteil der Tumorzellen bestimmt und nur solche Proben mit einem Tumorzellanteil $>70\%$ weiter verwendet. In das Kollektiv eingeschlossen wurden nur weibliche Patientinnen mit einem unilateralen, primären Mammakarzinom ohne eine vergangene Brustkrebs-Diagnose, wobei die Patientin nicht unter der Behandlung einer neoadjuvanten Chemotherapie stehen durfte.

2.1.2 KRYOKONSERVIERTE HUMANE SERUMPROBEN

Innerhalb dieser Arbeit konnte in Kooperation mit der Frauenklinik der Uniklinik RWTH Aachen, dem Universitätsklinikum Erlangen (Prof. Dr. med. Peter Fasching, Direktor: Prof. Matthias W. Beckmann) und der von ehemaligen Brustkrebs-Patientinnen gegründete Stiftung PATH (<http://stiftungpath.org/>) (Vorstand: Ulla Ohlms, Doris C. Schmitt, Carmen Waldner) ein Kollektiv von 604 präoperativen humanen Serumproben aufgebaut werden. Alle Patientinnen hatten eine Einverständniserklärung zur Konservierung ihres Serums für Forschungszwecke unterzeichnet. Für Untersuchungen von Serummaterial zur Erforschung des Brustkrebses lag ein positives Votum seitens der Ethikkommission der Uniklinik RWTH Aachen (EK104/05) sowie der weiteren Beteiligten Zentren vor. Für die Identifizierung und Validierung neuer potentieller Biomarker für eine Blutserum-basierte Brustkrebs-Früherkennung stellte diese Kohorte weltweit die höchste Anzahl an Serumproben dar. Das gesamte Kollektiv gliederte sich in ein Testkollektiv mit 261 Proben und in ein unabhängiges Validierungskollektiv mit 343 Proben. Das Validierungskollektiv wurde hinsichtlich des Alters der Patientinnen und den klinisch-pathologischen Parametern auf das Testkollektiv

abgestimmt. Ebenfalls wurden die analysierten Kontrollen von gesunden Frauen auf das Alter der Brustkrebs-Patientinnen korreliert. Neben den klassischen Kontrollen von gesunden Probandinnen dienten die Serumproben von Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust sowie Seren von Kolonkarzinom-Patienten als eine zusätzliche Spezifitätskontrolle. Die untersuchten 112 Seren der Mammakarzinom Patientinnen des Testkollektivs stammten aus denselben Patientinnen, die bereits dem kryokonservierten Gewebekollektiv zugehörten. Die Zusammenfassung der klinisch-pathologischen Faktoren des Serum-Kollektivs ist im Anhang A.2 zusammengefasst. Abbildung 2-1 zeigt eine Übersicht des gesamten Kollektivs, welches in dieser Arbeit aufgebaut und analysiert wurde (Kloten *et al.* 2013).

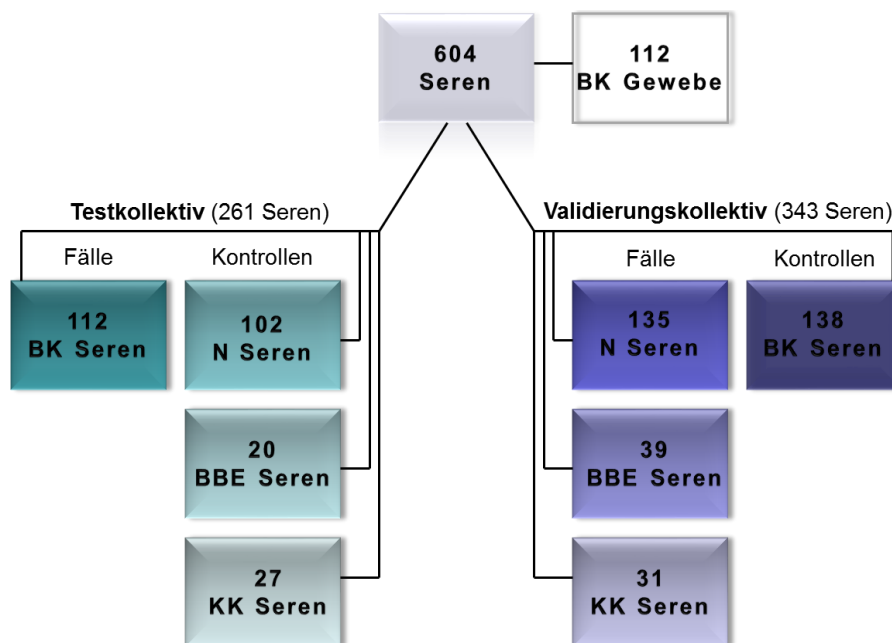


Abbildung 2-1: Übersicht des in dieser Studie analysierten Serumkollektivs (Kloten *et al.*, 2013). **BK:** Brustkrebs, nur weibliche Patienten mit einem primären, invasiven Brusttumor; **N:** Normalseren, zu den Tumorfällen alters-gepaarte Seren von gesunden Probandinnen; **BBE:** Benigne Brusterkrankungen, Seren von Patientinnen mit benignen Erkrankungen der Brust wie z.B. einem Fibroadenom; **KK:** Kolonkarzinom, Seren von Patienten mit einem primären invasiven Darmtumor.

Von jeder Patientin wurden 10 ml Vollblut in Serum-Röhrchen entnommen, das Serum präpariert und sofort bei -80 °C eingefroren. Aus den 10 ml Vollblut konnten 3-4 ml Serum gewonnen werden, welches für die Analysen zur Verfügung stand.

2.2 HUMANE MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN

Die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 (Adenokarzinom, pleurale Effusion) und BT20 (invasives duktales Karzinom) wurden von der *American Typ Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen und wie vom Anbieter empfohlen kultiviert. Alle Zelllinien wurden in dreimonatigen Abständen auf Abwesenheit von Mycoplasmen überprüft.

2.3 GERÄTE, SOFTWARE, CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

2.3.1 GERÄTE

Tabelle 2-1: Verwendete Geräte

| Gerät | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| Axiovert 200 Mikroskop | Zeiss, Jena |
| Brutschrank (20% O ₂ , 5% CO ₂ , 37 °C) | Biorad, München |
| CASY [®] Cell Counter und Analyzer | OLS OMNI Life Science, Bremen |
| Digital pH-Meter | Schärfe System, Reutlingen |
| Eppendorf Research Pipetten | Eppendorf, Wesseling |
| Eppendorfszentrifuge 5415C (Rotor: UE001) | Eppendorf, Wesseling |
| Gel-Dokumentationseinheit | MWG Biotech AG, Ebersberg |
| Gene Pulser II Electroporation System | Biorad, München |
| Kryotom HM560 | Microm Laborgeräte, Walldorf |
| Laborwaage | Laborgeräte, Walldorf |
| LightCycler IQ5 | Biorad, München |
| Megafuge 1.0 (Rotor: BS4402/A) | Sartorius, Göttingen |
| NanoDrop ND1000 | Thermo Scientific, Waltham, MA |
| Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25 | Zeiss, Jena |
| PyroMark ID | Qiagen, Hilden |
| PyroMark Vacuum Prep Station | Qiagen, Hilden |
| Reinraumwerkbank Hera Safe | Hera Safe Heraeus/Kendro, Düsseldorf |
| Schüttler MTS4 | IKA-Werke, Staufen |
| Stromversorgungsgerät | Gibco / BRL, Eggenstein |
| Thermoblock DRI-BlockDB-2A | Techne, Burkhardsdorf |
| Thermomixer compact | Eppendorf, Wesseling |
| Thermocycler PTC-200 | MJ Research, Waltham |
| Tischzentrifuge 4515D | Eppendorf, Wesseling |
| Vortex MS2 Minishaker | IKA-Werke, Staufen |
| Wasserbad | GFL, Burgwedel |

2.3.2 SOFTWARE UND DATENBANKEN

Tabelle 2-2: Verwendete Software

| Software/Datenbanken | Webadresse/Hersteller |
|--|---|
| Beacon Designer Software | Premier Biosoft, CA |
| EMBOSS Cpgplot | http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cpgplot |
| ENSEMBL Datenbank | http://www.ensembl.org |
| GeneCards Datenbank | http://www.genecards.org |
| Genomatix Online Portal | http://www.genomatix.de |
| GraphPad Prism 5.0 Gold Statistik Software | GraphPad Prosm, La Jolla, CA |
| GOBO-Datenbank | http://co.bmc.lu.se/gobo/ |
| ImageJ Software | National Institutes of Health |
| ImageQuant TL v2003.2 | http://www.imsupport.com |
| Kaplan-Meier-Plotter Datenbank | http://kmplot.com/analysis/ |
| Methprimer Online Portal | http://www.urogene.org/methprimer |
| MSPprimer Online Portal | http://msspprimer.org |
| Primer3 Online Portal | http://www.frodo.wi.mit.edu |
| PSQ Assay Design Software | Qiagen, Hilden |
| PUBmed Datenbank | http://www.ncbi.nlm.nih.gov |
| PUBMETH Datenbank | http://www.pubmeth.org |
| Pyro Q-CpG Software | Qiagen, Hilden |
| PFAM Online Portal | http://pfam.sanger.ac.uk |
| SPSS 20.0 Statistik Software | SPSS, Chicago, IL |

2.3.3 CHEMIKALIEN

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien in p. A. Grad oder in der reinsten erwerbbaeren Form verwendet. Im Folgenden nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen oder sind direkt im zugrunde liegenden Methodenabschnitt aufgeführt.

Tabelle 2-3: Verwendete Chemikalien

| Chemikalie | Firma |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 5-Aza-2'-desoxyctidin | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Agarose <i>SeaKem LE agarose</i> | Cambrex, Rockham, ME, USA |
| Ammoniumsulfat | Merck, Darmstadt |
| CASYTON Messlösung | Schärfe System, Reutlingen |
| Ethidiumbromid | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Fötale Kälberserum (FKS) | Seromed Biochrom, Deisenhofen |
| FuGENE HD Transfektions Reagenz | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Glycerin | Merck, Darmstadt |
| HiPerFect Transfektions Reagenz | Qiagen, Hilden |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Kristallviolett | Merck, Darmstadt |
| L-Glutamin | PAA, Cölbe |
| Magnesiumchlorid | Merck, Darmstadt |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Methylenblau | Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Penicillin; Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| Tissue-Tek | Sakura Finetek, Niederlande |
| Trichostatin A | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Trisbase | Merck, Darmstadt |
| TRIZOL® | Invitrogen, Karlsruhe |
| Trypsin | Biochrom, Berlin |
| VitroClud | Langenbrinck, Emmendingen |
| Zitronensäure | Fluka, Neu-Ulm |

2.3.4 LÖSUNGSMITTEL

Tabelle 2-4: Verwendete Lösungsmittel

| Chemikalie | Firma |
|-------------------|------------------|
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Formaldehyd | Merck, Darmstadt |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Xylol | Merck, Darmstadt |

2.4 PUFFER UND LÖSUNGEN

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden mit H₂O-bidest. hergestellt und falls erforderlich steril filtriert oder autoklaviert. Nicht aufgeführte Puffer und Lösungen sind im zugehörigen Methodenabschnitt beschrieben, oder es wurden kommerzielle Puffer und Lösungen verwendet.

Tabelle 2-5: Verwendete Puffer und Lösungen

| Puffer/Lösung | Zusammensetzung |
|---|--|
| Allgemeine Puffer und Lösungen | |
| 10× PBS-Puffer (pH 7,5) | 160 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 M NaCl |
| 10x TBS-Puffer (pH 7,6) | 500 mM Tris/HCl, 1,5 M NaCl |
| DEPC-H ₂ O | 0,1% (w/v) DEPC in H ₂ O, ü. N. gerührt, autoklaviert |
| Eosin-Lsg | 1 g Eosin in 100 ml H ₂ O |
| Lysepuffer (pH 7,2) | 0,64 M NH ₄ Cl, 0,04 M KHCO ₃ , 0,01 M EDTA, mit ddH ₂ O auf 2 l auffüllen |
| Mayers-Hämalaun-Lsg. | 1 g Hämatoxylin, 200 mg Na-Iodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure, in 1 l H ₂ O |
| Methylenblau-Lsg | 0,1% (w/v) Methylenblau in Ethanol abs. |
| TBS/Tween | 1 l 1xPBS, 0,1% Tween 20 |
| Tris-Puffer (pH 7,6) | 10 mM Tris-HCl, mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen |
| Lösungen für Gelelektrophoresen | |
| 10× TBE-Puffer | 890 mM Tris, 20 mM EDTA, 890 mM Borsäure (pH 8,3) |
| 5× Ladepuffer | 2,5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 90% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol |
| Agarose-Lsg. | 2-3% (w/v) Agarose in 1×TBE-Puffer |
| Ethidiumbromid-Lsg. | 35 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) in 1×TBE-Puffer (350 µg/l) |
| Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | |
| 10× MSP-Puffer | 167 mM Ammoniumsulfat, 670 mM Tris (pH 8,8), 67 mM MgCl ₂ , 100 mM β-Mercaptoethanol |
| dNTP-Mix MSP | dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 25 mM |
| MgCl ₂ | 25 mM Stocklösung Promega, Mannheim |
| Lösungen für diskontinuierliche Gelelektrophoresen und Westernblot | |
| Lyse-/Probenpuffer | 1 ml 4 x NuPage-SDS Puffer (Invitrogen), 200 µl frisches 1 M DTT mit 2,8 ml ddH ₂ O auffüllen |
| RIPA-Lysepuffer | 50 mmol/l Tris/HCl (pH 7.2), 250 mmol/l NaCl, 2% (v/v) NP-40, 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) sodium deoxycholate, 2,5 mM EDTA |
| SDS-Page Laufpuffer | NuPage 20xLaufpuffer Invitrogen, Tris-Glycin-Laufpuffer (MOPS) 50 ml mit 950 ml ddH ₂ O auffüllen |
| Transfer Puffer | 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol auf 1 l ddH ₂ O |
| Lösungen für die Zellkultur | |
| 10× PBS-Puffer (pH 7,5) | 160 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 M NaCl |
| Kristallviolett-Lsg. | 0,25% (w/v) Kristallviolett in 10% Formaldehyd/80% Methanol/10% H ₂ O |
| Trypsin-EDTA-Lösung | 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS |
| Lösungen für die Immunhistochemie | |
| Zitronensäure-Lsg. | 0,1 M C ₆ H ₈ O ₇ , mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen |
| Natriumcitrat-Lsg | 0,1 M C ₆ H ₈ O ₇ Na ₃ , mit ddH ₂ O auf 1 l auffüllen |

2.5 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR

Alle Zellkulturmedien wurden von der Firma PAA Laboratories (Cölbe) bezogen.

Tabelle 2-6: Verwendete Zellkulturmedien

| Zelllinie | Medium und Zusätze |
|--------------------|---|
| MDA-MB 231 BT20 | DMEM 1g Glukose; 10% FKS; 2mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin |

2.6 MONOKLONALE UND POLYKLONALE ANTIKÖRPER

Tabelle 2-7: Verwendete monoklonale und polyklonale Antikörper

| Antikörper | Klonalität | Firma/Referenz | Epitop | Verdünnung |
|----------------------|------------|---------------------------|--|------------|
| Rezeptoren | | | | |
| sc-6199 | Poly | Santa Cruz | TGF β RIII, C-terminus (Endoglin) | 1:500 |
| sc-398 | Poly | Santa Cruz | ALK5, C-terminale zytoplasmatische Domäne | 1:500 |
| sc-400 | Poly | Santa Cruz | RII, zytoplasmatische Domäne TGF β RII | 1:500 |
| | Poly | Lux <i>et al.</i> 1999 | ALK1 | 1:500 |
| Zielproteine | | | | |
| CS-5605 | Mono | Cell Signaling Technology | c-Myc | 1:1.000 |
| CS-2926 | Mono | Cell Signaling Technology | Cyclin D1 | 1:1000 |
| sc-557 | Poly | Santa Cruz | FAK, N-terminus | 1:1.000 |
| sc-81493 | Mono | Santa Cruz | pFAK, Tyrosine 397 | 1:500 |
| CS-2109 | Mono | Cell Signaling Technology | Src, C-Terminus | 1:1.000 |
| HPA002896 | Poly | Pineda ^a | ITIH5 | 1:1.000 |
| | Poly | Atlas Antibody | NDRG2 | 1:500 |
| Ladekontrolle | | | | |
| #A5441 | Mono | Sigma-Aldrich | β -Aktin, Klon AC-15 | 1:2000 |

^aNicht-kommerzieller Antikörper: ein polyklonales ITIH5-Antiserum wurde durch eine Immunisierung von Kaninchen mittels eines synthetisierten Peptids, korrespondierend zu den Aminosäuren des ITIH5-Proteins (NH₂-CYLASHPFDTGMTLGRGMSREL-COOH), durch die Firma Pineda (Berlin) hergestellt. Nach Antikörper-Extraktion wurde dieser aufgereinigt und auf Spezifität getestet.

2.7 DETEKTIONSKIT FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE

Dako RealTM Detection System K5001 (Dako, Glostrup, Dänemark).

UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer (Thermo Scientific, Fremont, CA).

2.8 MOLEKULARBIOLOGISCHE KITS

Tabelle 2-8: Verwendete molekularbiologische Kits

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|----------------------------------|
| Epi Tect Control DNA Set | Qiagen, Hilden |
| EZ- DNA Methylation Kit™ | Zymo Research, Bad Homburg |
| GoTaq® Flexi DNA Polymerase | Promega, Mannheim |
| IQ5 SYBR Green MasterMix | Bio-Rad, München |
| IQ™ Supermix | Bio-Rad, München |
| Mycoplasmen-Detektions PCR Kit™ | Minevra Biolabs, Berlin |
| Pierce® ECL Western Blotting Substrat | Pierce, Rockford, IL |
| PyroMark Gold Kit™ Reagents | Qiagen, Hilden |
| PyroMark PCR Kit™ | Qiagen, Hilden |
| QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAamp DNA Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick® Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| RNAi Human/Mouse Starter Kit | Qiagen, Hilden |
| <i>SssI</i> (CpG) methyltransferase | New England Biolabs, Beverly, MA |
| Universal RiboClone® cDNA Synthesis System | Promega, Mannheim |
| XTT Cell Proliferation Kit™ II | Roche Diagnostics, Mannheim |

2.9 OLIGONUKLEOTIDE

2.9.1 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE PYROSEQUENZIERUNG

Tabelle 2-9: Oligonukleotid-Sequenzen für die Pyrosequenzierung

| Gen | Sequenz (5' → 3') | T_A | Zyklen | Produkt |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------|---------------|----------------|
| <u>Assay 1</u> | | | | |
| <i>NDRG2</i> F | GGTCGTAGGGTTTGGGAAGG | | | |
| <i>NDRG2</i> R | bio-CCCCCTCCATACTAACCCCTTCCCC | 56°C | 45 | 102 bp |
| <i>NDRG2</i> Seq | GGTAGTAGGGTTTGGGAAG | | | |
| <u>Assay 2</u> | | | | |
| <i>NDRG2</i> F | bio-GAGGTTAGGGGGAAAGGGTTA | | | |
| <i>NDRG2</i> R | CCCCAACCTTACACACAACC | 56°C | 45 | 120 bp |
| <i>NDRG2</i> Seq | CCCCAACCTTACACACAAC | | | |
| <u>Assay 3</u> | | | | |
| <i>NDRG2</i> F | GAGGTTGTGTGTAAGGTT | | | |
| <i>NDRG2</i> R | bio-ATCCCACAATCTTCTCCC | 56°C | 45 | 198 bp |
| <i>NDRG2</i> Seq | GAGGTTGTGTGTAAGGTT | | | |

F: *Forward*; R: *Reverse*; Seq: Sequenzierung; bio: Biotinyliert; T_A: Anlagerungs-Temperatur.

2.9.2 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (MSP)

Tabelle 2-10: Oligonukleotid-Sequenzen für die MSP-Primer und MSP-Bedingungen

| Gen | Sequenz (5' → 3') | T _A | Zyklen | Produkt |
|------------------|--------------------------------------|----------------|--------|---------|
| <i>ITIH5</i> U | TTGGTGATAGAAATTAAGTAAGTTTGT | | | 221 bp |
| | AAAACCACCTATATTAACCCACACA | | | |
| <i>ITIH5</i> M | TTGGCGATAGAAATTAAGTAAGTTC | 59°C | 40 | 219 bp |
| | AACCACCTATATTAACCCACG | | | |
| <i>DKK3</i> U | TTTGGTTGGTTAATGGTTGGGTTGTGGTTTTTTTTG | | | 278 bp |
| | CCCTCACCCACCCCAACTAAACCAAATTACA | | | |
| <i>DKK3</i> M | GTTGGTTAATGGTCGGGTTGCGGTTTTTTTC | 63°C | 38 | 276 bp |
| | ACCCACCCCGACTAAACCGAATTACG | | | |
| <i>WIF1</i> U | GAAGGGTAATTTGTGTTTTTAGTGAGTGTG | | | 286 bp |
| | CCCCAAAACCTACATTCACAATACAATACA | | | |
| <i>WIF1</i> M | AAGGGTAATTTGCGTTTTTAGTGAGCGTC | 63°C | 38 | 285 bp |
| | CCCCGAAACCTACATTCACAATACGATACG | | | |
| <i>SFRP1</i> U | GTTTTGTAGTTTTTTGGAGTTAGTGTGTGTG | | | 125 bp |
| | CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA | | | |
| <i>SFRP1</i> M | TGTAGTTTTCGGAGTTAGTGTGCGCG | 60°C | 38 | 136 bp |
| | CCTACGATCGAAAACGACGCGAACG | | | |
| <i>SFRP2</i> U | TTTTGGGTTGGAGTTTTTTGGAGTTGTGT | | | 146 bp |
| | AACCCACTCTCTTCACTAAATACAACCTCA | | | |
| <i>SFRP2</i> M | GGGTCGGAGTTTTTCGGAGTTGCGC | 58°C | 39 | 141 bp |
| | CCGCTCTCTTCGCTAAATACGACTCG | | | |
| <i>SFRP5</i> U | GTAAGATTTGGTGTGGGTGGGATGTTT | | | 141 bp |
| | AAAACCTCCAACCCAAACCTCACCATACA | | | |
| <i>SFRP5</i> M | AAGATTTGGCGTTGGGCGGGACGTTC | 60°C | 39 | 136 bp |
| | ACTCCAACCCGAACCTCGCCGTACG | | | |
| <i>RASSF1A</i> U | GGTTGTATTTGGTTGGAGTG | | | 180 bp |
| | CTACAAACCTTTACACACAACA | | | |
| <i>RASSF1A</i> M | GTTGGTATTCGTTGGGCGC | 56°C | 38 | 160 bp |
| | GCACCACGTATACGTAACG | | | |

U: unmethyliert; M: methyliert; T_A: Anlagerungs-Temperatur.

2.9.3 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE QUANTITATIVE METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (QMSP)

Tabelle 2-11: Oligonukleotid-Sequenzen für die qMSP-Primer und qMSP-Bedingungen

| Gen | Sequenz (5' → 3') | T _A | Zyklen | Produkt |
|----------------------|--|----------------|--------|---------|
| <i>ITIH5</i> MF | GGTAAGAAACGGAGTAGGAGGTTT | 66°C | 50 | 115 bp |
| <i>ITIH5</i> MR | AACCACCTATATTAACCCACGAA | | | |
| <i>ITIH5</i> Sonde | 6FAM-ACACCCCTCCCATCCTACGACTATAACACTT-BHQ-1 | | | |
| <i>DKK3</i> MF | GCGTCGTTTTTCGTATTTGTATTTCG | 62°C | 40 | 92 bp |
| <i>DKK3</i> MR | CGACTAAACCGAATTACGCTACGA | | | |
| <i>DKK3</i> Sonde | 6FAM-CGAACTAAATCTACTCGCTCCCGCCGAAA-BHQ-1 | | | |
| <i>GAPDH</i> MF | GAGGATATAGTTTGGTTTTG | 58°C | 40 | 143 bp |
| <i>GAPDH</i> MR | CCTACCTAATAATAATCTTTACTTA | | | |
| <i>GAPDH</i> Sonde | 6FAM-ACTCCAATCCCTAACCCCTACCTT-BHQ-1 | | | |
| <i>RASSF1A</i> MF | ATTGAGTTGCGGGAGTTGG | 59°C | 40 | 65 bp |
| <i>RASSF1A</i> MR | ACACGCTCCAACCGAATACG | | | |
| <i>RASSF1A</i> Sonde | 6FAM-CCCTTCCCAACGCGCCCA-BHQ-1 | | | |

MF: methyliert *Forward*; MR: methyliert *Reverse*; 6FAM: 6-Carboxyfluorescein; BHQ-1: *Black Hole Quencher-1*; T_A: Anlagerungs-Temperatur.

2.9.4 OLIGONUKLEOTIDE FÜR DIE SEMIQUANTITATIVE *REAL-TIME* PCR

Tabelle 2-12: Sequenzen für die *Real-time* PCR und PCR-Bedingungen

| Gen | Sequenz (5' → 3') | T _A | Zyklen | Produkt |
|-------------------|----------------------------|----------------|--------|---------|
| <i>CCDC80</i> F | CACTTTCAGCTAGATAATGAGAAGC | 60°C | 40 | 190 bp |
| <i>CCDC80</i> R | TGGTACCTCATAGTATTGCTTGACTC | | | |
| <i>GAPDH</i> F | GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA | 60°C | 40 | 289 bp |
| <i>GAPDH</i> R | TGGACTCCACGACGTACTION | | | |
| <i>EHD3</i> F | CAACGCCTTCTTGAACAGGT | 60°C | 40 | 120 bp |
| <i>EHD3</i> R | AGTCATACCCCGGCTGAT | | | |
| <i>Endoglin</i> F | AGAGCTTGTTGCGCATTG | 60°C | 40 | 168 bp |
| <i>Endoglin</i> R | GATATTGACCACCGCTCAT | | | |
| <i>MXRA8</i> F | CGCGGAGGCTACGAATACT | 60°C | 40 | 92 bp |
| <i>MXRA8</i> R | TCCTTCCCCTTTGACTTTCC | | | |
| <i>NDRG2</i> F | TGGGACTCAACTATAAATCTTGCTT | 60°C | 40 | 170 bp |
| <i>NDRG2</i> R | TGGGTACTGATATCCCAAAGG | | | |
| <i>SPARC</i> F | GAGAAGGTGTGCAGCAATGA | 60°C | 40 | 135 bp |
| <i>SPARC</i> R | GGGGGATGTATTTGCAAGG | | | |

2.10 VEKTOREN

Für die stabile Transfektion der Mammakarzinom-Zelllinien BT20 und MDA-MB-231 wurde der pBK-CMV Phagemid Vektor der Firma Agilent Technologies (Stratagene Products Division, La Jolla, CA) eingesetzt.

2.11 SIRNA

Tabelle 2-13: Sequenzen der verwendeten *NDRG2*-siRNA

| Produkt Name | Sequenz (5' → 3') | Katalognummer |
|--------------|-----------------------|---------------|
| Hs_NDRG2_4 | AAGGGTATGGACCTACGTGAA | SI00656096 |
| Hs_NDRG2_5 | AGCCTACATCCTGGCGAGATA | SI04218543 |
| Hs_NDRG2_6 | CTCGCCTGTCCCGGTCTCGTA | SI04222666 |
| Hs_NDRG2_7 | CACCCAGACCTCGTTCCTCAA | SI04277987 |

2.12 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.12.1 DNA-ISOLATION AUS KRYOKONSERVIERTEM FRISCHGEWEBE UND HUMANEN

MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN

Genomische DNA wurde mittels des *QIAamp DNA Mini Kit* der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) aus kryokonserviertem humanem Frischgewebe sowie den humanen Brustkrebszelllinien BT20 und MDA-MB-231 gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Von jedem Tumorgewebe wurden je 10 Schnitte (10 µm) angefertigt und in einem Reaktionsgefäß vereinigt. Dabei wurde die Anwesenheit eines invasiven Mammakarzinoms vor dem ersten und nach dem letzten Schnitt mikroskopisch nach HE-Färbung abgesichert. Für das Tumorgewebe galt eine Abwesenheit von Normalepithel und ein Tumorzellanteil von >70% als Einschlusskriterium. Die vereinigten Schnitte wurden zunächst mit 25 µl Proteinase K in einem zugehörigen Lyse-Puffer (180 µl ATL-Puffer) ü.N. bei 56°C und 800 rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend erfolgte ein 2-minütiger RNase A Verdau (20 Einheiten in 180 µl AL-Puffer) bei Raumtemperatur, um kopräzipitierte RNA im Ansatz zu verdauen. Die Aktivität der RNase wurde durch eine 10-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol abs. wurde die Lösung auf eine *QIAamp*-Säule aufgetragen und diese bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule zunächst mit 500 µl AW1-Puffer und nachfolgend mit 500 µl AW2-Puffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte in 50 µl 70°C heißem TRIS-Puffer (10 mM; pH 7,6). Für die Isolation genomischer DNA aus den Brustkrebszelllinien BT20 und MDA-MB-231 wurden 5×10^6 Zellen trypsiniert, pelletiert und nachfolgend mit PBS resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch die Zugabe von 20 µl einer Proteinase K-Lösung (20 µg/ml) in 200 µl AL-

Puffer und einer Inkubation bei 56°C für 10 min. Es folgte ein fünfminütiger RNase A Verdau (20 Einheiten). Anschließend erfolgte die DNA-Isolation unter identischen Bedingungen wie die DNA-Isolation aus humanem Frischgewebe. Die eluierte DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.12.2 ISOLATION FREI ZIRKULIERENDER DNA AUS HUMANEM SERUM

Zell-freie, frei zirkulierende DNA (engl. *circulating free DNA*, cfDNA) wurde mittels des *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit* der Firma Qiagen (Hilden) aus humanen Seren von Brustkrebs-Patientinnen und unterschiedlichen Kontrollgruppen (siehe Abb. 2-1) gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Die Isolation der cfDNA erfolgte aus 1 ml Serum und basiert auf einer speziellen Silikon-basierten Membran, die für fragmentierte DNA, wie cfDNA im Serum, optimiert wurde. Die Serumproben wurden zunächst mit 100 µl Proteinase K (20 µg/ml) und 800 µl ACL-Lysepuffer versetzt und für 30 min bei 60°C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt diente zur Inaktivierung von DNasen und RNasen sowie der Entfernung cfDNA gebundener Proteine und Lipide. Der ACL-Lysepuffer wurde zusätzlich mit einer sogenannten Träger- (*carrier*) RNA versetzt, welche die Bindung der cfDNA an die Silikon-basierte Membran förderte (Shaw *et al.* 2009). Über eine Vakuum-Vorrichtung (Qiagen) wurde das inkubierte Serum-Puffer Gemisch auf die Säulen gebracht, währenddessen die cfDNA an die Membran immobilisiert wurde. Die an die Membran gebundene cfDNA wurde in drei Waschschritten von störenden Salzen befreit, in 35 µl AVE-Puffer eluiert und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.12.3 GESAMT-RNA ISOLATION AUS KRYOKONSERVIERTEM FRISCHGEWEBE UND HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN

Die Gesamt-RNA wurde mittels *TRIzol*®-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aus kryokonserviertem humanem Frischgewebe und den humanen Brustkrebszelllinien BT20 und MDA-MB-231 gemäß den Herstellerangaben isoliert. Hierzu wurden 50-100 mg Gewebe mit 1 ml *TRIzol*® homogenisiert, während für die RNA-Isolation aus Zelllinien 1 ml Reagenz pro 5×10^5 Zellen verwendet wurde. Das Homogenisat wurde zunächst 5 min bei RT inkubiert, um die Zelllyse einzuleiten und anschließend mit 200 µl Chloroform versetzt, invertiert und erneut 3 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation bei 12.000 rpm wurde die rote, organische Phase von der klaren anorganischen Phase getrennt (alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C und 12.000 rpm durchgeführt). Die obere klare Phase enthält die RNA und wurde vorsichtig in ein steriles, RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die RNA-Präzipitation wurde der Überstand mit 500 µl Isopropanol gemischt,

anschließend durch Zentrifugation sedimentiert und mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Abschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das RNA-Pellet leicht getrocknet. Die RNA-Resuspension erfolgte je nach Größe des RNA-Pellets in 10-30 µl DEPC-H₂O (Lagerung: -80°C).

2.12.4 PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Reinheit von Nukleinsäure-Präparationen kann UV-spektroskopisch bestimmt werden, indem man das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Die Messung erfolgte mittels des NanoDrop-ND1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Nach der Kalibrierung des Gerätes mit dem jeweiligen Elutionsmittel wurden 2 µl der Nukleinsäurelösung für die Bestimmung verwendet. Eine Extinktion von 1.0 bei E₂₆₀ entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Lichtabsorption von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm wird zur Bestimmung der DNA-Konzentration genutzt. Aromatische Aminosäuren absorbieren Lichtwellen bei 280 nm. Der Quotient OD 260 nm/OD 280 nm zeigt die Konzentration der Probe. Reine DNA besitzt einen Quotienten-Wert bei 1,8, reine RNA bei 2. Kleinere Werte weisen auf Kontamination mit Proteinen (aromatische Gruppen) und Phenol hin. Der Quotient OD 260nm/OD 230nm ist ein weiteres Maß für die Reinheit der Probe. Das Verhältnis sollte für reine DNA und RNA größer als 2,0 sein. Geringere Werte als 2,0 weisen auf Kontamination durch Zucker, Salze oder organische Lösungsmittel hin. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes mit:

$$c = E_{\lambda} / (l \times \alpha_{\lambda})$$

c: Konzentration [µg/ml]

E_λ: Extinktion bei der Wellenlänge λ

l: Weglänge des Lichts im Material [cm]

α: natürlicher molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ [l x mol⁻¹ x cm⁻¹].

2.12.5 REVERSE TRANSKRIPTION (CDNA-SYNTHESE)

Die enzymatische reverse Transkription von mRNA zu cDNA erfolgte mit dem *Promega Reverse Transcription System* (Promega, Mannheim) und wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Für die Synthese wurde 1 µg RNA in 8,9 µl DEPC-H₂O eingesetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 11,1 µl eines Komponenten-Mix bestehend aus 4 µl MgCl₂ [25 mM], 2 µl 10 x Reverse Transkriptase Puffer, 1 µl dNTP-Mix [je 10 mM], 40 U/µl RNase-Inhibitor, 160 pmol Oligo-dT-Nukleotide,

160 pmol Hexamer-Oligonukleotide und 25 U/μl AMV-RT. Es folgte ein 10-minütiger Inkubationsschritt bei RT, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation bei 45°C innerhalb dessen die cDNA-Synthese durch das Enzym AMV-Reverse-Transkriptase erfolgte. Abschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 95°C für 5 min inaktiviert. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bei -20°C. Bei einer vollständigen enzymatischen Umwandlung ergibt sich bei der eingesetzten mRNA Menge eine theoretische cDNA Endkonzentration von 10 ng/μl.

2.12.6 REAL-TIME POLYMERASE KETTENREAKTION (RT-PCR)

Die quantitative RT-PCR wurde erstmalig 1992 von Higuchi *et al.* entwickelt und ist heute die wohl am häufigsten genutzte Methode zur Expressions-Analyse von Genen (Higuchi *et al.* 1992). Mit Hilfe der RT-PCR lassen sich z.B. differenzielle mRNA-Expressionsmuster semiquantitativ erfassen, wodurch diese Methode eine wichtige Grundlage der onkologischen Forschung darstellt. Charakteristisch für die RT-PCR ist die Beobachtung einer Fluoreszenzreaktion durch fluoreszierende Farbstoffe oder Sonden, die während der Amplifikation in die dsDNA interkalieren oder im Fall von Sonden Sequenz-spezifisch hybridisieren. In dieser Arbeit wurde das Fluorochrom SYBR Green I verwendet, welches zu den asymmetrischen Cyanin Farbstoffen gehört. Durch die Interkalation von SYBR Green I in die kleine Rinne der dsDNA wird dessen Fluoreszenz im Gegensatz zu den freien Molekülen auf das 1000-fache gesteigert (Morrison *et al.* 1998; Wittwer *et al.* 1997). Der hieraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex wird durch blaues Licht bei $\lambda_{\max}=480$ nm angeregt und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{\max}=520$ nm. Die Fluoreszenz wird, bei gleich bleibender Produktgröße, demnach umso stärker, je mehr PCR-Produkt gebildet wird. Dadurch lässt sich die Zunahme des dsDNA-Produktes direkt und in Echtzeit (*Real-Time*) verfolgen. Der Vorteil der *Real-Time* PCR gegenüber einer normalen PCR besteht darin, dass die Zunahme der Fluoreszenz nach jeder Elongation gemessen werden kann. So kann während der gesamten Amplifikation direkt auf die Produktmenge geschlossen werden. Dies wiederum ermöglicht eine präzisere Quantifizierung der Expressionshöhe und eine höhere Zuverlässigkeit der Ergebnisse, als es bei einer konventionellen PCR der Fall ist. Die RT-PCR wurde mit dem *iQ5 SYBR Green I Mastermix* (Biorad) den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt (Tabelle 2-14).

Tabelle 2-14: Standardansatz einer *Real-time* PCR

| Komponenten | Volumina [μ l] |
|---|---------------------|
| SYBR Green I Mastermix [2x] | 10 |
| Primer <i>forward</i> [10 μ M] | 0,5 |
| Primer <i>reverse</i> [10 μ M] | 0,5 |
| DNA-Template[1ng/ μ l] | 1 |
| auf 20 μ l ddH ₂ O auffüllen | 8 |

Die Analyse der *ITIH5*-Genexpression sowie den *ITIH5*-assoziierten Zielgenen in MDA-MB-231- und BT20-Tumormodellen erfolgte nach Isolation der Gesamt-RNA aus den Zelllinien und anschließender cDNA-Synthese an dem *iCycler iQ5* (Biorad). Jede Probe wurde dabei in einem Dreifachansatz gemessen. Die Kalibrierung der zu ermittelnde cDNA-Menge erfolgte bei jeder Probe mit dem endogenen Referenzgen *Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)*. Als Negativkontrolle diente bei jedem Lauf ein Dreifachansatz mit ddH₂O. Tabelle 2-15 zeigt ein typisches Temperaturprofil einer RT-PCR.

Tabelle 2-15: Temperaturprofil einer *Real-time* PCR

| Schritt | Temperatur | Dauer | Anzahl |
|--|------------|-----------|--------|
| Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase | 95°C | 5 min | 1x |
| Denaturierung | 95°C | 15 sek | 40x |
| Primer-Hybridisierung | 60°C | 15 sek | |
| Elongation | 72°C | 20 sek | |
| Finale Elongation | 72°C | 30 sek | 1x |
| Schmelzkurve | 40-95°C | 10-20 min | 1x |

Analyse der *Real-time* PCR Daten

Für die quantitative Analyse der Proben müssen die spezifischen Kurven der Amplifikation bewertet werden. Jede Kurve besteht aus einer linearen Anfangsphase, in der keine Produkt-Akkumulation gemessen werden kann, einer frühen exponentiellen Phase, einer exponentiellen Phase und einer terminalen Plateau Phase (Tichopad *et al.* 2003) (Abb. 2-2). In der frühen exponentiellen Phase erreicht das Fluoreszenzsignal einen Schwellenwert, an dem die Menge der gebildeten Fluoreszenz signifikant höher als die Hintergrund-Fluoreszenz ist. Der Schnittpunkt, an dem der Schwellenpunkt die Fluoreszenzkurve schneidet, wird als C_T - (*Cycle threshold*) Wert oder C_P - (*Crossing point*) Wert bezeichnet. Die C_T -Werte verringern sich linear mit einer steigenden Target-Quantität. Daher kann der C_T -Wert zur quantitativen Messung der eingesetzten cDNA-Menge genutzt werden, wobei nicht die absolute Menge an PCR-Produkt detektiert wird, sondern es wird die logarithmisch lineare Reaktionskinetik der PCR-Reaktion genutzt. Das bedeutet, dass die Fluoreszenzdifferenz zwischen zwei gemessenen Zeitpunkten bestimmt wird. In der exponentiellen Phase erreicht die PCR eine

Amplifikations-Periode, in der das PCR-Produkt im Optimalfall nach jedem Zyklus verdoppelt wird. Im Verlauf der PCR-Reaktion kommt es zu einem limitierenden Einfluss essenzieller Reaktionskomponenten wie den Nukleotiden, den Oligonukleotiden und der DNA-Polymerase, infolgedessen die terminale Plateauphase erreicht ist, die Rate der DNA-Neusynthese geringer wird und letztendlich zum Erliegen kommt. Um die C_T -Werte von verschiedenen, biologischen Proben (z.B. Normal- und Tumorgewebe) in einen quantitativen Bezug setzen zu können, ist es notwendig, diese auf eine Referenz zu normalisieren. Das Referenzgen *GAPDH* diente in allen durchgeführten Analysen zur Kalibrierung der eingesetzten cDNA-Menge.

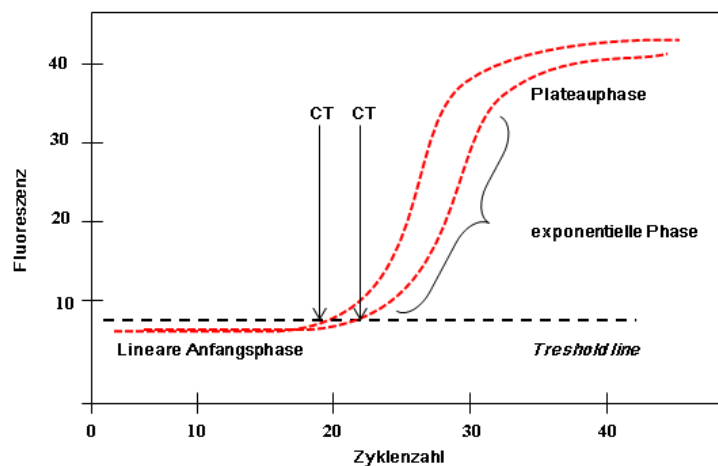


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des typischen Kurvenverlaufs einer *Real-time PCR*. In der linearen Anfangsphase bleibt die Fluoreszenz der Proben auf dem Niveau der Hintergrund-Fluoreszenz und eine Messung ist noch nicht möglich. In der frühen exponentiellen Phase übersteigt die Fluoreszenz der Probe erstmalig die Hintergrund-Fluoreszenz, in Folge dessen für jede Probe der charakteristische C_T -Wert ermittelt wird. Dabei gilt je mehr Ausgangs-Template in der Probe vorhanden war, desto niedriger ist der C_T -Wert. In der exponentiellen Phase kommt es unter optimalen Bedingungen zu einer exponentiellen Verdopplung der cDNA. Die Plateauphase ist erreicht, wenn aufgrund der Limitierung von dNTPs, Primer, Polymerase die DNA-Neusyntheserate zum Erliegen kommt.

Die Berechnung der *ITIH5*-Genexpression sowie die Expression der *ITIH5*-assoziierten Zielgene erfolgte mit der komparativen C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) Methode, wobei die relative Genexpression als Differenz zwischen Zielgen und Referenzgen berechnet wird:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Bestimmung der ΔC_T -Differenz ($\Delta\Delta C_T$) zwischen zwei Proben:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe1} - \Delta C_T \text{ Probe2}$$

Die vergleichende Quantifikation (Fink et al., 1998):

$$\text{Expressionstärke} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

(Der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ bezeichnet den *Fold Change* (FC) der differentiellen Expression)

Schmelzkurvenanalyse

Das genutzte *SYBR Green I* besitzt keine Sequenzspezifität und interkaliert oft unspezifisch in dimere Primer-Sequenzen. Um eine Spezifizierung der amplifizierten Produkte vornehmen zu können, muss eine Schmelzkurvenanalytik für jede Probe folgen. Bei der Analyse kommt es zu einer kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 40°C auf 95°C mit abrupter Fluoreszenzabnahme vermittelt durch die Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Anhand der simultanen Messung der freigesetzten Fluoreszenz wird die Schmelzpunkttemperatur ermittelt, die vom GC-Gehalt und der Basenpaar-Länge entsprechender Produkte abhängig ist. So ist es möglich die spezifischen Produkte von möglicherweise unspezifischen dimeren Primer-Sequenzen zu unterscheiden. Im Zuge der Etablierung einer *Real-Time PCR* für ein bestimmtes Primer-Paar ist eine zusätzliche elektrophoretische Auftrennung des PCR-Ansatzes, zum Vergleich mit der spezifischen Schmelzkurve und der korrespondierenden Produktgröße, notwendig.

2.12.7 BISULFIT-UMWANDLUNG GENOMISCHER DNA AUS HUMANEM GEWEBE UND SERUM

Methylcytosin, auch als die „fünfte Base“ im Genom bekannt, lässt sich durch molekularbiologische Standardmethoden wie die Sequenzierung nach Sanger oder konventionellen PCR-Methoden nicht nachweisen. Allerdings ist es möglich, die genomische DNA durch eine Behandlung mit Bisulfit in ihrer Primärsequenz so zu verändern (Frommer *et al.* 1992), dass ein Nachweis von Methylcytosin in einer methylierungsspezifischen PCR ermöglicht wird. Die Bisulfit-Konversion erzeugt einen C/T-Polymorphismus, dessen Quantifizierung ein Maß für den ursprünglichen Methylierungsgrad an dieser Position ist. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass einzelsträngig vorliegende unmethylierte Cytosin-Basen durch eine Behandlung mit Natriumbisulfit (NaHSO_3) zu der Base Uracil desaminiert werden. Im Gegensatz dazu sind methylierte Cytosin-Basen gegen eine Konversion mittels Bisulfit resistent. Abbildung 2-3 zeigt die chemischen Schritte einer Bisulfit-Konversion.

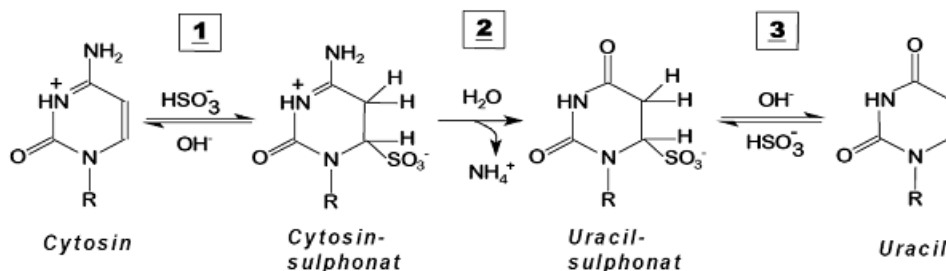


Abbildung 2-3: Die Bisulfit-vermittelte Umwandlung von Cytosin zu Uracil verläuft in drei Schritten: 1) Reversible Addition von Natriumbisulfit an Cytosin (Sulfonierung). 2) Hydrolytische Desaminierung 3) alkalische Desulfonierung (Hayatsu 2008).

Die Bisulfit-Konversion genomischer Gewebe- und Serum-DNA wurde mit dem *ZR DNA Methylation Kit* der Firma Zymo Research (Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 500 ng genomische DNA in einem entsprechenden Volumen an H₂O aufgenommen, so dass der Ansatz insgesamt 45 µl enthielt. Dieser wurde mit 5 µl M-Dilution-Puffer versetzt und bei 37°C für 15 min inkubiert. Der Inkubationsschritt führt zur Denaturierung der DNA im alkalischen Milieu. Währenddessen wurde das CT-Konversions-Reagenz gemäß den Herstellerangaben mit 750 µl H₂O und 210 µl M-Dilution-Puffer versetzt und unter Schütteln vollständig gelöst. Nach Zugabe von 100 µl CT-Konversions-Reagenz erfolgt während einer unter Lichtentzug 12 bis maximal 16-stündigen Inkubation bei 50°C in leicht saurem Milieu (pH 5) die Sulfonierung der Cytosine am C6-Atom (Cytosinsulphonat). Im Anschluss daran kommt es zu einer spontanen Hydrolyse der Aminogruppe am C4-Atom, welches in der Bildung von Uracilsulfonat resultiert. Nachfolgend erfolgte eine Abkühlung der Proben für 10 min auf Eis und einer anschließenden Vermischung der Proben mit 400 µl M-Bindungs Puffer. Das Gemisch wurde auf eine entsprechende Säule pipettiert, für 30 sek bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die genomische DNA, die nun an der Säule gebunden war, wurde mit 200 µl Wasch-Puffer behandelt, nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurde die Säulenmembran mit 200 µl M-Desulfonierungs-Puffer versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Unter diesen basischen Bedingungen kommt es zur alkalischen Desulfonierung der entstandenen Uracilsulfonate. Im Folgenden wurde die Membran zweimalig mit 200 µl M-Wasch-Puffer gewaschen und jeweils für 30 sek bei 13.000 rpm zentrifugiert. Abschließend wurden 22 µl M-Elutions-Puffer auf die Säule gegeben, diese für 1 min inkubiert und der Ansatz bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die eluierte Bisulfit-DNA wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Bisulfit-Konversion genomischer DNA resultiert in einer Veränderung der DNA-Primärsequenz. Alle unmethylierten Cytosin-Basen liegen nun als Uracil vor und werden in einer PCR-Amplifikation als Thymin in die DNA-Sequenz eingebaut. Erkannt wird die veränderte Sequenz von spezifischen Primern für die methylierte und unmethylierte DNA innerhalb der methylierungsspezifischen PCR (MSP).

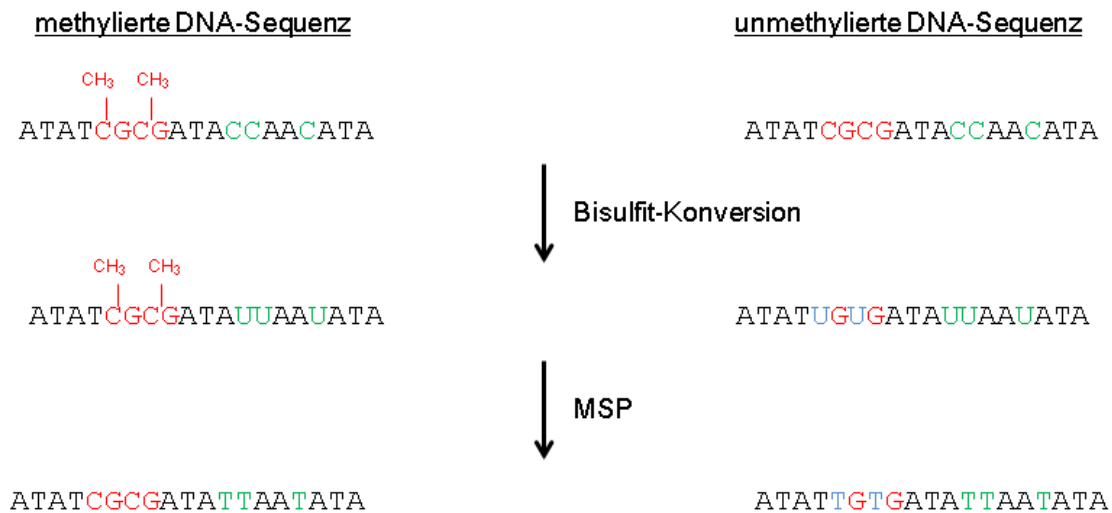


Abbildung 2-4: Prinzip der Sequenzänderung durch die Bisulfit-Konversion und die MSP. Durch die Bisulfit-Behandlung werden unmethylierte Cytosine zu Uracil umgewandelt (blau), während methylierte Cytosine gegen die Umwandlung resistent sind (rot). Zusätzlich werden alle Cytosine, welche nicht in der palindromischen Abfolge Cytosin-Phosphat-Guanin vorkommen, zu Uracil konvertiert (grün), da eine Methylierung außerhalb von CpG-Dinukleotiden selten vorkommt. In der MSP werden sequenzspezifische Oligonukleotide für die methylierte und unmethylierte Bis-DNA eingesetzt. Dabei wird statt der Base Uracil die Base Thymin in die Amplifikate eingebaut.

2.12.8 METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (MSP)

Die methylierungsspezifische PCR (MSP) wurde nach einer Methode von Herman *et al.* durchgeführt (Herman *et al.* 1996). Die PCR-Amplifikation der gewünschten Zielsequenz erfolgte in zwei getrennten Ansätzen. Ein Ansatz war spezifisch für die methylierte Sequenz (M-Primer), der andere Ansatz für die unmethylierte Sequenz (U-Primer). Sowohl der U- als auch der M-Primer sollten denselben Sequenzabschnitt amplifizieren, damit ein Vergleich zwischen unmethylierter und methylierter DNA später möglich ist. Die MSP wurde mit einem speziellen Puffer durchgeführt (Galm & Herman 2005), der für diese PCR-Methode optimiert wurde. Nachdem ein entsprechender Komponenten-Mix für jede zu untersuchende DNA-Probe in die PCR-Reaktionsgefäße vorgelegt wurde (Tab. 2-16), konnte die DNA hinzupipettiert werden. Die Proben wurden anschließend mit 2 Tropfen Mineralöl überschichtet. Die MSP wurde als *Hot Start*-PCR durchgeführt, um unerwünschte Amplifikationen während der initialen Denaturierung der DNA zu verhindern. Die *Taq*-Polymerase wurde folglich erst nach dem 1. PCR Schritt mit 1,25 Einheiten in 5 µl H₂O pro PCR-Probe hinzugefügt. Ein typisches MSP-Temperaturprofil zeigt Tabelle 2-17. Die MSP wurde in dieser Studie für die qualitative Analyse des Promotormethylierungsstatus von potentiellen Kandidatengenen zwischen Normal- und Tumorseren des Testkollektivs eingesetzt.

Tabelle 2-16: Standardansatz einer methylierungsspezifischen PCR

| Komponenten | Volumina [μ l] |
|--|---------------------|
| MSP-Puffer [10x] | 2,5 |
| dNTPs [je 25 mM] | 1,25 |
| Primer <i>forward</i> (U bzw.M) [10 μ m] | 0,5 |
| Primer <i>reverse</i> (U bzw.M) [10 μ m] | 0,5 |
| Bisulfit-konvertierte Template DNA [20 ng] | 1 |
| auf 20 μ l ddH ₂ O auffüllen | 14,25 |

Tabelle 2-17: Temperaturprofil einer methylierungsspezifischen PCR

| Schritt | Temperatur | Dauer | Anzahl |
|-----------------------------------|------------|----------|--------|
| Initiale DNA-Denaturierung | 95°C | 5 min | 1x |
| Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase | 80°C | 5 min | 1x |
| Denaturierung | 95°C | 30 sek | |
| Primer-Hybridisierung | 59-64°C | 30 sek | 38x |
| Elongation | 72°C | 30 sek | |
| Finale Elongation | 72°C | 10 min | 1x |
| Kühlen | 4°C | ∞ | |

2.12.9 QUANTITATIVE METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (qMSP)

Die MSP ist eine konventionelle Methode zur qualitativen Analyse des Methylierungsprofils klinischer Proben. Aufgrund des qualitativen methodischen Hintergrunds ist die Differenzierung zwischen einem geringen und einem hohen Methylierungslevel nur bedingt möglich. Zudem ist die Reproduzierbarkeit gering methylierter Proben nicht gewährleistet, wodurch ein möglicher klinischer Einsatz der qualitativen MSP im Hinblick auf die Qualität und die Sicherheit der zu Grunde liegenden Untersuchung bedenklich ist. Die quantitative Messung des Methylierungsgrad zeigt eine bessere Reproduzierbarkeit und eine klare Darstellung des Methylierungsgrad (Eads *et al.* 2000).

Die quantitative methylierungsspezifische PCR (qMSP) basiert auf dem Prinzip der quantitativen *Real-time* PCR, die in einer Echtzeit-Fluoreszenzreaktion die Zunahme des Doppelstrang-DNA-Produktes zeigt. In dieser Arbeit wurden für die qMSP spezifische Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden eingesetzt. Die Oligonukleotide und die Sonden wurden dabei speziell für methylierte Bisulfit-konvertierte DNA entworfen. Die Sonden sind mit einem Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein, 6-FAM) und einem Quencher (*Black Hole Quencher*, BHQ-1) markiert. 6-FAM ist ein Reporter-Farbstoff, der kovalent an das 5'-Ende der Sonde hybridisiert vorliegt und für das Farbsignal der Reaktion verantwortlich ist. Die Anregungswellenlänge von 6-FAM liegt bei 495 nm, die Emissionswellenlänge bei 517 nm. Der *Quencher*, der kovalent an das 3'-Ende der Sonde hybridisiert ist, „dämpft“ die Reporter-Fluoreszenz. Die Anregung des Reporters einer intakten Sonde führt zu einem

Fluoreszenz-Energietransfer (FET), dessen emittierte Energie aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher absorbiert und unterdrückt wird. Hybridisiert die Sonde während der exponentiellen Phase an ihre komplementäre DNA-Sequenz, wird sie über die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der eingesetzten DNA-Polymerase abgebaut. Durch die Sonden-Hydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und *Quencher* unterbrochen und die Fluoreszenz steigt proportional zum gebildeten Amplifikat an. Die qMSP wurde mit dem *IQTM Supermix* (BioRad) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt (Tabelle 2-18).

Tabelle 2-18: Standardansatz einer quantitativen methylierungsspezifischen PCR

| Komponenten | Volumina [μ l] |
|---|---------------------|
| <i>IQTM Supermix</i> | 12,5 |
| Primer <i>forward</i> [10 μ M] | 0,75 |
| Primer <i>reverse</i> [10 μ M] | 0,75 |
| Sonde [10 μ M] | 0,5 |
| DNA-Template [20 ng/ μ l] | 1 |
| auf 25 μ l ddH ₂ O auffüllen | 9,5 |

Die Analyse der Serumproben des Validierungskollektivs erfolgte nach Isolation der cfDNA und Bisulfit-Konversion an dem *iCycler iQ5* (Biorad). Tabelle 2-19 zeigt ein typisches Temperaturprofil einer qMSP.

Tabelle 2-19: Temperaturprofil quantitativen methylierungsspezifischen PCR

| Schritt | Temperatur | Dauer | Anzahl |
|--|------------|--------|--------|
| Aktivierung der <i>Taq</i> -Polymerase | 95°C | 10 min | 1x |
| Denaturierung | 95°C | 15 sek | 50x |
| Primer-Hybridisierung und Elongation | 60-66°C | 30 sek | |
| Finale Elongation | 72°C | 30 sek | 1x |

Jede Probe wurde dabei in einem Dreifachansatz gemessen. Die Normalisierung der eingesetzten Bisulfit-DNA-Menge erfolgte bei jeder Probe mit dem Referenzgen Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*). Zudem wurde auf jeder Platte *in vitro* methylierte humane Leukozyten-DNA als Positivkontrolle und unbehandelte humane Leukozyten-DNA als Negativkontrolle für die methylierte DNA mitgeführt. Als zusätzliche Negativkontrolle diente bei jedem Lauf ein Dreifachansatz mit ddH₂O.

Analyse der qMSP Daten

Bei der qMSP wird, identisch zur qPCR, ein C_T-Wert ermittelt, sobald die gebildete Fluoreszenz die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant übersteigt. Die C_T-Werte verringern sich

dabei linear mit einer steigenden Methylierungsrate. Der Anteil methylierter DNA, der PMR-Wert, wird in Prozent berechnet.

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Bezug zur eingesetzten Kontrolle (*in vitro* methylierte *SssI* Leukozyten-DNA):

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ Zielgen} - \Delta C_T \text{ Kontrolle}$$

Der PMR- (*percentage of methylated reference*) Wert (Ogino *et al.* 2006):

$$\text{PMR-Wert} = 2^{-\Delta \Delta C_T} * 100$$

2.12.10 ANALYTISCHE EFFIZIENZ DER QMSP-TESTS

Bevor potentielle Biomarker für einen Blut-basierten Früherkennungstest in Betracht gezogen werden können, ist die Bestimmung und Optimierung der analytischen Sensitivität (Nachweisgrenze eines Methylierungs*assay*) und der analytischen Spezifität (Fähigkeit eines Methylierungs*assay*, nur die gesuchte Methylierung zu erfassen) essenziell. Dazu wurde in dieser Arbeit Leukozyten-DNA von gesunden Probanden *in vitro* mit der *SssI* (CpG) Methyltransferase (New England Biolabs) methyliert und im Anschluss zur Testung der analytischen Sensitivität von jedem *Assay* in definierten Konzentrationen mit unmethylierter DNA verdünnt.

2.12.10.1 ISOLATION VON LEUKOZYTEN-DNA AUS VOLLBLUT

Die Erstellung einer Verdünnungsreihe für die qMSP (siehe 2.12.9) verlangte die Isolation von Leukozyten aus Vollblut sowie eine darauffolgende Isolation leukozytärer DNA. Zunächst wurden pro freiwilligem gesunden Spender 30 ml Vollblut in EDTA-Monovetten entnommen und auf zwei 50 ml Falcon-Gefäße verteilt. Die Gefäße wurden im Folgenden mit Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2-5) auf 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten unter Lichtentzug inkubiert. Im Anschluss wurden das Blut-Lysepuffer-Gemisch für 5 Minuten bei 1.200 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen sowie das Zellpellet mit 50 ml Lysepuffer resuspendiert und nochmals 10 Minuten unter Lichtentzug inkubiert. Abschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (5 min, 1.200 rpm), nachdem das Zellpellet entweder bei -20°C eingefroren oder direkt die DNA-Isolation durchgeführt werden konnte. Die Isolation der leukozytären DNA erfolgte im Anschluss unter identischen Bedingungen wie die DNA-Isolation aus humanem Frischgewebe (Kapitel 2.12.1).

Ein Teil der isolierten Leukozyten-DNA diente als unmethylierte Kontrolle (U-Kontrolle) für die qMSP, während der andere Teil *in vitro* methyliert werden sollte, um als methylierte Kontrolle (M-Kontrolle) zu dienen.

2.12.10.2 *IN VITRO* DNA-METHYLIERUNG

Für den Methylierungsansatz wurde die CpG Methyltransferase *M.SssI* (New England BioLabs (NEB), Ipswich, England) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Enzym methyliert alle C5-ständigen Cytosin-Reste innerhalb der doppelsträngigen Dinukleotid-Erkennungssequenz 5'...CG...3' (Renbaum *et al.* 1990) und wurde ursprünglich von einem *E. coli* Bakterienstamm isoliert, der das Methyltransferase-Gen von *Spiroplasma* sp. (Stamm MQ-1) besitzt (Matsuo *et al.* 1994). Für die Übertragung der Methylierung benötigt die *M.SssI*-Methyltransferase das Substrat S-Adenosylmethionin (SAM). SAM besitzt eine chemisch reaktive Methylgruppe (CH₃) verknüpft an einem Schwefelatom, wodurch in einer Transmethylierungsreaktion die CH₃-Gruppe an ein Akzeptor-Substrat übertragen werden kann. Insgesamt wurden 50 µg Leukozyten-DNA methyliert werden. Tabelle 2-20 zeigt die Zusammensetzung eines Standardansatzes für die *in vitro* DNA-Methylierung.

Tabelle 2-20: Standardansatz einer *in vitro* DNA-Methylierung

| Komponenten | Volumina [µl] |
|---|---------------|
| 10 x NEB Puffer 2 | 50 |
| SAM 32 mM | 10 |
| <i>SssI</i> Methyltransferase (20 U/µl) | 12,5 |
| Leukozyten-DNA (50µg) | 104,6 |
| auf 500µl ddH ₂ O auffüllen | 322,9 |

Dieser Ansatz musste für 3,5 Stunden bei 37°C inkubiert werden. Im Anschluss wurde die *in vitro* Methylierungsreaktion durch eine 20-minütige Erhitzung auf 65°C abgestoppt. Die notwendige Aufreinigung der *in vitro* methylierten Leukozyten-DNA erfolgte mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit* der Firma Qiagen, den Herstellerangaben entsprechend. Um die DNA-Bindekapazität der Säulen nicht zu überschreiten, wurde der Ansatz auf 10 1,5 ml Reaktionsgefäß mit jeweils 50 µl DNA und 250 µl *PBI-Puffer* aufgeteilt und auf die Säulen überführt. Nach einminütiger Zentrifugation (13.000 rpm) wurde der Durchfluss verworfen und 750 µl PE-Puffer zum Waschen auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Abschließend erfolgte die Elution der gebundenen *in vitro* methylierten Leukozyten-DNA mit 70°C warmen EB-Puffer.

2.12.10.3 VERDÜNNUNGSREIHE UND *SPIKING*-EXPERIMENT

Die *in vitro* methylierte DNA diente zur Erstellung einer Verdünnungsreihe, die zur Testung der analytischen Effizienz eingesetzt wurde. Dabei konnten definierte Verdünnungsstufen von 500 ng bis 0 ng *in vitro* methylierter DNA mit unmethylierter Leukozyten-DNA (Tabelle 2-

21) hergestellt und im Anschluss an die Verdünnung einer Bisulfit-Behandlung unterzogen werden.

Tabelle 2-21: Konzentrationen der eingesetzten Leukozyten-DNA für die Verdünnungsreihe

| Methylierungsanteil [%] | Konz. U [ng] | Konz. M [ng] | Konz. M [ng/μl] |
|----------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| 100 | 0 | 500 | 25 |
| 50 | 250 | 250 | 12,5 |
| 30 | 350 | 150 | 7,5 |
| 20 | 400 | 100 | 5 |
| 10 | 450 | 50 | 2,5 |
| 5 | 475 | 25 | 1,25 |
| 1 | 495 | 5 | 0,25 |
| 0,1 | 499,5 | 0,5 | 0,025 |
| 0 | 500 | 0 | 0 |

Konz: Konzentration; U: unmethylierte Leukozyten-DNA; M: *in vitro* methylierte Leukozyten-DNA.

Eine hohe analytische Spezifität war erreicht, wenn der *Assay* keine Methylierung in den Verdünnungsstufen ohne methylierte Bis-DNA aufwies. Weiterhin wurde ein sogenanntes *Spiking*-Experiment durchgeführt. In Anlehnung an die Verdünnungsreihe wurden hier ebenfalls definierte Konzentrationen *in vitro* methylierter DNA (250 pg bis 10 pg) in 1 ml Serum gesunder Probandinnen gebracht, die cfDNA isoliert und diese anschließend einer Bisulfit-Konversion unterzogen. Dieser Versuch sollte die „DNA-Mengen-Situation“ in Seren von Brustkrebs-Patientinnen widerspiegeln und zeigen, ob die Kandidatengen-spezifischen *Assays* in der Lage sind, geringe Mengen methylierter DNA in einem sehr hohen Hintergrund unmethylierter DNA in den Serumproben spezifisch zu detektieren.

Neben einer hohen analytischen Spezifität und Sensitivität muss ein Test für eine mögliche klinische Nutzung stabil und reproduzierbar die DNA-Methylierung messen. Daher wurden die in dieser Studie evaluierten *Assays* hinsichtlich ihres Korrelationskoeffizienten (r^2) (lineare Regressionsanalyse) innerhalb verschiedener Messungen identischer Proben beurteilt. Ein sensitiver und verläSSLicher Assay sollte einen hohen Korrelationskoeffizienten ($r^2 > 0,95$) besitzen, d.h. die prozentuell ermittelten Methylierungswerte der Verdünnungsreihe (PMR-Werte, engl. *percentage of methylated reference*) müssen einen hohen linearen Zusammenhang zu den erwarteten Werten der Verdünnungsreihe aufweisen.

2.12.11 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Amplifizierte PCR-Produkte können über eine Agarose Gelelektrophorese visualisiert werden. Dabei wird die negative Ladung der DNA, basierend auf dem Phosphatrückgrat, für die Auftrennung spezifischer DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode genutzt. Die

Agarose stellt dabei ein molekulares Sieb dar, indem die Laufgeschwindigkeit der Nukleinsäuren auf Grund des Siebeffekts umgekehrt proportional zu dem Logarithmus der Molekülgröße ist. Dem Gel wird der Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, welcher in die DNA interkaliert und diese dann über UV-Licht sichtbar macht. Je nach Molekülgröße werden Agarosegele in unterschiedlicher Konzentration benötigt. Hochmolekulare Moleküle werden optimal in höher prozentigen Gelen aufgetrennt, während für die Auftrennung von niedrigmolekularen Molekülen Gele zwischen 1%-2% besser geeignet sind. Die Agarose wurde entsprechend in 1xTBE Puffer hergestellt. Die Lösung wurde aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde die Agarose unter Rühren auf RT abgekühlt und das Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Diese Mischung wurde in eine Gelkammer gegossen und ein entsprechender Gelkamm eingesetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Laufkammer überführt und mit Ethidiumbromid-haltigem 1xTBE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel maximal 1 mm mit Puffer überschichtet war. PCR-Proben wurden 1:5 mit farblich markiertem Ladepuffer versetzt. Ein DNA-Längenstandard und die PCR-Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese für 30-60 min bei einer Feldstärke von 5 Volt/cm durchgeführt. Zur Sichtbarmachung von DNA-Banden wurde das Gel anschließend in einer Gel-Dokumentationseinheit (MWG Biotech AG, Ebersberg) fotografiert.

2.12.12 QUANTITATIVE ANALYSE DER DNA-METHYLIERUNG MITTELS DER PYROSEQUENZIERUNG

Die Methode der DNA-Pyrosequenzierung (Ronaghi *et al.* 1996; Ronaghi *et al.* 1998) wurde in den 1990er Jahren am *Royal Institute of Technology* (Stockholm, Schweden) entwickelt und stellt im Vergleich zu der klassischen Bisulfit-Sequenzierung ein recht neues, kostengünstiges und effizientes Hoch-Durchsatz-Verfahren zur Methylierungsanalytik dar (Tost *et al.* 2003). Statt eines ausgewählten kurzen Amplikon-Bereiches, welcher nur wenige CpG-Einheiten abdeckt, wie etwa bei der qualitativen MSP-Methylierungs-Analyse, kann durch die Pyrosequenzierung Bisulfit-behandelter DNA der Methylierungsstatus jeder einzelnen CpG-Einheit im Genpromotor bestimmt werden und somit DNA-Methylierungsmuster quantitativ analysiert werden (Colella *et al.* 2003).

Die Methode beruht auf einer enzymatischen Kaskade der Enzyme DNA *Taq*-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase sowie der Substrate Adenosinphosphosulfat (APS) und Luciferin. Innerhalb der enzymatischen Reaktionen wird Licht erzeugt, welches proportional zu der Menge an inkorporierten Nukleotiden ist (Abb. 2-5).

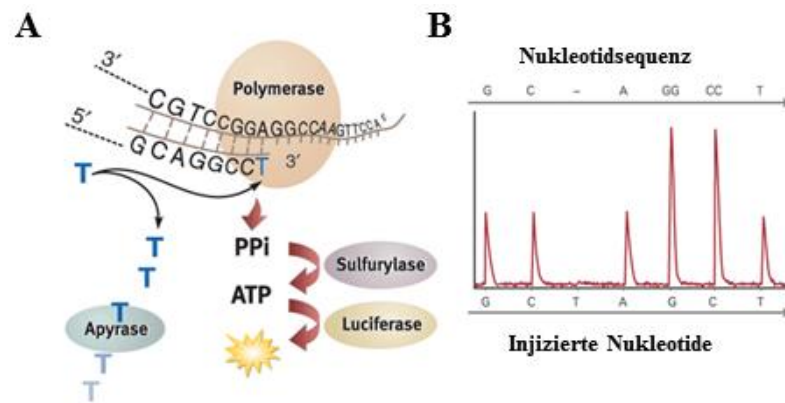


Abbildung 2-5: Schematischer Reaktionsablauf einer Pyrosequenzierung. (A) Die Pyrosequenzierung analysiert Einzelstrang DNA-Sequenzen durch die Synthese komplementärer DNA-Stränge. Erfolgreich eingebaute Nucleotide setzen inorganisches Pyrophosphat frei (PPi), welches innerhalb einer enzymatischen Reaktion unter ATP-Verbrauch durch die Enzyme Sulfurylase und Luciferase zu Licht umgewandelt wird. Die Quantität der Licht-Emission ist proportional zu der Menge an eingebauten Nucleotiden. Nicht eingebaute Nucleotide werden durch das Enzym Apyrase degradiert. (B) Die Ordinate zeigt das relative Lichtsignal, welches sich nach Injektion der einzelnen Nucleotide (Abszisse) im Falle der gezeigten Beispielsequenz ergibt. Ein doppelter Peak nach Injektion eines dGTP signalisiert zwei aufeinanderfolgende Guanin Basen. Die injizierte Base dTTP erzeugt kein Lichtsignal, da an dieser Stelle nicht die komplementäre Base Adenin im Matrizenstrang vorliegt (verändert: nach Robert England & Monica Pettersson 2005).

Die enzymatische Kaskade beginnt mit der Verknüpfung von Desoxyribonucleosidtriphosphat (dNTP) innerhalb des DNA-Strangs. Ist die Base komplementär zur eingesetzten Template-DNA, katalysiert die *Taq*-Polymerase, unter Freisetzung einer äquimolaren Menge an inorganischem Pyrophosphat (PPi), den Einbau des Nucleotids. Das freigesetzte PPi wird durch eine ATP-Sulfurylase in Anwesenheit von Adenosin 5'-Phosphosulfat (APS) zu ATP umgewandelt. Freigesetztes ATP steuert eine Luciferase vermittelte Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin, welche sichtbares Licht in einer Menge proportional zu der Menge an ATP produziert. Eine CCD-Kamera detektiert das Licht, welches innerhalb der Luziferase katalysierten Reaktion freigesetzt wird, und stellt es als Lichtsignal (*Peak*) in einem Pyrogramm dar. Die Höhe eines jeden *Peaks* ist proportional zu der Menge an eingebauten Nucleotiden. Ist das injizierte Nucleotid nicht komplementär zum Matrizenstrang, wird dieses nicht eingebaut und ein Lichtsignal bleibt folglich aus. Apyrase, ein Nucleotid degradierendes Enzym, beseitigt nicht eingebaute Nucleotide sowie überschüssiges ATP. Sobald die Enzym-katalysierte Degradierung beendet ist, werden erneut Nucleotide injiziert.

Die Analyse des Methylierungsgrades einzelner CpG-Dinucleotide wird durch die spezifische Abfolge injizierter Nucleotide ermöglicht: nach einem dCTP folgt immer ein dTTP, wobei ein Lichtsignal durch dCTP auf eine ursprünglich methylierte Cytosin-Base, ein Lichtsignal durch dTTP auf eine ursprünglich unmethylierte Cytosin-Base hinweist. Aufgrund der Proportionalität der Lichtsignale zur Anzahl der eingebauten Nucleotide kann das

Verhältnis dieser beiden Signale genutzt werden, um den Methylierungsgrad des betreffenden Cytosins zu ermitteln.

DNA-Amplifikation für die Pyrosequenzierung

Für die Pyrosequenzierung musste die zu analysierende Bisulfit-behandelte DNA zunächst in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden. Die PCR wurde mit dem *PyroMark PCR Kit* der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Kit ermöglicht eine für die Pyrosequenzierung optimierte PCR-Amplifikation der eingesetzten Template-DNA. Aufgrund der Umwandlung von unmethylierten Cytosinen in die Base Uracil und dem daraus resultierenden Einbau von Thymin in das PCR-Amplifikat, verliert die DNA an Komplexität, da sie hauptsächlich aus drei Basen besteht. Somit stellt die Bisulfit-behandelte DNA ein anspruchsvolles PCR-Template dar. Das *PyroMark PCR Kit* basiert auf einer optimierten PCR-Lösung, welche durch die Kombination aus KCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und MgCl_2 eine stringente Bedingung für die Primerbindung gewährleistet. Die Ausbildung von unspezifischen Produkten wird weitgehend reduziert. Die *HotStar Taq DNA- Polymerase*, die ebenfalls in der PCR-Lösung enthalten ist, wurde modifiziert. Die Polymerase wird erst durch einen 15-minütigen Inkubationsschritt bei 95°C aktiviert, wodurch die Bildung von unspezifischen Produkten und dimeren Primer-Sequenzen bei geringer Temperatur verhindert wird. Zudem enthält das Kit ein *CoralLoad Concentrate*, welches zu der PCR-Reaktion gegeben wird und den direkten Auftrag des PCR-Produktes auf ein entsprechendes Agarosegel ermöglicht (Volumina der Komponenten siehe Tab. 2-22).

Die für die Pyrosequenzierung eingesetzten Primer wurden mit Hilfe der *PSQ Assay Design Software* der Firma Qiagen (Hilden) abgeleitet und der *sense-* bzw. *anti-sense* Primer lag je nach Sequenzierungs-Richtung am 5'-Ende biotinyliert vor, um eine Einzelstrangaufftrennung nach der PCR-Amplifikation zu ermöglichen. Über das Biotin bindet die amplifizierte DNA an spezielle Streptavidin *Sepharose High Performance Beads* (GE Healthcare) und kann somit für die Pyrosequenzierungsreaktion immobilisiert werden. Die PCR wurde mit 45 Zyklen durchgeführt (Tab. 2-23).

Tabelle 2-22: Standardansatz einer Prä-Pyro-PCR

| Komponenten | Volumina [µl] |
|---------------------------------------|----------------------|
| Prä-PCR-Mix [5x] | 12,5 |
| Primer <i>forward</i> [10µM] | 0,5 |
| Primer <i>reverse</i> [10µM] | 0,5 |
| CoralLoad Konzentrat | 2,5 |
| DNA-Template [10 ng/µl] | 1 |
| auf 25µl ddH ₂ O auffüllen | 8 |

Tabelle 2-23: Prä-PCR Standardprogramm für das Gen *NDRG2*

| | Schritt | Temperatur | Dauer | Anzahl |
|---|-----------------------|------------|--------|--------|
| Initiale DNA-Denaturierung und Aktivierung der Polymerase | | 95°C | 15 min | 1x |
| | Denaturierung | 95°C | 30 sek | |
| | Primer-Hybridisierung | 56°C | 30 sek | 45x |
| | Elongation | 72°C | 30 sek | |
| | Finale Elongation | 72°C | 30 sek | 1x |

Nach der PCR-Reaktion wurden 3 µl des Amplifikats auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Spezifität der Amplifikation überprüft. Amplifikate wurden nur dann weiter verwendet, wenn in der Gelelektrophorese lediglich eine spezifische Bande erkennbar war.

Ablauf der Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung erfolgte mit dem *PyroMark Q96 MD* Gerät der Firma Qiagen. Alle notwendigen Reagenzien mussten vor dem Gebrauch auf RT erwärmt werden. Die amplifizierten DNA-Proben (20 µl) wurden zunächst mit 20 µl Pyrophosphat-freiem HPLC-Wasser (Merck) versetzt und in eine *PSQ 96* Mikrotiterplatte (Qiagen) überführt. Jede Probe wurde anschließend mit 35 µl *PyroMark Binding-Puffer* (Qiagen) und 5 µl *Streptavidin Sepharose High Performance Beads* (GE Healthcare) vermischt. Die Beads mussten vor Gebrauch gut resuspendiert werden, um eine optimale Verteilung dieser zu gewährleisten. Nachfolgend wurden die Proben mit den Beads 5-10 min bei 1.400 rpm geschüttelt. Dabei binden die biotinylierten DNA-Proben an die mit Streptavidin beschichteten Sepharose Beads. Während der Inkubationszeit erfolgte die Vorbereitung der *PyroMark Q96 MD* Arbeitsstation. Hier musste eine bestimmte Abfolge an Arbeitsschritten eingehalten werden. Dazu wurde der Filterträger nach Anlegen eines Vakuums zuerst für 20 sek in Pyrophosphat-freiem HPLC-Wasser (Merck) gewaschen und die Filterköpfe nach einer Invertierung um 90° bei Unterdruck getrocknet. Der Filterträger wurde anschließend in die *PSQ 96* Mikrotiterplatte (Qiagen) eingetaucht und die PCR-Suspension angesaugt. Danach wurde der Träger in 180 ml 70%iges Ethanol eingebracht und für 10 sek unter Vakuumeinwirkung gewaschen. Eine 0,2 M NaOH-Lösung führt zur Denaturierung der DNA in Einzelstränge, während die Waschlösung störende Reagenzien entfernt. Die *Beads* wurden durch Abschaltung des Vakuums in eine spezielle 96-well Sequenzierungs-Mikrotiterplatte entlassen, welche zuvor pro Probe mit 38,4 µl *PyroMark Annealing-Puffer* (Qiagen) und 1,6 µl (400 nM) Sequenzierungs-Primer (Metabion) versetzt wurde. Die Proben mussten für 2 min bei 80°C auf einem entsprechenden Heizblock inkubiert und anschließend für mindestens 5 min

abgekühlt werden. Bei diesem Schritt hybridisiert der Sequenzierungs-Primer an den zu untersuchenden DNA-Abschnitt. Die Platte wurde im Anschluss in eine spezielle Vorrichtung des *PyroMark Q96 MD* Gerätes angebracht. Zusätzlich musste ein spezieller Adapter (engl. *Cartridge*) mit einer entsprechenden Menge an Enzym- und Substrat-Mix sowie dNTPs (Qiagen) befüllt werden. Die Menge an Enzym/Substrat Mix sowie dNTPs hing von der zu untersuchenden Sequenz ab.

2.13 PROTEINCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN

2.14.6 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG (HE-FÄRBUNG) VON GEWEBESCHNITTEN

Um die Gewebemorphologie der Brustkrebsgewebe von Normalgeweben mikroskopisch differenzieren zu können, wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die Gewebeschnitte der kryokonservierten Frischgewebe für zwei Minuten mit Hämalaun (nach Mayer) inkubiert, das zur Anfärbung von basophilen Strukturen, insbesondere dem Zellkern mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum (rER), führt. Nach einem Waschschrift mit VE-Wasser erfolgte die Anfärbung basischer (eosinophiler) Strukturen, d.h. vor allem Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum (sER) und Kollagen, mittels Eosin-Karbonat-Lsg. für eine Minute. Nach einer anschließenden Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (vergl. Tab. 2-25) wurden die Schnitte in Vitroclud® (Langenbrinck, Emmendingen) Medium eingedeckelt.

2.13.2 IMMUNHISTOCHEMIE (IHC) AN PARAFFINFIXIERTEM GEWEBE

Anhand der immunhistochemischen Färbung kann die Proteinexpression in Gewebeschnitten subzellulär visualisiert werden. In dieser Arbeit sollte mittels der IHC die NDRG2 und ITIH5 Proteinexpression an Formalinfixierten paraffineingebetteten (FFPE) *Tissue Microarrays* (TMA) (2µm) analysiert werden, deren Konstruktion und klinische Charakteristik bereits beschrieben wurden (Dahl *et al.* 2006). Der TMA wurde von der Universitätsklinik in Regensburg bezogen und war aus 167 Brustkrebsgeweben sowie 55 Normalgeweben aufgebaut. Je Fall war eine Stanze eines FFPE-Gewebes vorhanden, welche unselektiv konstruiert vorlagen.

Durchführung der IHC

Bei der Verwendung von FFPE-Material ist es essentiell, das Gewebe vor Beginn der Färbung zu entparaffinieren, zu rehydrieren und die Antigen-Epitope für eine effektive Antikörper-Anbindung zu demaskieren. Die Entparaffinierung der TMA-Objektträger erfolgte für 30

Minuten in einem Wärmeschrank bei 60°C. Im Anschluss konnte das Gewebe über eine absteigende Alkoholreihe (Tab. 2-24) rehydriert werden.

Tabelle 2-24: Absteigende Alkoholreihe für die IHC

| Lösung | Zeit |
|--------------|-----------|
| Xylol 100% | 3 x 5 Min |
| Ethanol 100% | 1 x 5 Min |
| Ethanol 100% | 1 x 5 Min |
| Ethanol 96% | 1 x 5 Min |
| Ethanol 96% | 1 x 5 Min |
| Ethanol 70% | 1 x 1 Min |
| VE-Wasser | 1 x 1 Min |

Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebe erfolgte die Hitze-Demaskierung der NDRG2 Antigen-Epitope durch eine 10-minütige Inkubation im Dampfkochtopf (100°C). Die Objektträger wurden hierfür in eine Küvette mit einem vorgewärmten Zitronensäure-Puffer (pH 6) überführt. Anschließend mussten die Objektträger für weitere 30 Minuten im abgeschalteten Dampfkochtopf inkubiert werden und abschließend bei RT 20 Minuten abkühlen. Die Hitze-Demaskierung der ITIH5 Antigen-Epitope erfolgte in der Mikrowelle. Dazu wurden die Objektträger ebenfalls in eine Küvette mit vorgewärmtem Zitronensäure-Puffer (pH 6) überführt und bei maximaler Watt-Zahl bis zum Aufkochen des Puffers inkubiert. Anschließend erfolgten eine 15-minütige Inkubation bei 180 Watt und eine abschließende Abkühlung der Objektträger für ca. 20 Minuten bei RT. Den Vorbehandlungen folgte die Durchführung der Immunhistochemie, den Herstellerangaben gemäß, mit dem *Dako RealTM Detection System Kit K5001* (Dako, Glostrup, Dänemark) für das ITIH5-Epitop und mit dem *UltraVision Quanto Detection System HRP DAB* (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA) für das NDRG2-Epitop. Hierfür wurden die Gewebe zunächst mit einem Fettstift (Dako) umrandet und für die Inkubationsschritte in eine mit Feuchttüchern ausgelegte Kammer gelegt. Der Fettstift gewährleistete eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen bei minimalem Volumen. Alle Waschschrte erfolgten in einer entsprechenden Küvette mit dem Dako Waschpuffer. Zu Beginn wurden die Gewebeschnitte mit VE-Wasser gewaschen und mit 100 µl einer Peroxidaseblock-Lsg. (Dako) für fünf Minuten inkubiert, um die intrazelluläre Peroxidase-Aktivität zu inhibieren. Nach einem Waschschrte (5 min) erfolgte die Inkubation mit 100 µl des ITIH5-Primärantikörpers (1:150) bzw. des NDRG2-Primärantikörpers (1:150) für 30 Minuten. Im Anschluss folgten drei fünfminütige Waschschrte, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für die ITIH5-Färbung (biotinyliert, Ziege-Anti-Kaninchen) sowie dem

Sekundärantikörper für die NDRG2-Färbung (*HRP Polymer Quanto*) erfolgte für 10 Minuten. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde erneut dreimalig für 5 Minuten mit Dako-Waschpuffer gewaschen. Bevor die Gewebeschnitte für die ITIH5-Färbung mit 100 µl des Substrates (1:50) Chromogen DAB (Diaminobenzidin, DAKO) inkubiert werden konnten, mussten diese zusätzlich mit einer Streptavidin-HRP Lösung für 10 Minuten inkubiert werden. Für NDRG2 war dieser Schritt nicht notwendig, da eine entsprechende Behandlung bereits über den Sekundärantikörper erfolgte. Das Chromogen DAB dient als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP), welche mit dem sekundären Antikörper konjugiert ist. Die HRP katalysiert die Bildung eines löslichen, braunen Farbstoffs, welcher die spezifische Primär-Antikörperbindung an das Antigen (ITIH5/NDRG2) sichtbar macht. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit VE-Wasser gewaschen, gefolgt von einer fünfminütigen Gegenfärbung mit Hämalaun. Das Bläuen der Schnitte wurde durch 10-minütiges Waschen in handwarmem Leitungswasser vorgenommen. Vor der Eindeckelung mit Vitroclud® mussten die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert werden (Tab. 2-25). Die Auswertung der gefärbten Gewebeschnitte erfolgte lichtmikroskopisch durch einen erfahrenen Pathologen.

Tabelle 2-25: Aufsteigende Alkoholreihe für die IHC

| Lösung | Zeit |
|--------------|-----------|
| VE-Wasser | 1 x 1 Min |
| Ethanol 70% | 1 x 3 Min |
| Ethanol 96% | 1 x 3 Min |
| Ethanol 96% | 1 x 3 Min |
| Ethanol 100% | 1 x 3 Min |
| Ethanol 100% | 1 x 3 Min |
| Xylol 100% | 1 x 5 Min |

2.13.3 ISOLATION VON GESAMTPROTEIN AUS HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN

Um die humanen Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und BT20 hinsichtlich einer möglichen differentiellen Proteinexpression zwischen den Leer- und ITIH5-Klonen (siehe Kapitel 2.14.4) untersuchen zu können, mussten diese lytisch aufgeschlossen werden. Je nach Bedarf wurden 1×10^5 bis 2×10^5 Zellen kultiviert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit *NuPage-Lyse-/Probenpuffer* (Zusammensetzung siehe Tabelle 2-5) 5 min auf Eis lysiert. Pro 2×10^5 Zellen wurden 150 µl Probenpuffer für eine ausreichende Zelllyse benötigt. Das Zelllysate wurde mit einem sterilen Zellschaber von der Zellkulturschale abgelöst und in ein 1,5 ml Gefäß (auf Eis) überführt. Um hochmolekulare DNA und restliche

Zelltrümmer zu zerkleinern wurde die Probe 2 x 15 sek (35% Stärke, je 9 Zyklen) sonifiziert. Vorhandene Zelltrümmer wurden anschließend bei 12.000 rpm (4°C) 30 min abzentrifugiert und der Überstand in einen sauberes 1,5 ml Gefäß überführt. Bei Versuchen die eine Bestimmung der Proteinkonzentration forderten sowie der Analyse des Phosphorylierungszustands von Proteinen wurden die Proteine mit einem RIPA-Lysepuffer versetzt und lysiert, da der Bromphenolblauhaltige NuPage-Lysepuffer eine Konzentrationsbestimmung unmöglich macht. Der RIPA-Lysepuffer wurde mit Proteinase-Inhibitoren (Roche, Mannheim, Deutschland) und einem Phosphatase-Inhibitor *Cocktail II* (Sigma) in einer Verdünnung von 1:100 versetzt. Die Lagerung der Zellysate erfolgte bei -80°C.

2.13.4 SDS-POLYACRYLAMIDGELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Das diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelsystem nach Laemmli (Laemmli 1970) wird in der Analyse von Proteinen verwendet. Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel auf Acrylamid- und Bisacrylamid-Basis, bestehend aus einem Sammelgel (4%; pH 6,8) und einem Trenngel (5-25%; pH 8,8). Zusätzlich kommt SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. Dieses anionische Detergenz überdeckt die Eigenladungen von Proteinen. Pro Gramm Protein binden ungefähr 1,4 g SDS, so dass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Im großporigen Sammelgel werden die Proteine vorsortiert und am unteren Rand des Gels aufkonzentriert, während im kleinporigeren Trenngel große Proteine im oberen Bereich verbleiben und kleinere Proteine schneller und somit weiter im Gel wandern. Die Bewegung der Proteine im Gel hängt von der Ladung und der Feldstärke ab. Der Elektrophoresepuffer enthält Chlorid-Ionen und Glycin. Das Glycin hat bei pH 6,8 im Sammelgel seinen isoelektrischen Punkt, ist fast ungeladen und wandert kaum. Das Glycin wird auch als Folge-Ion bezeichnet. Die Chlorid-Ionen sind die Leitonen, die schnell durch das Sammelgel wandern. Dadurch entsteht im Sammelgel ein Feldstärkegradient, wodurch die Proteine, die als erstes am Trenngel ankommen durch Reibung zurückgehalten werden. Bei pH 8,8 im Trenngel ist Glycin wieder geladen und überholt die Chlorid-Ionen. Im Trenngel besteht kein Feldstärkegradient. Hier werden die Proteine nur nach ihrer molekularen Masse in scharfe, diskrete Proteinbanden aufgetrennt.

Die SDS-Page wurde mit dem *NuPAGE System* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Dabei wurden *5-12% Tris-Glycin-Gradientengele* (Novex, Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Diese Gele ermöglichen aufgrund ihres Konzentrationsverhältnisses eine saubere Proteinauftrennung über einen weiten Größenbereich hinweg (15 kDa bis 150 kDa) und waren somit für alle in dieser Arbeit zu analysierenden Proteine geeignet. Dem für

die Zellyse eingesetzte *NuPAGE Puffer* wurde das Detergenz Dithiothreitol (DTT) zugesetzt, welches die für die Faltung von Proteinen wichtigen Disulfidbrücken zwischen Aminosäuren reduziert und damit die Tertiärstruktur der Proteine auflöst. Die zusätzliche Erhitzung der Proben für 5 Minuten bei 96°C in einem Wasserbad sorgte für eine weitere Auflösung der spezifischen Proteinstruktur, wodurch eine bestmögliche Auftrennung ermöglicht wurde. Je nach Proteinmenge und Geltaschengröße wurden 10 bis 35 µl der Lysate in die Elektrophorese eingesetzt und für 2 Std. bei 100 V aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde in dem *XCell SureLock™ Mini-Cell System* (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Als Längenstandard diente der *PageRuler Plus* Proteinmarker (10 kDa bis 250 kDa) der Firma Thermo Fisher (Fremont, CA).

2.13.5 WESTERNBLOTTING UND IMMUNODETEKTION

Zur immunologischen Charakterisierung der aufgetrennten Proteine wurde eine Western Blot Analyse über eine Antigen-Antikörperreaktion (Immunodetektion) durchgeführt. Beim Western Blot wird ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt.

Für den Transfer wurde die eingesetzte Nitrozellulosemembran (0,2 µm) (Whatman, Dassel) luftblasenfrei auf das Polyacrylamid-Gel gelegt und mit Transferpuffer-getränktem *Whatmann*-Filterpapier und Kunststoffschwämmen bedeckt. Dieses sogenannte *sandwich* wurde gemäß den Herstellerangaben in die Blot-Vorrichtung (Biorad) eingespannt und der Tank mit 500 ml eiskaltem Transfer-Puffer gefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromspannung von 100 V bei 4°C für 1 Std.

Immunodetektion

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulose-Membran zunächst für 5 min in TBS/Tween 20 Puffer gewaschen, wodurch Reste des Transfer-Puffers entfernt wurden. Tween 20 ist eine Seife, die jegliche Waschschrte während der Immunodetektion unterstützt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation der Membran in 5% Milchpulver. Das „Blocken“ der Membran erfolgte bei RT und gewährleistet, dass mögliche unspezifische Epitope der eingesetzten Antikörper durch die Milchproteine abgesättigt werden. Nachfolgend konnte die Membran mit den in dieser Arbeit eingesetzten Primärantikörpern bei 4°C ü.N inkubiert werden (siehe Tabelle 2-7). Um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, folgten drei fünfminütige Waschschrte mit TBS/0,1% Tween 20. Im Anschluss erfolgte die

Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 Std. bei RT. Dabei bindet der spezifische peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper an den Primärantikörper und ermöglicht die Visualisierung der Proteinbanden mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion. Die folgenden drei fünfminütigen Waschschriffe entfernten ungebundenen Sekundärantikörper. Die Proteindetektion erfolgte mit dem *ECL Western Blotting Substrate* der Firma Pierce (Rockford). Die Peroxidase- und die Luminol-Verstärker-Lösung wurden in einem 1:1 Verhältnis gemischt, für eine Minute auf die Membranen gegeben und anschließend vorsichtig entfernt. Das Luminol wird durch die Peroxidase HRP, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, oxidiert. Die dadurch entstehende Chemilumineszenz-Reaktion kann durch das Auflegen eines Röntgenfilms visualisiert werden.

2.14 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Alle zellbiologischen Methoden wurden unter sterilen Bedingungen (Reinraum-Werkbank mit vertikaler Strömung) durchgeführt, um Kontaminationen bei dem Arbeiten mit Zellen zu vermeiden. Die Kultivierung der humanen Brustkrebszelllinien BT20 und MDA-MB-231 erfolgte in Zellkulturgefäßen mit einer Größe von 75 cm² bei 37°C, einer CO₂-Sättigung von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 95%.

2.14.1 KRYOKONSERVIERUNG VON HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN

Für die Kryokonservierung wurden die BT20- und MDA-MB-231-Zellen zunächst mit sterilem PBS gewaschen, trypsiniert und nach der Pelletierung je nach Zelldichte in 1,5 ml bis 3,0 ml kaltem (4°C) Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium enthält Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzmittel. DMSO dringt besonders gut in die Zellmembran ein und verhindert während des Einfrierprozesses die Bildung von Eiskristallen, welche zum Absterben der Zellen führen können. Von dieser Suspension wurden je 0,5 ml in ein Kryoröhrchen gegeben und ü.N. in einem Einfrierbehälter (*Mr. Frosty*, Thermo Scientific) tiefgefroren (-80°C). Der Einfrierbehälter wurde dazu mit Isopropanol gefüllt und gewährleistete so eine optimale Abkühlungsrate der Zellesuspension von -1°C/Minute. Danach wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Kryotank (-196°C) überführt.

2.14.2 KULTIVIERUNG DER HUMANEN MAMMAKARZINOM-ZELLINIEN BT20 UND MDA-MB-231

Die bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden zur Kultivierung zügig angetaut und die Zellsuspension direkt in einer 75 cm² Gewebekulturflasche mit 10 ml

frischem Medium ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um vorhandene Reste des zelltoxischen DMSO zu entfernen. Für die Kontrolle der optimalen Kulturbedingungen enthalten die Kulturmedien Phenolrot als einen pH-Indikator. Ein Farbumschlag von Rot nach Gelb signalisiert eine Ansäuerung des Mediums, welche durch die Sezernierung von Stoffwechselprodukten hervorgerufen wird oder eine Kontamination anzeigt. Diese Stoffwechselprodukte wirken zelltoxisch. Ein regelmäßiger Mediumwechsel ist aus diesem Grund und wegen dem Verbrauch von Nährstoffen durch die Zellen alle 2 bis 3 Tage notwendig. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-90% erreicht hatten, konnte diese passagiert werden. Dafür wurde das alte Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mit ca. 5 ml sterilem PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung für drei bis fünf Minuten bei 37°C (Trypsin-Temperatur optimum). Das EDTA bewirkt eine Komplexierung von Ca^{2+} und Mg^{2+} -Ionen, die eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von Zellen spielen. Die Protease Trypsin baut die für die Adhäsion wichtigen Oberflächenproteine wie z.B. Cadherine und Integrine ab. Die Zellen verlieren somit ihren Kontakt zur Oberfläche des Zellkulturgefäßes. Nach einer kurzen Aufbewahrung im Wärmeschrank wurde schließlich ein mikroskopisch nachweisbares Ablösen der Zellen vom Flaschenboden erzielt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 7 ml frischem, FKS-haltigem Kulturmedium, wodurch die Protease in ihrer Aktivität gehemmt und das zelltoxische EDTA verdünnt wurde. Von der Zellsuspension wurden dann 100 μl abgenommen, um nachfolgend die Zellzahl für funktionelle *in vitro* Experimente zu bestimmen.

2.14.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Die Zellzahl einer Suspension wurde mit dem *CASY[®] Cell Counter und Analyser* (OLS OMNI Life Science, Bremen) bestimmt. Dazu wurden die Zellen zunächst in einer isotonen Elektrolytlösung (Casyton) resuspendiert. Diese Suspension wurde durch eine Messkapillare gesaugt, an die über zwei Elektroden eine Spannung angelegt wurde. Die Zellen erzeugen somit beim Durchtritt der Kapillare einen elektrischen Impuls. Da das Gerät das Widerstandsmessprinzip mit der Pulsflächenanalyse kombiniert, konnte anschließend neben der Zellzahl auch die Größenverteilung der Zellen in einem Diagramm dargestellt werden. Dies hat den Vorteil, dass unerwünschte Zählereignisse (Zelltrümmer, tote Zellen, Aggregate, etc.) nicht in die Zellzahlbestimmung eingehen.

2.14.4 HERSTELLUNG VON STABILEN, GENETISCH-VERÄNDERTEN HUMANEN BT20-MAMMAKARZINOM-ZELLEN

Bei der stabilen Transfektion wird eine Vollängen-cDNA über ein entsprechendes Vektorsystem stabil in das Genom integriert. Die Generierung eines stabilen, genetisch-veränderten Tumormodells wurde in dieser Arbeit genutzt, um biologische Funktionen von *ITIH5* für die Entstehung und Progression humaner Mammakarzinome tiefergehend charakterisieren zu können. Zu diesem Zweck wurde die Vollängen-cDNA des putative Metastasierungssuppressorgen *ITIH5* mit dem Phagemid-Vektor pBK-CMV der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) (Abb. 2-6) stabil in das Genom der Mammakarzinom-Zelllinie BT20 integriert. Dieses Tumormodell sollte dann hinsichtlich des Einflusses von *ITIH5* funktionell charakterisiert werden und die genotypischen und phänotypischen Veränderungen des bereits etablierten *ITIH5*-Tumormodell der MDA-MB-231-Zellen untermauern (Rose 2013). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem pBK-CMV Vektor ohne *ITIH5*-Vollängen-cDNA Sequenz stabil transfiziert.

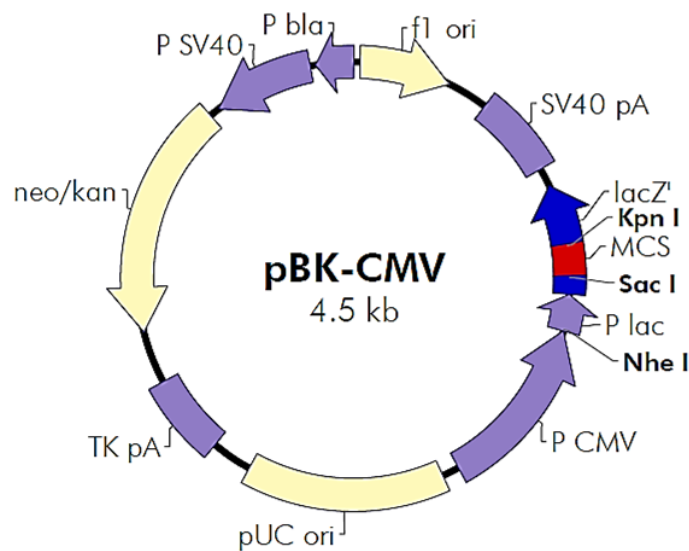


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des Phagemid-Vektor pBK-CMV, welcher zur Generierung der BT20 und MDA-MB-231-*ITIH5*-Tumormodelle genutzt wurde (Stratagene).

Der 4,5 Kilobasen (kb) große Vektor enthält den eukaryotischen Selektionsmarker Neomycin zur Selektion humaner Zellen. Weiterhin weist der Vektor den Überexpressions-Promotor CMV (Cytomegalovirus) sowie die in Ihrer Orientierung entgegengesetzten Promotoren T3 und T7 auf. Die *ITIH5*-Vollängen-cDNA war bereits in die *Multi-Cloning-Site* über die Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI kloniert worden (Abb. 2-7) und stand für die Versuche als fertig aufgereinigtes *ITIH5*-Vektorkonstrukt zur Verfügung (Himmelfarb *et al.* 2004).

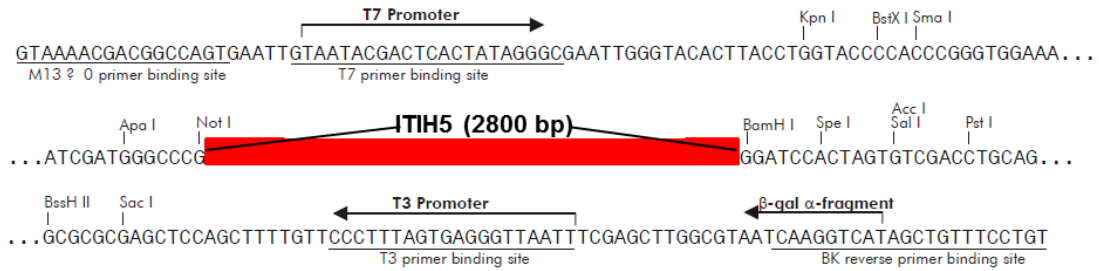


Abbildung 2-7: MCS (*Multi Cloning Site*) des Vektors pBK CMV mit klonierter *ITIH5*-Volllängen-cDNA.

Durchführung der stabilen Transfektion

Die BT20-Zellen wurden mindestens 24 Stunden vor Beginn der Transfektion mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, erfolgte die Transfektion. Durchgeführt wurde die Transfektion mit dem *FuGeneHD Kit* der Firma Roche (Mannheim, Deutschland), gemäß den Herstellerangaben. Die Methode basiert auf der Aufnahme von DNA durch Lipofektion. Dabei enthält das *FuGeneHD* Transfektionsreagenz Komponenten, die Komplexe mit der negativ geladenen DNA bilden können und die Aufnahme der DNA durch Endozytose oder dem Verschmelzen der DNA-Liposomen-Komplexe mit der Zellmembran fördern. Tabelle 2-26 zeigt die Zusammensetzung der Transfektionsansätze.

Tabelle 2-26: Transfektions-Schema

| Well | Funktion | Vektor DNA [µl] | <i>FuGeneHD</i> [µl] | ddH ₂ O [µl] |
|------|---------------------|--------------------|-------------------------|----------------------------|
| A | Selektionskontrolle | - | - | 100 |
| B | Reagenzkontrolle | - | 4 | 96 |
| C | pBK-CMV-ITIH5 4:1 | 1,85 | 4 | 94,15 |
| D | pBK-CMV-ITIH5 4:2 | 3,71 | 4 | 92,29 |
| E | pBK-CMV 4:1 | 2,05 | 4 | 93,95 |
| F | pBK-CMV 4:2 | 4,16 | 4 | 91,84 |

Das optimale Verhältnis von Vektor-DNA und dem *FuGeneHD* Reagenz (Transfektions-Ratio 4:2 und 4:1 (*FuGeneHD*/DNA)) wurde in einem Vortest ermittelt. Bei der Mischung von Vektor-DNA mit dem *FuGeneHD* musste unbedingt darauf geachtet werden, dass Reagenz und Reaktionsgefäß nicht miteinander in Verbindung kommen, da die chemischen Bestandteile des Reaktionsgefäßes zu einer starken Verringerung der biologischen Aktivität des Reagenz führen können. Das Gemisch wurde mehrmals invertiert und anschließend für mindestens 15 Minuten bei RT inkubiert. Abschließend wurde dieser Ansatz tropfenweise auf die in 2 ml Medium befindlichen Zellen gegeben und diese unter Standardbedingungen für 72 Stunden kultiviert. Für die weitere Kultivierung wurden die Reagenzkontrolle (B) verworfen und die Ansätze A, C, D, E und F weitergeführt. Diese

Ansätze wurden standardgemäß trypsiniert und das Pellet in 10 ml Medium resuspendiert. Jeder Ansatz wurde gemäß dem Titrations-Schema in Tabelle 2-25 verdünnt und in einer 100 mm Petrischale ausgesät.

Tabelle 2-27: Titrations-Schema

| Verdünnung | 1:10 | 1:20 | 1:50 | 1:100 | 1:200 | 1:300 | 1:500 | 1:1000 |
|---------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Medium [ml] | 9 | 9,5 | 9,8 | 9,9 | 9,95 | 9,97 | 9,98 | 9,99 |
| Zellsuspension [ml] | 0,1 | 0,5 | 0,2 | 0,1 | 0,05 | 0,03 | 0,02 | 0,01 |

Die Ansätze wurden direkt mit dem Antibiotikum G418 versetzt, das u.a. eukaryotische Zellen am Wachstum hindert, in der in einem Vorversuch ermittelten Endkonzentration von 200 µg/ml. Die Applikation unterschiedlicher Konzentrationen des G418-Antibiotikums, erfolgte an der BT20-Wildtyp-Zelllinie über einen Zeitraum von 14 Tagen. Dazu wurden in sterilen 6-Well-Platten 1×10^4 BT20-Zellen ausgesät und im Anschluss definierte Antibiotikum-Konzentrationen (10 µg/ml bis 2000 µg/ml) dem Medium zugesetzt. Alle zwei bis drei Tage musste das Kulturmedium sowie die entsprechende Konzentration des Antibiotikums G418 erneuert werden. Nach 14 Tagen erfolgte die Beurteilung der letalen Dosis, wobei die niedrigste Antibiotikum-Menge, die innerhalb der Inkubationszeit zum Tod aller Zellen geführt hatte, der optimalen G418-Konzentration für den folgenden stabilen Transfektions-Ansatz entsprach.

Die maximal zu erwartende Wahrscheinlichkeit einer stabilen Integration der transfizierten DNA in eine Zelle liegt bei 10^{-4} . Aus diesem Grund wurde erst nach vollständigem Absterben der Wildtypzellen (Ansatz A, Tabelle 2-26) in den entsprechenden Verdünnungen durch das G418 (2-3 Wochen), mit der Selektion von Einzelklonen begonnen. Die mit Hilfe von sterilen Klonierungsringen isoliert-wachsenden Einzelklonkolonien wurden durch Trypsinieren gelöst und in eine 96-Well Kulturschale umgesetzt, wo sie mit konditioniertem und 20% FKS-haltigem Medium zum Wachstum angeregt wurden. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90-100% wurden die Klone in ein nächst größeres Kulturgefäß überführt (48-Well, 24-Well, 6-Well Kulturschalen). Im Folgenden konnten die BT20-Klone in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und kryokonserviert werden. Die ITIH5 exprimierenden Klone sowie die Kontroll-Leerklone standen nun für die funktionelle Charakterisierung des putativen Metastasierungssuppressorgen *ITIH5* zur Verfügung.

2.14.5 DIE *IN VITRO* DNA-DEMETHYLIERUNG

Die *in vitro* Demethylierung genomischer DNA zeigt den Einfluss der DNA-Methylierung einer Promotorregion auf die Genexpression. Gene, welche durch DNA-Methylierung transkriptionell stillgelegt wurden, werden nach der Behandlung mit demethylierenden

Substanzen reexprimiert, was den Einfluss dieses molekularen Mechanismus zur Genregulation untermauert. In dieser Arbeit wurden die Wildtyp-Zellen der MDA-MB-231-Zellklone demethyliert, um die Genexpression des putativen Tumorsuppressorgens *NDRG2* vor und nach der Promotordemethylierung zu vergleichen. Dabei kamen zwei unterschiedliche Substanzen zum Einsatz. Die *de novo* Methylierung innerhalb von Zellen wird durch das Aza-Nukleosid-Derivat 5'-Aza-2'-Desoxycytidin (DAC), ein Basenanalogen von Cytidin, inhibiert. DAC wird während der Replikationsphase proliferierender Zellen in die genomische DNA eingebaut, kann jedoch C5-ständig nicht methyliert werden. In Folge dessen kommt es im Verlauf der DNA-Replikation zu einer globalen Demethylierung der genomischen DNA behandelter Zellen. Zusätzlich inhibiert DAC die DNA-Methyltransferasen (DNMT) durch eine kovalente Bindung an diese Enzyme irreversible, wodurch die globale Demethylierung der DNA unterstützt wird (Constantinides *et al.* 1977; Jones & Taylor 1980; Santi *et al.* 1984). Die DNA-Methylierung agiert in einem engmaschigen, synergistischen Netzwerk mit den Histonmodifikationen. Daher ist es sinnvoll auch die expressionshemmende Hypoacetylierung zu unterbinden. Aus diesem Grund wurden die Zellen zusätzlich mit Trichostatin A (TSA) behandelt, welches selektiv die Klasse I- und Klasse II- Histon-Deacetylasen (HDAC) blockiert (Vanhaecke *et al.* 2004).

Für die Demethylierungsversuche wurden die zu analysierenden MDA-MB-231-Zellen mit einer Zelldichte von 3×10^4 Zellen in 6-Well Kulturschalen ausgesät. Pro Klon wurden vier Ansätze (1x Kontrolle und 3x Demethylierung) mit je 2 ml Volumen vorbereitet. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellen mit PBS-Puffer gewaschen. Im Demethylierungs-Ansatz wurde das Medium mit 1 μ M DAC appliziert und für 24 Stunden inkubiert. Der Mediumwechsel und die Zugabe von DAC wurden zweimal wiederholt. Nach 72 Stunden wurde der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) in einer Endkonzentration von 300 nM zugesetzt. Neben diesem Ansatz wurden die Zellen in einem zweiten Ansatz nur mit DAC und in einem dritten Ansatz nur mit TSA behandelt, um die demethylierende Wirkung beider Substrate einzeln zu untersuchen. Nach abschließender Inkubation für weitere 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und jeweils die RNA (TRIzol® Isolation, 2.12.3) und die genomische DNA (*QIAamp DNA Mini Kit*, Qiagen, 2.12.1) isoliert.

2.14.6 RNA-INTERFERENZ

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) wurde erstmalig in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Fire *et al.* 1998). Fire *et al.* injizierten dem Fadenwurm doppelsträngige RNA (dsRNA) und fanden eine Stilllegung von Genen, die komplementär zu der eingebrachten dsRNA waren. Die RNA-Interferenz ist ein natürlicher Prozess, der in den

meisten Eukaryoten beobachtet werden kann (Cerutti & Casas-Mollano 2006). In der Natur kommen verschiedene Typen interferierender RNA vor, die vor allem bei der Abwehr viraler RNA und bei Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle spielen. Die RNAi wurde in dieser Arbeit mittels siRNA (engl. *small interfering RNA*) für einen induzierten NDRG2-Expressionsverlust in MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen etabliert. Die siRNA ist eine 19 bis 23 Basenpaare kurze doppelsträngige RNA mit jeweils zwei 3'-endständig überstehenden Nukleotiden. Sie wird über das RNase III-Enzym Dicer aus doppelsträngigen Nukleotidsequenzen prozessiert. Die siRNAs werden dann in den RISC- (engl. *RNA-induced silencing complex*) Enzymkomplex inkorporiert, der komplementäre mRNAs identifiziert und stilllegt.

Für die transiente Transfektion wurden je Ansatz 6×10^5 Zellen (ITIH5-Klone #4 und #7) im zweifachen Ansatz in einer 6-Well Kulturplatte ausgesät und während der Vorbereitung des Transfektionsmix unter Standardbedingungen kultiviert. Der Transfektionsmix (pro Ansatz 100 μ l) bestand aus je 600 ng der NDRG2-spezifischen siRNAs (Qiagen, Hilden), 10 μ l Transfektionsreagenz (*HiPerfect*, Qiagen) und 80 μ l DMEM-Medium (serumfrei) und wurde für 15 Minuten bei RT inkubiert. Für den induzierten *knock-down* wurden vier verschiedene siRNAs eingesetzt. Zur Kontrolle dienten jeweils die unbehandelten ITIH5-Klone sowie der Leerklon #2. Zusätzlich kamen eine kommerzielle siRNA-Negativkontrolle (Qiagen), die keinerlei Homologie zum menschlichen Genom besitzt, sowie eine siRNA-Positivkontrolle (Qiagen) gegen die Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPK1), ein zentraler Proliferationsmarker humaner Zellen, zum Einsatz. Die Kontrollen wurden in den gleichen Konzentrationen (je 600 ng) wie die gegen NDRG2-gerichteten siRNAs eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix vorsichtig, tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken in der Kulturplatte gleichmäßig verteilt. Identisch zur Generierung eines stabilen Tumormodells wurde hier die Methodik der Lipofektion genutzt (vergl. Kapitel 2.14.4). Die Transfektion wurde für die gesamte Versuchsdauer alle 48 Stunden wiederholt. Dabei wurden die Zellen nach 48 Stunden mit PBS gewaschen, trypsiniert und erneut 6×10^5 Zellen ausgesät. Nach der Zellpassage wurde die Transfektion wiederholt. Nach 48 h, 96 h, 144 h und 196 h erfolgte jeweils die Probenentnahme für die RNA-Isolation (TRIzol®) und die Herstellung von Proteinlysaten für die Western Blot Analyse der NDRG2-Expression.

2.15 FUNKTIONELLE IN VITRO EXPERIMENTE

2.15.1 XTT-PROLIFERATIONSTEST

Die Analyse der Zellproliferation in den stabilen BT20-Zellklone und die siRNA-transfizierten MDA-MB-231-Zellklone erfolgte mit dem *XTT-Zellproliferations-Kit II* der Firma Roche gemäß den Herstellerangaben. Der *Assay* basiert auf der Reduktion des Tetrazoliumsals XTT in das H₂O lösliche orange Formazan durch mitochondriale Dehydrogenasen in stoffwechselaktiven Zellen. Formazan absorbiert Licht einer Wellenlänge zwischen $\lambda=450$ nm und $\lambda=500$ nm. Die Reduktion erfolgt nur in lebenden Zellen, weshalb die Menge an gebildetem Formazan proportional zur Zellzahl in der Probe ist.

Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Absorptions-Readers (Infinite 500, Tecan). Der Beginn der Zellproliferationsanalyse der MDA-MB-231-Zellklone erfolgte nach 192-stündigem induzierten *knock-down* des putativen Tumorsuppressorgens *NDRG2*. Analysiert wurden zusätzlich die unbehandelten sowie die mit der siRNA-Negativ- und Positivkontrolle behandelten Zellen. Pro Zelltyp wurden 1.000 Zellen in einem sechsfachen Ansatz in 96-Well Kulturschalen mit 100 μ l DMEM-Medium und dem Selektivum G418 ausgesät. Die Proliferationsanalyse erfolgte über drei (MDA-MB-231-Zellklone) bzw. vier (BT20-Zellklone) Tage, wobei im Abstand von 24 h das XTT-Reagenz zugegeben wurde. Dazu wurde zunächst das verbrauchte Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Zur Aktivierung musste dem XTT-Reagenz ein Elektronenkopplungs-Reagenz (N-Methylphenazonium Methylsulfat, PMS) (1:50) zugegeben werden. Nach Zugabe von 50 μ l der aktivierten XTT-Lösung pro Well erfolgte eine Inkubation von 4 h bei 37°C im Brutschrank. Die Quantifizierung der Proben erfolgte gegen zwei mitgeführte Leerwerte (DMEM-Medium).

2.15.2 WUNDHEILUNGSTEST

In dieser Arbeit wurden die stabilen BT20-Zellklone und die siRNA-transfizierten MDA-MB-231-Zellklone hinsichtlich ihrer Migrationsfähigkeit untersucht. Ein funktioneller Wundheilungstest (*scratch assay*) ermittelt dabei die Fähigkeit von Zellen *in vitro* auf einer Oberfläche in eine freie Fläche zu migrieren. Im Falle der BT20-Zellen wurden für jeden zu analysierenden Zellklon 5×10^5 Zellen in DMEM-Medium in 6-Well Kulturschalen in einem Dreifachansatz ausgesät. Die MDA-MB-231-Zellen wurden vor dem Einbringen der „Wunde“ für 192 h mit *NDRG2*-siRNA transfiziert und im Anschluss mit einer Zellzahl von 2×10^5 Zellen in 24-Well Kulturschalen ausgesät. Zusätzlich wurden die unbehandelten sowie die mit einer siRNA-Negativkontrolle behandelten Zellen untersucht. Nach 24 Stunden

Kultivierung wurde die „Wunde“ mit einer sterilen Pipettenspitze möglichst gleichmäßig entlang eines Lineals in den dichten Zellrasen eingebracht. Das Migrationsverhalten der Zellen wurde alle 24 Stunden in einem Axiovert TV100 (Zeiss) Mikroskop mit einer hochauflösenden *ColourVision III* CCD-Kamera dokumentiert. Eine 5-fache Vergrößerung ermöglichte die Erfassung eines großen Ausschnitts, wobei zu jedem Zeitpunkt der gleiche Ausschnitt dokumentiert wurde. Die Quantifizierung der Zellmigration erfolgte mit Hilfe der *Axiovert-Software* (Zeiss), wobei die Abnahme der zellfreien Fläche (in Pixel) vermessen und in Relation zur bewachsenen Fläche gesetzt wurde. Daraus ergab sich für jeden Ansatz und jeden Zeitpunkt ein bestimmter Pixel-Wert für die verbliebene noch zu migrierende Oberfläche. Die Ansätze wurden solange dokumentiert bis die Zellen den zellfreien Spalt vollständig migriert hatten.

2.15.3 KOLONIENBILDUNGSTEST (*COLONY FORMATION ASSAY*)

Der Kolonienbildungstest (engl. *Colony Formation Assay*, CFA) bietet neben dem XTT-Assay eine weitere Möglichkeit der Zellproliferationsanalyse. Zudem erlaubt dieser Assay eine Aussage über morphologische Unterschiede, Migrationsverhalten und generell das Koloniebildungsvermögen der Zellen. Von den BT20-Zellklonen wurden je Klon 1.000 Zellen pro 6-Well Kulturschale in einem Volumen von 2 ml DMEM-Medium und in einer Dreifachbestimmung ausgesät. Jedem Ansatz wurde zu dem die entsprechende Menge G418-Antibiotikum zugegeben. Es folgte eine Inkubation für maximal 14 Tage bei 37°C im Brutschrank. Bei jedem Mediumwechsel wurde frisches Selektivum zugegeben. Der geeignete Zeitpunkt für die Auswertung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Das alte Medium wurde daraufhin abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung und Fixierung der Einzelkolonien mit einer 0,5% igen Kristallviolett-Lsg. (80% MeOH, 10% Formaldehyd, 10% ddH₂O). Nach einer Inkubationszeit bei RT von 30 Minuten und dreimaligem Waschen mit H₂O wurden die fixierten und gefärbten Kolonien fotografiert. Die densitometrische Auswertung des Kolonienwachstums erfolgte mit Hilfe der Software *ImageQuant TL* (Version 2003.2).

2.15.4 ADHÄSIONSTEST

Die Adhäsionseffizienz der BT20-Zellklone wurde mit *MatrigelTM Basement Membrane Mix* (BD Bioscience) und Hyaluronsäure (Sigma-Aldrich) analysiert. Das *MatrigelTM* entstammt einem Engelbrecht-Holm-Swarm (EHS) Sarkom der Maus, welches reich an extrazellulärem Matrixprotein ist und die natürliche Basalmembran mit Komponenten wie Laminin und Collagen IV simuliert. Das verwendete Matrigel enthält zudem Komponenten wie TGF-β und

andere Wachstumsfaktoren, die die Adhärenz der Zellen fördern. Sowohl das Matrigel als auch die Hyaluronsäure erzeugen eine nahezu identische *in vivo* Umgebung einer extrazellulären Matrix innerhalb der Zellkultur-basierten Analyse der Zelladhäsion. Für die Untersuchung mit Matrigel wurden 6-Well Kulturschalen 2 Stunden vor Versuchsbeginn mit einer Matrigel-Konzentration von 10 µg/µl beschichtet. Für die Analyse der Adhäsionseffizienz mit Hyaluronsäure musste eine entsprechende Anzahl von 6-Well Kulturschalen 2 Tage vor Versuchsbeginn mit dieser in einer Konzentration von 100 µg/ml beschichtet werden. Im Anschluss an die jeweilige Inkubationsdauer wurden je 5×10^5 Zellen pro Well in einem Volumen von 2 ml serumfreien Medium ausgesät und für 30 Minuten bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch mehrmaliges, vorsichtiges Waschen mit serumfreiem Medium entfernt und die adhärenenten Zellen durch 10-minütiges Inkubieren mit 70% Ethanol bei RT fixiert. Nachfolgend wurden die adhärenenten Zellen mit einer 0,1% Kristallviolett-Lösung gefärbt und nach weiteren 20 Minuten vorsichtig dreimalig mit 2 ml H₂O gewaschen und bei 37°C über Nacht getrocknet. Abschließend wurde der Farbstoff der Platten mit 0,02% Triton-X und Isopropanol gelöst. Je 200 µl des Überstandes wurden in einer dreifachen Bestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und in einem *ELISA-Reader* bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590$ nm gemessen.

2.15.5 GENEXPRESSIONS *MICROARRAY* ANALYSE DER *ITIH5*-BASIERTE BT20 UND MDA-MB-231 TUMORMODELLE

Der durch DNA-Methylierung bedingte *ITIH5*-Expressionsverlust ist insbesondere bei Mammakarzinom-Patientinnen ohne Befall der axillären Lymphknoten mit einem verkürzten Rezidiv-freien Überleben verknüpft und verdeutlicht die mögliche Rolle von *ITIH5* als putatives Metastasierungssuppressorgen im humanen Mammakarzinom (Veeck *et al.* 2008b). Ein Signalweg, der die evidente Stellung von *ITIH5* im Mammakarzinom mechanistisch einordnet, konnte bisher noch nicht gezeigt werden. Zur Aufschlüsselung der biologischen *ITIH5*-Funktion in der Zelle wurden im Rahmen dieser Promotion die generierten *ITIH5*-Tumormodelle (BT20 und MDA-MB 231) über eine *Chip*-basierte Genexpressionsanalyse analysiert. Für die Analyse wurde der *Affymetrix 1.0 ST Genarray* (Affymetrix, Santa Clara CA, USA) genutzt. Die Durchführung erfolgte in einer der zentralen Einheiten der Uniklinik RWTH Aachen (*Interdisciplinary Centre for Clinical Research, IZKF*). Der genutzte Chip besitzt 28.869 annotierte Vollängen-Transkripte und ermöglichte so das Aufzeigen differenziell regulierter Gene in den Leer- und den *ITIH5*-Klonen, die Hinweise auf ein *ITIH5*-regulierten Signalweg im humanen Mammakarzinom geben könnten. Die Analyse der

Genexpressionsdaten erfolgte über das Programm *BRB-ArrayTools* Version 4.3.1 (Simon *et al.* 2007). Um differenziell exprimierte Gene zwischen der Kontroll- (-ITIH5) und Testgruppe (+ITIH5) zu identifizieren, wurde eine Klassen-Vergleichsanalyse (engl. *class comparison*) zwischen beiden Gruppen durchgeführt. Ein Unterschied zwischen der Genexpression wurde als signifikant betrachtet, wenn folgende Bedingungen erreicht wurden: a) P-Werte waren gleich oder unter 5% und b) eine im Minimum 1,8-fache Differenz des Expressionslevels zwischen Kontroll- und Testgruppe. Gene wurde von der Analyse ausgeschlossen, wenn weniger als 20% der Expressionswerte mindestens eine 1,8-fache Differenz in beide Richtungen der medianen Expression besaßen. Die erstellte Genliste wurde nach folgenden Bedingungen in der biomedizinischen Ontologie-Datenbank (engl. *Gene Ontology*, GO) annotiert: GO-Klassen mit wenigstens fünf Beobachtungen in der ausgewählten Subgruppe (Zelluläre Komponente (engl. *Cellular Component*, CC), Biologischer Prozess (engl. *Biological Process*, BP) und Molekulare Funktion (engl. *Molecular Function*, MF) und einem “Beobachtet vs. Erwartet” Verhältnis von mindestens zwei. Um differenziell exprimierte Gene des gesamten Array hinsichtlich der GO-Kategorien evaluieren und annotieren zu können, wurde eine Genset-Vergleichsanalyse durchgeführt, die ähnlich ist zu der von Subramanian *et al.* beschriebenen Genanalyse (Subramanian *et al.* 2005). Tests, die genutzt wurden um signifikante Gene zu identifizieren, waren: der LS/KS Permutation-Test (um Gensets zu finden, die mehr Gene in den phänotypischen Klassen differenziell exprimiert haben als durch die Veränderung erwartet wird) und die Efron-Tibshirani’s Genset-Analyse (Identifizierung von Gensets die differenziell exprimiert werden). Überrepräsentierte Genlisten wurden als signifikant betrachtet, wenn der Schwellenwert für die Bestimmung signifikanter Gene bei $P \leq 0,05$ lag.

2.16 STATISTISCHE METHODEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mittels der Statistik-Software SPSS Version 20 (SPSS, Chicago, IL, USA) ausgewertet. Alle statistischen Auswertungen wurden zweiseitig durchgeführt. Ein P-Wert $< 0,05$ zeigte statistische Signifikanz. Die Evaluierung der klinischen Biomarker-Relevanz der *ITIH5*-, *DKK3*- und *RASSF1*-Promotormethylierung erfolgte mittels der ROC- (*Receiver Operating Characteristics*) Analyse: In Abhängigkeit einer Trenngröße (*Cut-Off-Wert*) wird die Sensitivität (Richtig-Positiv Rate) gegen die Spezifität (Falsch-Positiv Rate) aufgetragen. Ein Maß für die Güte des Tests ist die Fläche unter der ROC-Kurve (*Area Under Curve*, AUC). Differenzielle Vergleiche zwischen unabhängigen Gruppen (ITIH5- gegenüber Leerkclone) wurden mittels eines nicht- parametrischen *Mann-Whitney U*-Test ausgewertet (Mann & Whitney 1947). Bivariate Korrelationsanalysen, die die

Zusammenhänge zwischen molekularen und kliniko-pathologischen Parametern untersuchen, wurden mittels Kreuztabellen unter Anwendung des Fisher's Exakt-Test (Fisher 1922) und dem *Chi-Quadrat-Test* (Chernoff & Lehmann 1954) sowie unter Angabe des Korrelationskoeffizienten nach *Pearson* oder *Spearman* durchgeführt durchgeführt. Univariate Überlebensanalysen von Patientinnen in Abhängigkeit von kliniko- pathologischen und molekularen Parametern wurden mittels Kaplan-Meier Analysen berechnet (Kaplan & Meier 1958). Signifikanzen dieser Funktion werden mit einem *Log-Rank-Test* berechnet. Multivariate Cox Regressions-Analysen mittels der Einschluss-Methode (Cox 1986) bestimmen die Unabhängigkeit univariat signifikanter Faktoren von anderen Kovariaten auf das Überleben der Patientinnen und definieren relative Risiken der betreffenden Parameter.

3. ERGEBNISSE

3.1 DIE IDENTIFIZIERUNG UND VALIDIERUNG POTENTIELLER BLUT-BASIERTER BRUSTKREBS FRÜHERKENNUNGS-BIOMARKER

Das Mammakarzinom ist die häufigste Neoplasie bei Frauen in Deutschland, welches trotz merklicher Verbesserungen in der Therapie und Einführung der Mammographie den höchsten Anteil Krebs-bedingter Sterbefälle bei Frauen darstellt. Der Bedarf und die Notwendigkeit ergänzender und verlässlicher Biomarker zur Früherkennung von Brustkrebs sind aufgrund evidenter Schwachpunkte der mammographischen Tumordetektion (Bleyer & Welch 2012; Mukhtar *et al.* 2013) von großer Bedeutung. Die DNA-Hypermethylierung CpG-reicher Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen fand in der letzten Dekade, bezüglich der Krebs-Früherkennung, großes Interesse (Laird 2003). Trotz zahlreicher, vielversprechender Früherkennungs-Biomarker hat es noch keiner dieser potentiellen Kandidaten in die Anwendung der Karzinom-Früherkennung geschafft. Problematisch erwies sich in den meisten Studien die kleine Zahl untersuchter Brustkrebs-Fälle, die oftmals nicht adäquat hinsichtlich einer Kontrollkohorte analysiert werden konnten. Die in dieser Arbeit angestrebte Analyse neuer potentieller Brustkrebs Früherkennungs-Biomarker erfolgte auf der Grundlage zweier unabhängiger Serumkollektive, die hinsichtlich der klinischen Parameter aufeinander abgestimmt wurden. Ein Testkollektiv ermöglichte auf der ersten Stufe die Identifizierung von neuen analytisch sowie klinisch hoch spezifischen Biomarker, die auf der zweiten Stufe in einem unabhängigen Validierungskollektiv tiefergehend evaluiert werden konnten.

3.1.1 ERSTE STUFE: IDENTIFIZIERUNG SPEZIFISCHER FRÜHERKENNUNGS-BIOMARKER

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Validierung neuer Biomarker, die aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Spezifität und Robustheit das Potential für eine Blut-basierte Brustkrebs-Früherkennung aufweisen. Die für diese Studie ausgewählten putativen Tumorsuppressorgene zeigen eine kennzeichnende Rolle innerhalb zentraler Signalwege im humanen Mammakarzinom, deren Funktion im Zuge der Karzinogenese durch DNA-Hypermethylierung verloren geht. Somit besitzen diese Kandidatengene eine grundlegende Voraussetzung für die Blut-basierte Detektion eines Mammakarzinoms mittels frei-zirkulierender DNA (cfDNA) des Serums. Der Wnt-Signalweg liegt im humanen Mammakarzinom häufig dauerhaft aktiv vor. Dabei führt insbesondere der durch DNA-Hypermethylierung bedingte Expressionsverlust von *SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP5*, *DKK3* und *WIF1* zur Aktivierung der Signaltransduktion des WNT-Signalwegs (Ai *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2008; Veeck *et al.* 2008a). Das putative Tumorsuppressorgen *ITIH5*, welches ebenfalls

durch DNA-Hypermethylierung stillgelegt wird (Veeck *et al.* 2008b), kennzeichnet sich durch seine mögliche inhibitorische Rolle auf die Metastasierung des Mammakarzinoms, aus.

3.1.1.1 ANALYTISCHE SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER POTENTIELLEN BIOMARKER

Ein entscheidendes Kriterium für die Anwendung von Biomarkern zur Blut-basierten Früherkennung ist deren analytische Leistungsfähigkeit, d.h. wie zuverlässig und reproduzierbar der Test den zu untersuchenden Analyt quantifiziert. Dabei zeigt die analytische Spezifität, ob der für die Analyse der ausgewählten Kandidatengene zugrunde liegende Test nur die gewünschte Messgröße (methylierte DNA) erfasst und nicht unspezifisch unmethylierte DNA amplifiziert. Der eingesetzte *Assay* muss zudem eine hohe analytische Sensitivität gewährleisten, um die Methylierung in biologisch relevanten Konzentrationen sicher zu detektieren. Um die Kandidatengen-spezifischen *Assays* hinsichtlich ihrer analytischen Leistungsfähigkeit einordnen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen *in vitro* polymethylierter und unmethylierter Bis-DNA untersucht (Qiagen).

Die eingesetzten methylierungsspezifischen Oligonukleotide (M-Primer) zur Analyse der potentiellen Biomarker kennzeichneten sich durch eine hohe analytische Sensitivität mit einer Detektions-Nachweisgrenze von 5% (0,5 ng) methylierter Bisulfit-konvertierter (Bis) DNA in einem Hintergrund von 95% (9,5 ng) unmethylierter DNA. Die M-Primer amplifizierten zudem keine unmethylierte DNA, was die hohe analytische Spezifität der eingesetzten Tests verdeutlichte. Eine repräsentative Verdünnungsreihe zeigt Abb. 3-1. Auf Grund der starken analytischen Leistungsfähigkeit der Kandidatengen-basierten angewandten Methylierungs-*Assays* schienen die nachfolgenden Untersuchungen humaner Mammakarzinom-Proben sinnvoll.

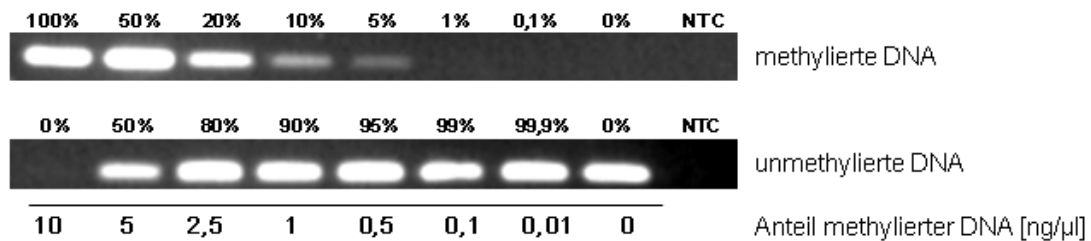


Abbildung 3-1: Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse eingesetzter MSP-*Assays* der Kandidatengene. Repräsentative Verdünnungsreihe mit definierten Konzentrationen unmethylierter und methylierter Bis-DNA. Die MSP mit einer polymethylierten Bis-DNA zeigt die analytische Sensitivität der methylierungsspezifischen Primer für methylierte Bis-DNA (100%-0,0%) in einem definierten Hintergrund von unmethylierter Bis-DNA (0,0%-100%). Die für die Methylierungsanalyse eingesetzten *Assays* zeigten eine Nachweisgrenze für methylierte Bis-DNA von 5% (0,5 ng methylierte Bis-DNA).

3.1.1.2 METHYLIERUNGSSTATUS DER POTENTIELLEN BIOMARKER IM HUMANEN MAMMAKARZINOM

Die Grundlage dieser Arbeit zur strategischen Identifizierung geeigneter Früherkennungs-Biomarker bildete die parallele DNA-Methylierungsanalyse CpG-reicher Gensequenzen der genannten Kandidatengene in 112 Geweben und den 112 korrespondierenden Seren derselben Patientin mittels der methylierungsspezifischen PCR (MSP). Abb. 3-2 zeigt repräsentative Ergebnisse der MSP-Analysen in Gewebe- und Serum-DNA.

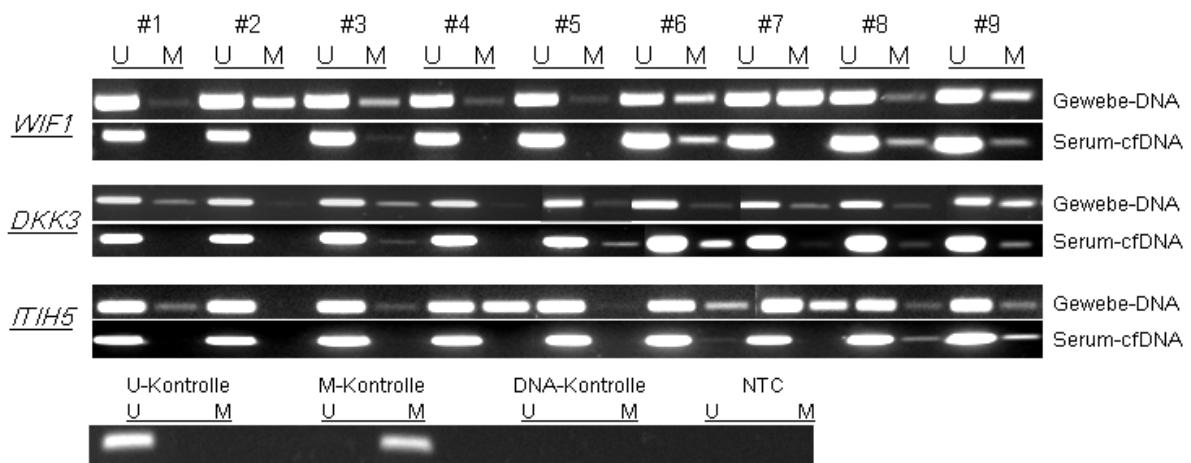


Abbildung 3-2: Methylierungsanalysen der Kandidatengene *WIF1*, *DKK3* und *ITIH5* in Gewebe-DNA und der zugehörigen Serum-cfDNA derselben Patientin. Repräsentative MSP-Ergebnisse der *WIF1*, *DKK3* und *ITIH5* Kandidatengene-Gruppe von neun Brustkrebsgeweben und den korrespondierenden Serumproben (#). Mit U und M gekennzeichnete Banden repräsentieren unmethylierte (U) und methylierte (M) Bis-DNA für den jeweils untersuchten Promotorbereich. *In vitro* hergestellte polymethylierte humane Bisulfit-konvertierte DNA (M-Kontrolle) sowie vollständig unmethylierte humane Bisulfit-konvertierte DNA (U-Kontrolle) (Qiagen, Hilden) dienten als Spezifitätskontrollen. Wasser fungierte als Negativkontrolle (engl. *no template control*, NTC). Zur Qualitätssicherung wurde jeder Assay mit genomischer unbehandelter humaner DNA (DNA-Kontrolle) (Qiagen, Hilden) analysiert.

Alle Kandidatengene zeigten eine hohe Methylierungsfrequenz zwischen 72% und 96% in Gewebe-DNA der untersuchten Brusttumoren. Dahingegen war die Methylierungsfrequenz der Serum-cfDNA der 112 korrespondierenden Serumproben deutlich geringer und resultierte in zwei Gruppen: Während *ITIH5*, *WIF1*, und *DKK3* eine höhere Methylierungsfrequenz (24%-35%) in der Serum-cfDNA aufwiesen, zeigte die Gruppe *SFRP1*, *SFRP2* und *SFRP5* ein relativ geringes Methylierungslevel (8%-19%). Die Ergebnisse der MSP-Analysen für jedes der ausgewählten Kandidatengene in den analysierten Brustkrebsgeweben und Brustkrebsseren werden in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Tabelle 3-1: Frequenz der Serum- und Gewebe-DNA basierten Detektion ausgewählter Kandidatengene in 112 korrespondierenden Brustkrebsproben

| Gen | Methylierungsfrequenz | | | |
|--------------|-----------------------|-----------|----------------------|-----------|
| | Serum-cfDNA | | Gewebe-DNA | |
| | Methylierung positiv | % | Methylierung positiv | % |
| <i>ITIH5</i> | 27 von 112 | 24 | 81 von 112 | 72 |
| <i>DKK3</i> | 37 von 112 | 33 | 97 von 112 | 87 |
| <i>WIF1</i> | 39 von 112 | 35 | 108 von 112 | 96 |
| <i>SFRP1</i> | 12 von 112 | 11 | 89 von 111 | 79 |
| <i>SFRP2</i> | 21 von 112 | 19 | 90 von 112 | 80 |
| <i>SFRP5</i> | 9 von 112 | 8 | 104 von 110 | 93 |

Die untersuchten Genloci der Kandidatengene zeigten bei der Mehrheit der analysierten Proben bei einer Methylierung der Serum-cfDNA auch eine Methylierung der zugehörigen Gewebe-DNA. Dennoch war *SFRP2* in vier Fällen und sowohl *SFRP1* wie auch *ITIH5* in zwei Fällen in der cfDNA methyliert ohne nachweisbare Methylierung in der korrespondierenden Gewebe-DNA derselben Patientin. Eine signifikante positive Korrelation zwischen der Promoter-Methylierung in gepaarter Gewebe-DNA und Serum-cfDNA konnte für *DKK3* (P=0,003) und *ITIH5* (P=0,007) nachgewiesen werden (Tab. 3-2).

Tabelle 3-2: Korrelation des *DKK3* und *ITIH5* Methylierungsstatus in Gewebe- und Serum-DNA gepaarter Brustkrebsproben

| <i>DKK3</i> Gewebe-DNA | | | | | |
|--------------------------|----------------|--------------|------------|--------------------------|---------------------|
| | n ^a | unmethyliert | methyliert | Korrelation ^b | P-Wert ^c |
| <i>DKK3</i> Serum cfDNA | 112 | | | | |
| unmethyliert | | 15 | 60 | 0,276 | 0,003 |
| methyliert | | 0 | 37 | | |
| <i>ITIH5</i> Gewebe-DNA | | | | | |
| <i>ITIH5</i> Serum cfDNA | 112 | | | | |
| unmethyliert | | 29 | 56 | 0,255 | 0,007 |
| methyliert | | 2 | 25 | | |

^aNur weibliche Patientinnen mit einem primären, invasiven Brusttumor; ^bPearson Korrelationskoeffizient; ^cExakter Test nach Fisher, Exakte Signifikanz (2-seitig) von 0,05.

3.1.1.3 KLINISCHE SPEZIFITÄT DER POTENTIELLEN BIOMARKER

Die ersten Analysen von 112 Serumproben des Testkollektivs (Zusammensetzung siehe Abb. 2-1) zeigten, dass die Detektion eines Brusttumors in der cfDNA des Serums mit den ausgewählten Kandidatengenen mit einer geringen (*SFRP1*, *SFRP2* und *SFRP5*) bis moderaten (*ITIH5*, *DKK3* und *WIF1*) Sensitivität möglich ist. Potentielle Früherkennungs-Biomarker müssen neben einer hohen klinischen Sensitivität vor allem eine hohe klinische Spezifität aufweisen. Die klinische Spezifität der ausgewählten Kandidatengene konnte durch eine auf das Alter der Brustkrebs-Patientinnen abgestimmte Kontrollkohorte optimal evaluiert

werden. In der Kontrollkohorte eingeschlossen waren 102 Seren von gesunden Probandinnen und 20 Seren von Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust. In den Seren von gesunden Frauen zeigte vor allem die Kandidatengen-Gruppe *ITIH5*, *WIF1* und *DKK3* eine hohe klinische Spezifität zwischen 94% und 99%. Dahingegen erreichten die Kandidatengene *SFRP1* und *SFRP2* eine schwächere klinische Spezifität von 88%-90%. Der potentielle Biomarker *SFRP5* wurde aufgrund seiner geringen Sensitivität von lediglich 8% in der cfDNA von Brustkrebs-Patientinnen von weiteren Analysen ausgeschlossen. In den analysierten Seren von Frauen mit einer benignen Brusterkrankung zeigten die beiden potentiellen Marker *DKK3* und *ITIH5* eine Spezifität von 100%. Die Kandidatengene *WIF1*, *SFRP1* und *SFRP2* konnten hingegen mit einer schwachen Spezifität zwischen 75% und 90% nicht überzeugen. In Tabelle 3-3 werden die Kandidatengene hinsichtlich ihrer klinischen Eignung für die cfDNA-Analyse des Testkollektivs zusammengefasst.

Tabelle 3-3: Sensitivität und Spezifität Serum-basierter Detektion von aberrant methylierten Genen im Testkollektiv

| Gen | Sensitivität | | Spezifität | | Spezifität | |
|--------------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|-----------------------|------------|
| | Brustkrebs cfDNA | | Gesunde cfDNA | | Benigne cfDNA | |
| | Methylierung positiv | % | Methylierung negativ | % | Methylierung negative | % |
| <i>ITIH5</i> | 27 von 112 | 24 | 96 von 102 | 94 | 20 von 20 | 100 |
| <i>DKK3</i> | 37 von 112 | 33 | 101 von 102 | 99 | 20 von 20 | 100 |
| <i>WIF1</i> | 39 von 112 | 35 | 97 von 102 | 95 | 15 von 20 | 75 |
| <i>SFRP1</i> | 12 von 112 | 11 | 92 von 102 | 90 | 17 von 20 | 85 |
| <i>SFRP2</i> | 21 von 112 | 19 | 90 von 102 | 88 | 18 von 20 | 90 |

Ein idealer Früherkennungs-Biomarker sollte neben einer hohen klinischen Spezifität in gesunden Frauen zusätzlich Organ-spezifisch sein (Kumar *et al.* 2006) und eine mögliche andere Tumorerkrankung nicht erfassen. Daher wurden in dieser Arbeit innerhalb des Testkollektivs die cfDNA von 27 Patienten mit einem primären Kolonkarzinom analysiert. Das Kolonkarzinom ist mit einer Inzidenz von 13,5% die zweithäufigste Tumorentität bei Frauen (GEKID, 8. Ausgabe 2012) und ein klinisch geeigneter Biomarker für das Mammakarzinom sollte daher eine möglichst geringe Methylierung in anderen Entitäten wie z.B dem Kolonkarzinom aufweisen. Das Tumorsuppressorgen *DKK3* war in 27 von 27 untersuchten Fällen unmethyliert und damit in der Organ-spezifischen Abgrenzung zum Kolonkarzinom 100% spezifisch für das Mammakarzinom. Die potentiellen Biomarker *ITIH5*, *WIF1* und *SFRP2* zeigten eine geringere Tumor-Spezifität von 85%-89%, während *SFRP1* mit 73% die geringste Spezifität aufzeigte und mit 27% positiv detektierter Fälle sogar die Methylierungsfrequenz der Brustkrebs cfDNA überstieg.

3.1.1.4 ANWENDBARKEIT DER KOMBINIERTEN *ITIH5*- UND *DKK3*-METHYLIERUNG

Ausgehend von den qualitativen MSP-Ergebnissen waren die analysierten Kandidatengene in der Lage ein Mammakarzinom in der Serum-cfDNA zu detektieren. Dennoch wiesen die einzelnen putativen DNA-Methylierungsmarker im untersuchten Testkollektiv nur eine unzureichende Methylierungsfrequenz, respektive Sensitivität, für eine klinische Anwendung als Früherkennungs-Biomarker auf. Zudem zeigte das Tumorsuppressorgen *WIFI* für einen potentiellen Früherkennungs-Biomarker eine ungenügende Spezifität in der benignen Kontrollgruppe, während *SFRP1* und *SFRP2* in der gesamten Kontrollgruppe (gesund und benigne) der gewünschten hohen Spezifität nicht gerecht wurden. In der Organ-spezifischen Kontrollgruppe des Kolonkarzinoms zeigte die Kandidatengruppe *WIFI*, *SFRP1* und *SFRP2* ebenfalls eine verringerte Spezifität, indessen sich die Methylierungsfrequenzen der potentiellen Biomarker *SFRP1* und *SFRP2* ähnlich der im Mammakarzinom darstellte.

Abschließend, mit der Untersuchung des Testkollektivs, kristallisierten sich *DKK3* und *ITIH5* als hoch spezifische potentielle Früherkennungs-Biomarker heraus, deren Prävalenz durch die Kombination der Gen-basierten Methylierung zusätzlich evaluiert wurde (Abb. 3-3).

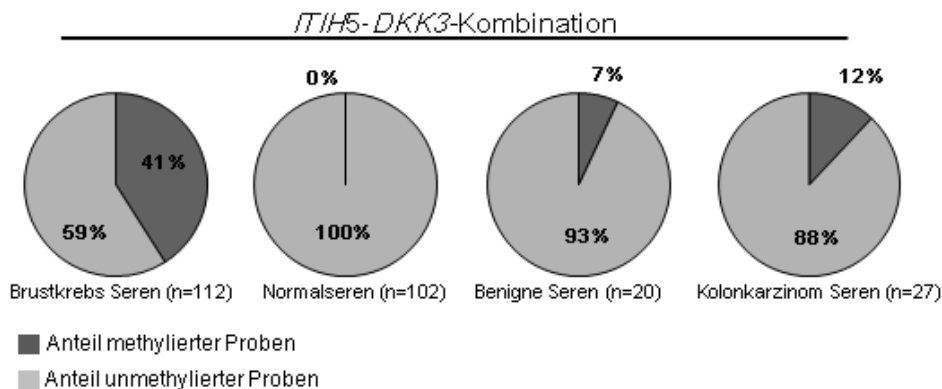


Abbildung 3-3: Darstellung der Sensitivitäts- und Spezifitätsrate der kombinierten *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung im Testkollektiv. Grafische Darstellung der kombinierten *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung in den analysierten Brustkrebs und Kontrollgruppen-Seren im Testkollektiv. Der methylierte Anteil der Tumorgruppe stellt die Richtig-Positiven Proben (Sensitivität) und der unmethylierte Anteil der Kontrollgruppe die Richtig-Negativen Proben (Spezifität) dar. Die Richtig-Positive oder -Negative Detektion war gegeben, wenn mindestens eines der beiden Kandidatengene methyliert vorlag.

Der Nachweis eines Tumors wurde als positiv bewertet, wenn mindestens einer der analysierten Sequenzbereiche methyliert vorlag. Das Resultat eines *DKK3-ITIH5* Biomarker-Dupletts ergab eine kumulative Sensitivitätssteigerung für die Detektion von Brustkrebs auf insgesamt 41% (46 von 112 waren methyliert), bei einer Spezifität von 93% (95 von 102 waren unmethyliert) in Seren von gesunden Frauen und 100% Spezifität (20 von 20 Proben waren unmethyliert) in Seren von Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust. Die

kombinierte *DKK3*- und *ITIH5*-Methylierung zeigt somit ein hohes Potential zur Diskriminierung pathologischer Proben von gesundem Zustand und einer weiteren bedeutenden Tumorentität gerecht.

Basierend auf den Ergebnissen dieser ersten Identifizierungsstufe konnten die für eine Blut-basierte Detektion des Mammakarzinoms spezifischen potentiellen Biomarker *ITIH5* und *DKK3* aus anfänglich sechs verschiedenen Kandidatengenen herausgestellt werden. Diese potentiellen Marker sind dabei sowohl in der wichtigen Kontrollgruppe der gesunden Frauen und der Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust als auch in der Kontrollgruppe einer anderen Tumorentität, dem Kolonkarzinom, spezifisch. In der zweiten Stufe sollten diese potentiellen Biomarker in einem unabhängigen, größeren Kollektiv validiert werden.

3.1.2 ZWEITE STUFE: VALIDIERUNG VON *ITIH5* UND *DKK3*

Im nächsten Schritt wurden *DKK3* und *ITIH5* in einem unabhängigen Validierungskollektiv hinsichtlich ihrer klinischen Eignung als Früherkennungs-Biomarker validiert. Das Validierungskollektiv bestand aus 138 Mammakarzinom-Seren und 205 Kontrollseren (Zusammensetzung siehe Abb. 2-1). Um die analytische Sensitivität zu erhöhen und um eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen (Eads *et al.* 2000; Lehmann *et al.* 2002), wurde das Validierungskollektiv mit der quantitativen methylierungsspezifischen PCR (qMSP) untersucht. Die ausgewählten qMSP-basierten Oligonukleotide für die methylierte Bis-DNA mussten vor der Analyse des Validierungskollektivs umfassend etabliert werden, um die hohe angestrebte analytische Leistungsfähigkeit zu gewährleisten.

3.1.2.1 ETABLIERUNG DER QMSP-TESTS

In der ersten Etablierungsstufe wurden die qMSP-basierten M-Primer und Fluoreszenzsonden für die *DKK3*- und *ITIH5*-Promotoranalyse an Verdünnungsreihen mit definierten Konzentrationen *in vitro* methylierter Leukozyten-Bis-DNA von gesunden Spendern evaluiert. Die eingesetzten Verdünnungsstufen (100%-0% *in vitro* methylierte DNA, Tabelle 2-21) konnten von den eingesetzten qMSP-Tests detektiert werden. Beide Tests erkannten 0,1% (25 pg) methylierte DNA in einem Hintergrund von 99,9% (24,975 ng) unmethylierter DNA. Die spezifischen Kurven der qMSP-basierten Verdünnungsreihe sind in Abbildung 3-4 dargestellt.

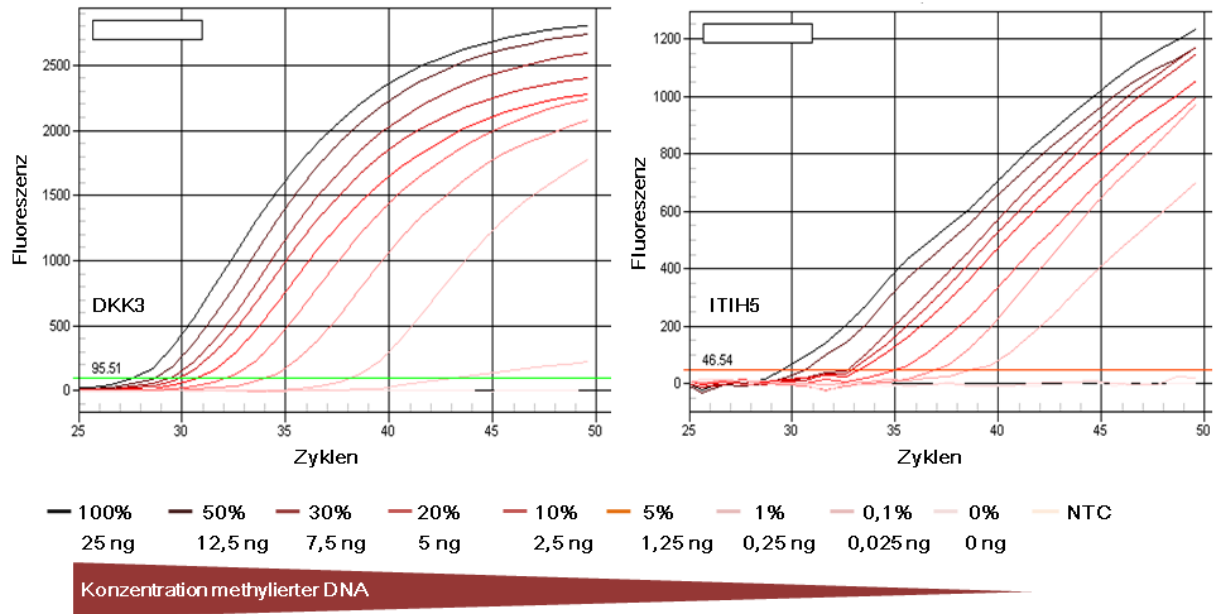


Abbildung 3-4: Die *ITIH5*- und *DKK3*-basierte qMSP Analyse *in vitro* methylierter Leukozyten-Bis-DNA zeigt eine hohe analytische Leistungsfähigkeit. Grafische Darstellung des spezifischen Kurvenverlaufs einer repräsentativen Verdünnungsreihe mit *in vitro* methylierter Leukozyten-Bis-DNA (100%-0,0%) in einem definierten Hintergrund unmethylierter Leukozyten-Bis-DNA (0,0%-100%). Die für die Analyse von *DKK3* und *ITIH5* eingesetzten qMSP-Tests zeigen mit abnehmender Konzentration methylierter Bis-DNA kontinuierlich höhere C_T -Werte (Abszisse) mit einer Verminderung des Fluoreszenzniveaus (Ordinate). Beide qMSP-Tests sind in der Lage 25 pg methylierte DNA in einem definierten Hintergrund unmethylierter DNA zu detektieren ohne derweilen unmethylierte DNA zu amplifizieren, was die hohe analytische Spezifität verdeutlicht.

Nach einer linearen Anfangsphase (zur besseren Darstellung der Kurven in Abb. 3-4 nicht gezeigt) zeigte der *DKK3*-Assay bei 100% (25 ng) methylierter DNA einen C_T -Wert von 27 mit folgendem klassischen Verlauf einer quantitativen PCR-Kurve. Mit jeder Verdünnungsstufe wurde ein höherer C_T -Wert erreicht, der die geringer werdende Konzentration methylierter Bis-DNA der Verdünnungsreihe verdeutlichte. Bei einer Konzentration von 25 pg methylierter DNA erreichte der *DKK3*-Assay einen C_T -Wert von 38, welcher zugleich die Nachweisgrenze dieses Assays darstellte, da ab 40 Zyklen die Plateau-Phase erreicht war. Der *ITIH5*-Assay zeigte nach der linearen Anfangsphase einen ähnlichen Kurvenverlauf, wobei die Plateau-Phase dieses Assays erst nach 50 Zyklen festzustellen war. Die eingesetzte Menge Bisulfit-behandelter DNA wurde mit dem Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert. Die *GAPDH*-Primer lagen in einem Sequenzbereich außerhalb eines CpG-Loci und amplifizierten die Gesamtmenge der eingesetzten Bis-DNA unabhängig von der Methylierung. Idealerweise sollten die *GAPDH* C_T -Werte für alle Proben innerhalb der Messung in einer ähnlichen Größenordnung liegen (Abb. 3-5).

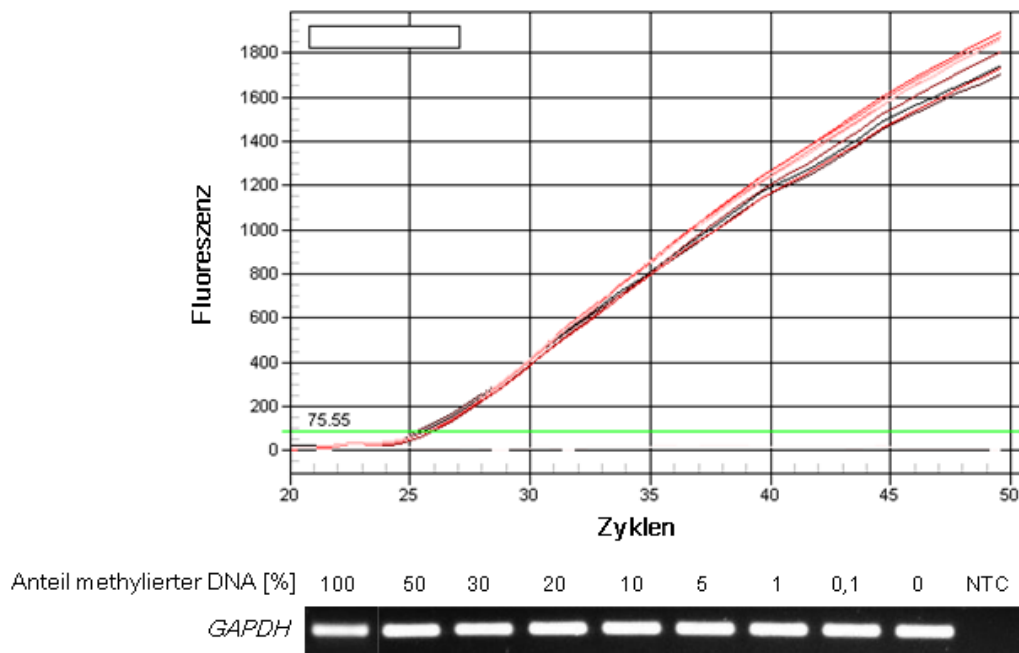


Abbildung 3-5: Die *GAPDH*-basierte qMSP-Analyse der Verdünnungsreihe *in vitro* methylierter Leukozyten-Bis-DNA verdeutlicht die homogene Konzentration eingesetzter Bis-DNA einzelner Verdünnungsstufen. Grafische Darstellung des spezifischen Kurvenverlaufs einer repräsentativen Verdünnungsreihe mit *in vitro* methylierter Leukozyten-Bis-DNA (100%-0,0%) in einem definierten Hintergrund unmethylierter Leukozyten-Bis-DNA (0,0%-100%). Die *GAPDH* qMSP repräsentiert die Gesamtmenge der eingesetzten Bis-DNA, unabhängig von der Konzentration an methylierter Bis-DNA. Kennzeichnend für die homogene Konzentration (25 ng) an Gesamt-Bis-DNA ist der konstante C_T-Wert in allen Verdünnungsstufen, was anhand des Agarose-Gelbilds (untere Abb.) nochmals verdeutlicht wird.

Nach der Normalisierung mit dem *GAPDH* C_T-Wert kann der prozentuale Anteil der jeweiligen Probe ermittelt werden (PMR-Wert). Dazu werden alle Proben auf die 100%-M-Kontrolle normiert. Der erwartete und der über die qMSP erreichte PMR-Wert der definierten Verdünnungsstufen wurde mittels einer Korrelationsanalyse (lineare Regressionsanalyse) für jeden *Assay* bewertet und parallel die Reproduzierbarkeit anhand mehrerer (n=5) unabhängiger Verdünnungsreihen untersucht. Der Korrelationskoeffizient (r^2) für den *DKK3* basierten qMSP-*Assay* zeigte sich bei fünf unabhängig voneinander angesetzten und analysierten Verdünnungsreihen in einem Größenbereich von $r^2=0,932$ bis $r^2=0,980$ (Median: $r^2=0,969$). Der *ITIH5* basierte qMSP-*Assay* kennzeichnete sich innerhalb der Mehrfachbestimmung durch einen r^2 -Wert zwischen 0,954 und 0,995 (Median: $r^2=0,981$) (Abb. 3-6). Die hohen r^2 -Werte verdeutlichen den starken Zusammenhang zwischen dem erreichten und dem erwarteten PMR-Wert.

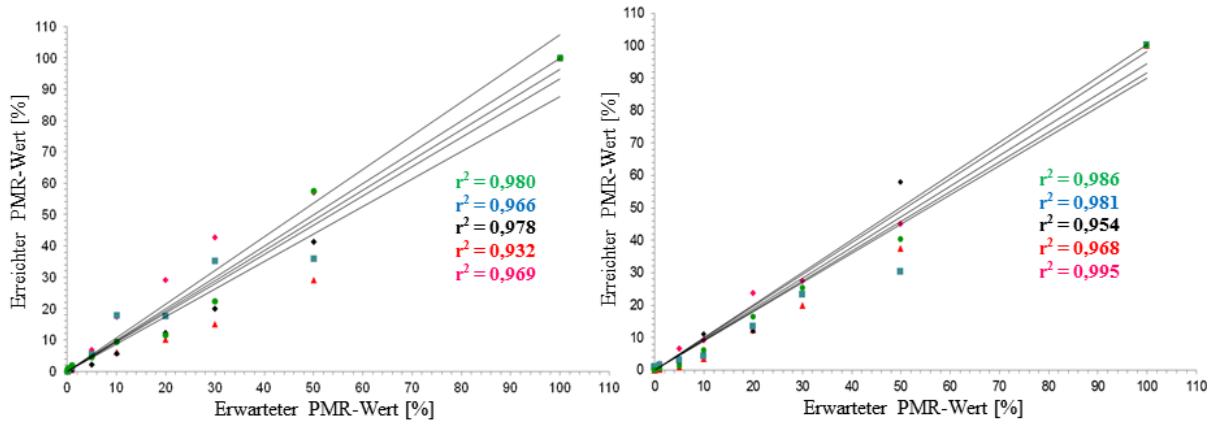


Abbildung 3-6: Die für die Analyse der *DKK3*- und *ITIH5*-Methylierung eingesetzten Assays zeigen eine gute Reproduzierbarkeit mit einem stabilen Korrelationskoeffizienten. Grafische Darstellung der Korrelationsanalyse (lineare Regressionsanalyse) unabhängig analysierter Verdünnungsreihen für den erwarteten PMR-Wert (Abszisse) und den erreichten PMR-Wert (Ordinate) in Prozent. Die erwarteten PMR-Werte der Verdünnungsreihe zeigen für beide Assay eine starke, reproduzierbare Korrelation.

Zur zusätzlichen Bewertung des Detektionsniveaus wurde mit einem sogenannten *Spiking*-Experiment die „DNA-Mengen-Situation“ in Serumproben nachgestellt und analysiert. Definierte Konzentrationen (250 pg bis 10 pg) *in vitro* methylierte DNA wurden in 1 ml Serum einer gesunden Probandin eingebracht, wobei für den *DKK3*-Assay eine Nachweisgrenze von 50 pg und für den *ITIH5*-Assay eine Nachweisgrenze von 100 pg in einem hohen Hintergrund von unmethylierter DNA gezeigt werden konnte (Abb. 3-7).

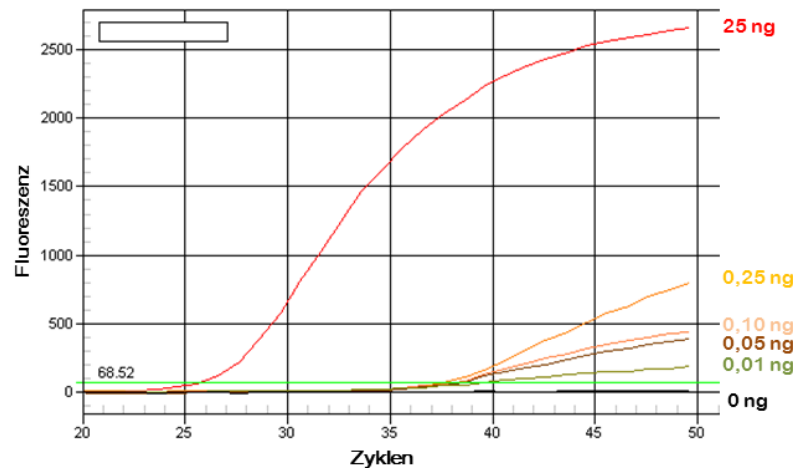


Abbildung 3-7: Die repräsentative *DKK3*-basierte qMSP Analyse in einem *Spiking*-Experiment zeigt eine Nachweisgrenze von 50 pg. Grafische Darstellung des spezifischen Kurvenverlaufs eines repräsentativen *Spiking*-Experiment zur Verdeutlichung der „DNA-Mengen-Situation“ mit definierte Konzentrationen (250 pg bis 10 pg) *in vitro* methylierter DNA in 1 ml Serum einer gesunden Probandin, die cfDNA isoliert und diese anschließend einer Bisulfit-Konversion unterzogen. Der für die Analyse von *DKK3* eingesetzte qMSP-Test zeigt mit abnehmender Konzentration methylierter Bis-DNA kontinuierlich höhere C_T -Werte (Abszisse) mit einer Verminderung des Fluoreszenzniveaus (Ordinate). Die 25 ng stellt die Positivkontrolle mit einer 100% Methylierung dar, 0 ng ist die Negativkontrolle ohne methylierte DNA.

Diese potentiellen Früherkennungs-Biomarker, welche sich durch eine *Assay*-spezifische hohe analytische Leistungsfähigkeit sowie eine hohe Reproduzierbarkeit auszeichneten, wurden anschließend in dem unabhängigen Validierungskollektiv hinsichtlich ihrer klinischen Sensitivität und Spezifität untersucht.

3.1.2.2 QMSP-BASIERTE DETEKTION DER *ITIH5*- UND *DKK3*-METHYLIERUNG

Die Bindestellen der *Assay*-spezifischen Primer für die MSP und die qMSP von *DKK3* und *ITIH5* waren innerhalb der gleichen genomischen Promotor-Regionen lokalisiert, jedoch konnten aufgrund unterschiedlicher Software-Programme für die Generierung der M-Primer nicht die identischen CpG-Dinukleotide abgedeckt werden. Um eine mögliche Korrelation zwischen der Methylierung, die mit MSP und qMSP erreicht wurde aufzuzeigen, wurden Serumproben von Brustkrebs-Patientinnen des Validierungskollektivs (positive und negative Fälle) nochmals mit der qualitativen MSP überprüft. Eine signifikante positive Korrelation konnte für die *ITIH5* ($P=0,040$) und die *DKK3* ($P=0,033$) Promotor-Methylierung zwischen beiden Technologien gezeigt werden.

Im Validierungskollektiv wurde eine *DKK3*-Methylierung in zwei von 135 (Spezifität: 98,5%) Alters-gepaarten Normalseren und in 41 von 138 (Sensitivität: 27,7%) Brustkrebs-Patientinnen gezeigt. Die Spezifität in der Kontrollgruppe der benignen Erkrankungen betrug 100% (39 von 39 untersuchten Proben waren unmethyliert). Eine *ITIH5*-Methylierung zeigte sich in sieben von 135 (Spezifität: 94,8%) analysierten Normalseren, in einer Serumprobe von 39 (Spezifität: 97%) Seren der Frauen mit benigner Erkrankung der Brust und in 19 von 138 (Sensitivität: 13,8%) Seren von Mammakarzinom-Patientinnen. In der cfDNA von Kolonkarzinom-Patienten konnte in sieben von 31 untersuchten Proben eine Methylierung von *DKK3* (Spezifität: 77%) und in neun von 31 Proben eine *ITIH5*-Methylierung (Spezifität: 71%) nachgewiesen werden. Dabei wurde jede Probe bei einem PMR-Wert $>0\%$ als positiv betrachtet. Die Kombination der *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung erbrachte, ähnlich wie im Testkollektiv, eine kumulative Sensitivität von 40% (55 von 138 Proben waren methyliert) sowie eine Spezifität von 93,3% (126 von 135 Proben waren unmethyliert) in Normalseren und 97,4% (38 von 39 Proben waren unmethyliert) in der benignen Kontrollgruppe. Hierzu wurde der mittlere Methylierungsgrad (PMR-Wert) beider Einzelmarker jeder Probe errechnet. Die mittleren logarithmischen PMR-Werte sind als Scatter-Plot-Diagramm in Abbildung 3-8A für die Brustkrebs-Seren und die einzelnen Kontrollgruppen dargestellt. Die Tumorgruppe zeigte eine hochsignifikante ($P<0,0001$) mittlere 35-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $0,7\% \pm 0,3\%$) im Vergleich zu den Kontrollseren von gesunden Frauen (mittlerer Methylierungsgrad: $0,02\% \pm 0,01\%$) sowie eine

hochsignifikante ($P < 0,0001$) mittlere 70-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz gegenüber der benignen Kontrollgruppe (mittlerer Methylierungsgrad: $0,01\% \pm 0,01\%$). In der Organspezifischen Kontrollgruppe der Kolonkarzinome zeigte sich für das *DKK3-ITIH5* Biomarker-Duplett eine geringe Spezifität von 52% mit einer dennoch um 1,2-fach verminderten Methylierungsfrequenz gegenüber dem Mammakarzinom (16 von 31 Proben waren unmethyliert; mittlerer Methylierungsgrad: $0,6\% \pm 0,3\%$).

Durch eine Grenzwertoptimierungskurve (engl. *Receiver Operating Characteristics*, ROC-Kurve) konnte im Anschluss die kombinierte *ITIH5-DKK3*-Methylierung hinsichtlich ihrer Eignung als potentielle Früherkennungs-Biomarker klar dargestellt und zudem ein definierter Schwellenwert (positive Methylierung) für eine Optimierung der Sensitivität und Spezifität festgelegt werden. Unter Berücksichtigung der Spezifität gibt das Regressionsmodell der ROC-Analyse das Maß der Sensitivität im Hinblick auf Richtig-Positiv detektierter Tumoren im Serum wieder und reflektiert damit die Effizienz des Assays. Zusätzlich ermöglicht die ROC-Analyse eine grafische Beurteilung der Testqualität, d.h. die Diskriminierungsstärke zwischen dem gesunden und dem pathologischen Zustand, die u.a. von der "Fläche unter der Kurve" (*Area Under Curve*, *AUC*) dargelegt wird. Die *AUC* für die hier untersuchte Kombination der *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung in der zusammengefassten Kontrollgruppe benigne und normal betrug 0,673 und besaß bei einem 95-prozentigen Konfidenzintervall von 0,611–0,735 mit $P < 0,0001$ Signifikanz. Dies bedeutet, dass in 67,3% der Fälle die Testgruppe einen höheren Methylierungsgrad im Vergleich zur Kontrollgruppe (gesund und benigne) erreichte (Zweig & Campbell 1993) (Abb. 3-8B). Für eine 100%ige Spezifität betrug der Schwellenwert 1,33% und zeigte einen Sensitivitätswert von 5,8%. Diese Werte entsprachen neun positiv gemessenen Tumoren (Richtig-Positive) und bedingten 129 als solche nicht-identifizierte Tumoren (Falsch-Negative). Entsprechend dem Schwellenwert wurden alle 135 Kontrollseren als negativ erkannt (Richtig-Negative).

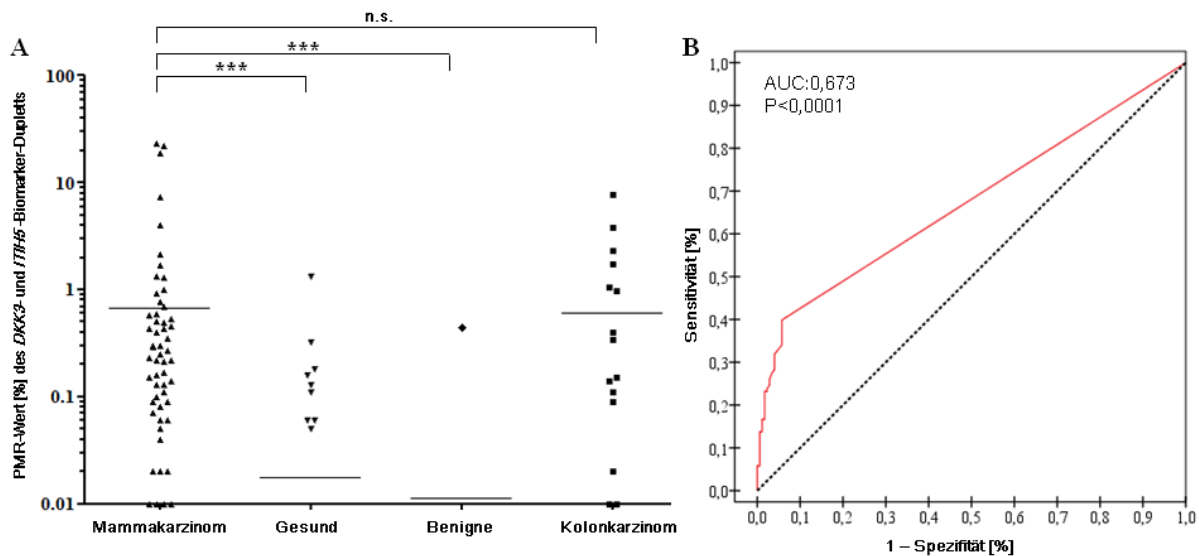


Abbildung 3-8: Biomarker-Effizienz der kombinierten *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung. (A) Scatter-Plot-Darstellung der PMR-Mittelwerte der kombinierten *DKK3*- und *ITIH5*-Methylierung im Validierungskollektiv (Ordinate) für jede der gemessenen Seren (Abszisse) eingeteilt in Tumor- und Kontrollgruppe. Die Kombination resultiert in einer kumulativen Sensitivität von 40% mit einer Spezifität von 93% in gesunden und 97% in benignen Kontrollen, mit einem im Mittel hochsignifikanten Unterschied (*Mann-Whitney-U-Test*). *** $P < 0,0001$; horizontale Linie: Mittelwert; PMR: *percentage of methylated reference*; n.s.: nicht-signifikant. (B) Effizienz-Bestimmung der kombinierten *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung in Brustkrebs-Seren gegenüber der Kontrollkohorte (gesund und benigne). Dargestellt ist eine ROC-Kurve (rot) mit einer Diskriminierungsstärke (AUC) von 0,673 ($P < 0,0001$). Die diagonale Linie (schwarz gestrichelt) repräsentiert eine AUC von 0,5 bei der eine Differenzierung zwischen Kontroll- und Testgruppe nicht mehr möglich ist. Jeder Punkt innerhalb der ROC-Kurve zeigt das Verhältnis von Sensitivität und Spezifität in Bezug zu dem jeweils bestimmenden Schwellenwert.

Neben der Spezifität und der Sensitivität potentieller Früherkennungs-Biomarker ist der positive Vorhersagewert (*Positive Predictive Value*, PPV) sowie der negative Vorhersagewert (*Negative Predictive Value*, NPV) in der klinischen Anwendung von Bedeutung. Bei einem Schwellenwert von PMR 1,33% hat die Patientin bei Positivität des Tests eine 100% Wahrscheinlichkeit (PPV) an einem Tumor erkrankt zu sein, während bei Negativität des Tests zu 55% Wahrscheinlichkeit (NPV) tatsächlich keine Erkrankung vorliegt. Dem gegenüber zeigt sich bei einem Schwellenwert von $PMR > 0\%$ ein $PPV = 85\%$ und ein $NPV = 66\%$. In Tabelle 3-4 sind die ROC-basierten Effizienzwerte basierend auf unterschiedlich definierten Grenzwerten für das *DKK3-ITIH5* Biomarker-Duplett zusammengefasst.

Tabelle 3- 4: Effizienz der kombinierten *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung

| Biomarker | Schwellenwert | Biomarker-Effizienz | | | |
|---------------------|---------------|---------------------|------------|------|-----|
| | | Sensitivität | Spezifität | PPV | NPV |
| <i>ITIH5 / DKK3</i> | 1,33% | 5,80% | 100% | 100% | 55% |
| <i>ITIH5 / DKK3</i> | 0,01% | 39,90% | 94% | 85% | 66% |

PPV: Positive Predictive Value; NPV: Negative Predictive Value.

3.1.2.3 OPTIMIERUNG DER BIOMARKER-EFFIZIENZ

Um die Sensitivität der kombinierten Methylierung von *ITIH5* und *DKK3* zu erhöhen, wurde in dem unabhängigen Validierungskollektiv zusätzlich der bereits beschriebene potentielle Früherkennungs-Biomarker *RASSF1A* untersucht. *RASSF1A* ist an der Regulation der Apoptose und von Zellzyklus-Kontrollpunkten beteiligt (Donninger *et al.* 2007) und spielt damit ebenfalls eine zentrale tumorsuppressive Rolle in der Karzinogenese, die durch den DNA-Methylierungs-basierten Expressionsverlust evident wird. Der für die Untersuchung der *RASSF1A*-Methylierung in cfDNA genutzte Assay wurde bereits beschrieben (Muller *et al.* 2003) und diente somit ebenfalls als interne Kontrolle unserer Analysen. Die analytische Leistungsfähigkeit des *RASSF1A* Tests war mit der Detektion von 25 pg methylierter DNA hoch (Abb. 3-9). Der Korrelationskoeffizient für den *RASSF1A*-Test zeigte sich bei drei unabhängig voneinander angesetzten und analysierten Verdünnungsreihen in einem Größenbereich von $r^2=0,942$ bis $r^2=0,989$ (Median: $r^2=0,985$) und knüpfte bezüglich der analytischen Kraft und Reproduzierbarkeit an die *DKK3*- und *ITIH5*-Tests an.

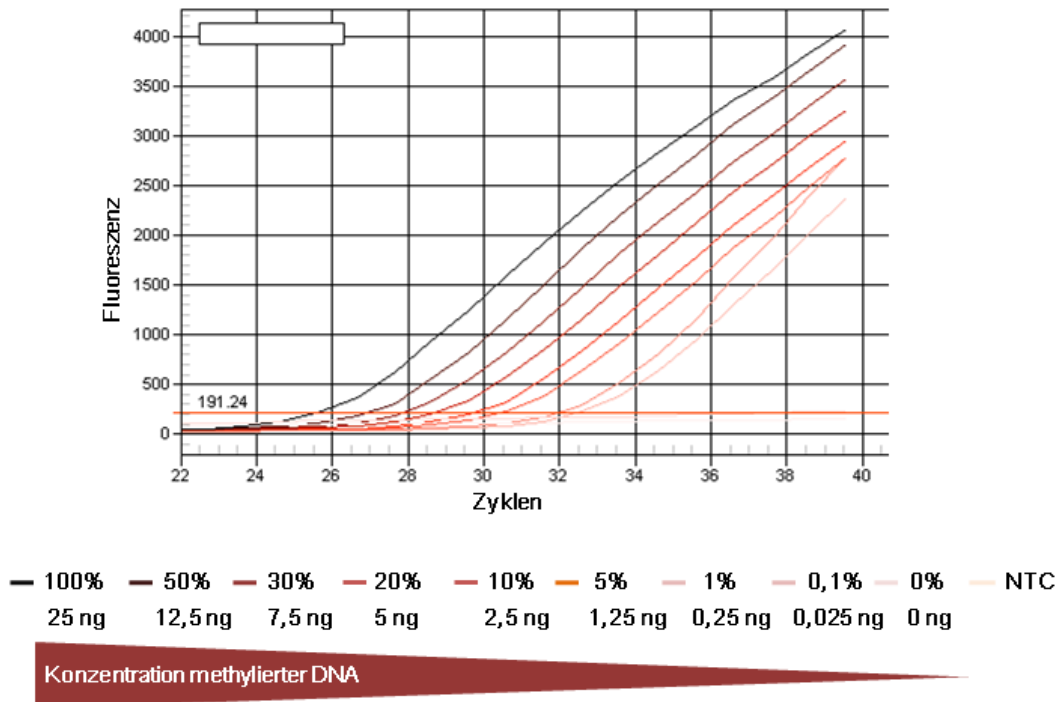


Abbildung 3-9: Die *RASSF1A*-basierte qMSP Analyse *in vitro* methylierter Leukozyten-Bis-DNA zeigt eine hohe analytische Leistungsfähigkeit. Grafische Darstellung des spezifischen Kurvenverlaufs einer repräsentativen Verdünnungsreihe mit *in vitro* methylierter Leukozyten-Bis-DNA (100%-0,0%) in einem definierten Hintergrund unmethylierter Leukozyten-Bis-DNA (0,0%-100%). Der für die Analyse von *RASSF1A* eingesetzte Test zeigt mit abnehmender Konzentration methylierter Bis-DNA kontinuierlich höhere C_T -Werte (Abszisse) mit einer Verminderung des Fluoreszenzniveaus (Ordinate). Der qMSP-Test ist in der Lage 25 pg methylierte DNA in einem definierten Hintergrund unmethylierter DNA zu detektieren ohne indes unmethylierte DNA zu amplifizieren, was die hohe analytische Spezifität verdeutlicht.

In dieser Arbeit konnte die *RASSF1A*-Methylierung mit einer Sensitivität von 46% (63 von 136 Proben waren methyliert) in Mammakarzinom-Seren sowie einer Spezifität von 73% (97 von 132 Proben waren unmethyliert) in Seren von gesunden Frauen und 85% (33 von 39 Proben waren unmethyliert) in Seren von Frauen mit einer benignen Brustkrankung nachgewiesen werden. In der Organ-spezifischen Kontrollgruppe der Kolonkarzinome zeigte sich der potentielle Biomarker mit einer schwachen Spezifität von 42% (13 von 31 Proben waren unmethyliert). Die Tumorgruppe zeigte eine hochsignifikante ($P < 0,0001$) mittlere 6-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $1,8\% \pm 0,6\%$) im Vergleich zu den Kontrollseren von gesunden Frauen (mittlerer Methylierungsgrad: $0,3\% \pm 0,06\%$) sowie eine hochsignifikante ($P < 0,0001$) mittlere 30-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz in der benignen Kontrollgruppe (mittlerer Methylierungsgrad: $0,06\% \pm 0,03\%$). Im Kolonkarzinom zeigte sich eine 2,3-fach verminderte Methylierungsfrequenz gegenüber dem Mammakarzinom (mittlerer Methylierungsgrad: $0,8\% \pm 0,30\%$) (Abb. 3-10A).

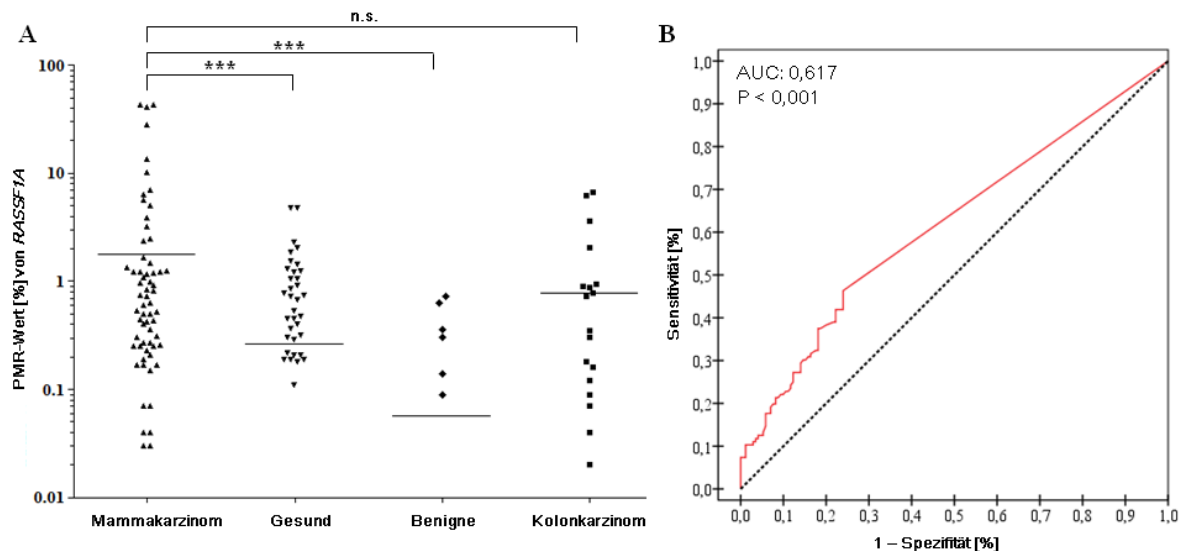


Abbildung 3-10: Biomarker-Effizienz der *RASSF1A*-Methylierung. (A) Scatter-Plot-Darstellung der PMR-Mittelwerte der *RASSF1A*-Methylierung im Validierungskollektiv (Ordinate) für jedes der gemessenen Seren (Abszisse) eingeteilt in Tumor- und Kontrollgruppe. Der potentielle Biomarker *RASSF1A* zeigt eine Sensitivität von 46% mit einer Spezifität von 73% in gesunden und 95% in benignen Kontrollen, mit einem im Mittel hochsignifikanten Unterschied (*Mann-Whitney-U-Test*). *** $P < 0,0001$; horizontale Linie: Mittelwert; PMR: *percentage of methylated reference*; n.s.: nicht signifikant. (B) Effizienz-Bestimmung der *RASSF1A*-Methylierung in Brustkrebsseren gegenüber der Kontrollkohorte (gesund und benigne). Dargestellt ist eine ROC-Kurve (rot) mit einer Diskriminierungsstärke (AUC) von 0,617 ($P < 0,0001$). Diagonale Linie (schwarz gestrichelt) repräsentiert eine AUC von 0,5 bei der eine Diskriminierung zwischen Kontroll- und Testgruppe nicht mehr möglich ist. Jeder Punkt innerhalb der ROC-Kurve zeigt das Verhältnis von Sensitivität und Spezifität in Bezug zu dem jeweils bestimmenden Schwellenwert.

Die AUC für die *RASSF1A*-Methylierung in der zusammengefassten Kontrollgruppe benigne und normal betrug 0,617 und besaß bei einem 95-prozentigen Konfidenzintervall von 0,553–0,680 mit $P < 0,001$ Signifikanz. Folglich wurde in 61,7% der Fälle der Testgruppe ein höherer Methylierungsgrad im Vergleich zur Kontrollgruppe (gesund und benigne) erreicht (Abb. 3-10B). Der Schwellenwert für eine 100% Spezifität betrug 4,9% und zeigte einen Sensitivitätswert von 7,4%. Diesen Werten entsprachen 10 Richtig-Positive Tumoren und bedingten 126 Falsch-Negative. Entsprechend dem Schwellenwert wurden alle 132 Kontrollseren als negativ erkannt (Richtig-Negative). Bei einem Schwellenwert von 4,9% hat die Patientin bei Positivität des Tests eine 100%ige Wahrscheinlichkeit (PPV) an einem Tumor erkrankt zu sein, während bei Negativität des Tests zu 51% Wahrscheinlichkeit (NPV) tatsächlich keine Erkrankung vorliegt. Dem gegenüber zeigte sich bei einem Schwellenwert von 0,02% ein PPV=60% und ein NPV=64%. In Tabelle 3-5 sind die ROC-basierten Effizienzwerte basierend auf unterschiedlich definierten Grenzwerten für die *RASSF1A*-Methylierung zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Effizienz der *RASSF1A*-Methylierung

| Biomarker | Schwellenwert | Biomarker-Effizienz | | | |
|----------------|---------------|---------------------|------------|------|-----|
| | | Sensitivität | Spezifität | PPV | NPV |
| <i>RASSF1A</i> | 4,92% | 7,4% | 100% | 100% | 51% |
| <i>RASSF1A</i> | 0,02% | 46,3% | 76% | 60% | 64% |

PPV: Positive Predictive Value; NPV: Negative Predictive Value.

3.1.2.4 EFFIZIENZ DES 3-GEN-PANELS MIT *ITIH5*, *DKK3* UND *RASSF1A*

Die noch unzureichende Sensitivität der *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung sollte durch die Kombination mit der *RASSF1A*-Methylierung erhöht werden. Das 3-Gen-Panel erreichte eine kumulative Sensitivität von 67% mit einer Spezifität von 69% in Seren von gesunden Frauen und 82% in Seren von Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust (PMR-Wert>0%). Dabei zeigte die Tumorgruppe eine hochsignifikante ($P<0,0001$) mittlere 10-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $1,04\% \pm 0,31\%$) im Vergleich zu den Kontrollseren von gesunden Probandinnen (mittlerer Methylierungsgrad: $0,10\% \pm 0,02\%$) und eine mittlere 39-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz im Vergleich zu der benignen Kontrollgruppe (mittlerer Methylierungsgrad: $0,03\% \pm 0,01\%$). Gegenüber der Organ-spezifischen Kontrollgruppe der Kolonkarzinome zeigten die Mammakarzinom-Proben eine 1,5-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $0,66\% \pm 0,24\%$) (Abb. 3-11A).

Die AUC für das 3-Gen-Panel in der zusammengefassten Kontrollgruppe benigne und gesund betrug 0,712 und besaß bei einem 95-prozentigen Konfidenzintervall von 0,653-0,770 mit $P<0,0001$ Signifikanz (Abb.3-10 B). Folglich wurde in 71,2% der Fälle der Testgruppe ein höherer Methylierungsgrad im Vergleich zur Kontrollgruppe (gesund und benigne) erreicht. Bei einem über die ROC-Analyse ermittelten Schwellenwert von 1,62% betrug die Spezifität 100% mit einem Sensitivitätswert von 10,1%. Diesen Werten entsprachen 14 Richtig-Positive Tumoren und bedingten 122 Falsch-Negative. Entsprechend dem Schwellenwert wurden alle 132 Kontrollseren als negativ erkannt (Richtig-Negative). Bei diesem Schwellenwert hat die Patientin einen PPV von 100% und einen NPV von 52% (Abb. 3-11B).

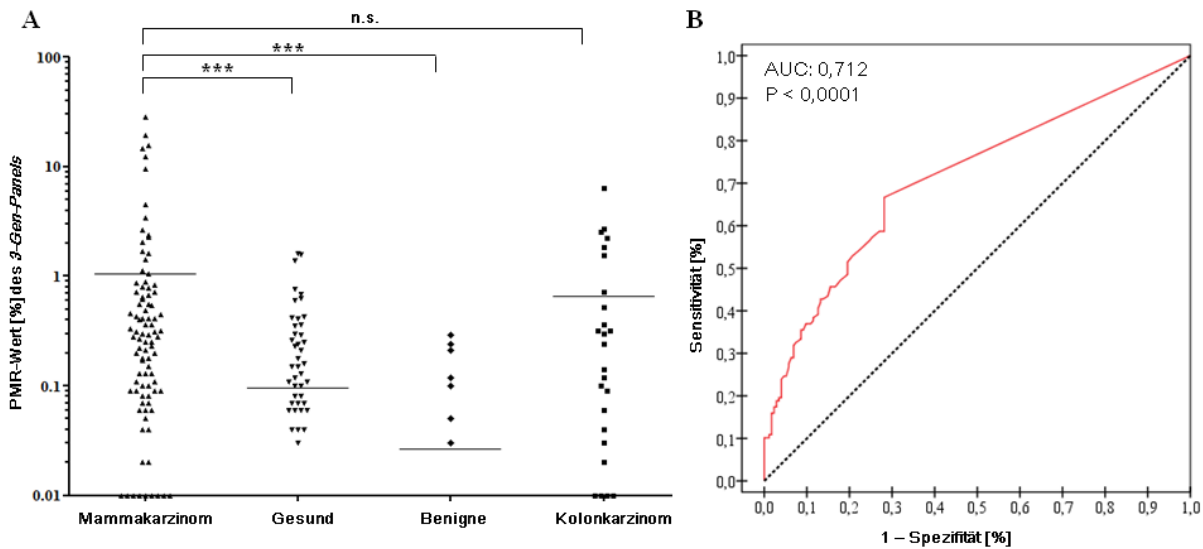


Abbildung 3-11: Biomarker-Effizienz des 3-Gen-Panels. (A) Scatter Plot Darstellung der PMR-Mittelwerte des 3-Gen-Panels im Validierungskollektiv (Ordinate) für jedes der gemessenen Seren (Abszisse) eingeteilt in Tumor- und Kontrollgruppe. Die Kombination von *DKK3*, *ITIH5* und *RASSF1A* resultiert in einer kumulativen Sensitivität von 67% mit einer Spezifität von 69% in gesunden und 82% in benignen Kontrollen mit einem im Mittel hochsignifikanten Unterschied (*Mann-Whitney-U-Test*). *** $P < 0,0001$; horizontale Linie, Mittelwert; PMR, *percentage of methylated reference*; n.s., nicht-signifikant. (B) Effizienz-Bestimmung des 3-Gen-Panels in Brustkrebsseren gegenüber der Kontrollkohorte (gesund und benigne). Dargestellt ist eine ROC-Kurve (rot) mit einer Diskriminierungsstärke (AUC) von 0,712 ($P < 0,0001$). Die diagonale Linie (schwarz gestrichelt) repräsentiert eine AUC von 0,5 bei der eine Diskriminierung zwischen Kontroll- und Testgruppe nicht mehr möglich ist. Jeder Punkt innerhalb der ROC-Kurve zeigt das Verhältnis von Sensitivität und Spezifität in Bezug zu dem jeweils bestimmenden Schwellenwert.

Neben der kombinierten *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung und dem 3-Gen-Panel wurden weitere mögliche Genkombinationen betrachtet (Tabelle 3-6). So zeigte sich auch für die kombinierte *RASSF1A*- und *DKK3*-Methylierung eine hochsignifikante ($P < 0,0001$) mittlere 8,5-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $1,102\% \pm 0,319\%$) im Vergleich zu den Kontrollseren von gesunden Probandinnen (mittlerer Methylierungsgrad: $0,13\% \pm 0,03\%$) sowie eine hochsignifikante ($P < 0,0001$) mittlere 38-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz im Vergleich zu der benignen Kontrollgruppe (mittlerer Methylierungsgrad: $0,03\% \pm 0,01\%$). Die kombinierte *RASSF1A*- und *ITIH5*-Methylierung zeigte ebenfalls eine hochsignifikante ($P < 0,0001$) mittlere 9-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $1,35\% \pm 0,42\%$) im Vergleich zu den Kontrollseren von gesunden Probandinnen (mittlerer Methylierungsgrad: $0,14\% \pm 0,03\%$) und eine mittlere 33-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz im Vergleich zu der benignen Kontrollgruppe (mittlerer Methylierungsgrad: $0,04\% \pm 0,01\%$). Im Vergleich mit der Kontrollgruppe des Kolonkarzinoms zeigte sich für das *RASSF1A*-*DKK3*-Duplett eine mittlere 2-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $0,51\% \pm$

0,181%) und für das *RASSF1A-ITIH5*-Duplett eine mittlere 1,5-fach gesteigerte Methylierungsfrequenz (mittlerer Methylierungsgrad: $0,88\% \pm 0,35\%$) im Mammakarzinom. Das divergente *RASSF1A*-Methylierungslevel im Normalserum bedingte aufgrund der kumulativen Verrechnung der *DKK3*- und *ITIH5*-Methylierung einen Spezifitätsverlust der Biomarker-Kombinationen.

Die ROC-Analyse zeigte für das *3-Gen-Panel* (PMR >0%) mit einer AUC von 71,2% die stärkste diskriminatorische Kraft zwischen Test- und Kontrollgruppe. Hingegen präsentierte sich das *ITIH5-DKK3* Duplett ohne Definierung eines Schwellenwertes mit einer starken Spezifität von 94% und einem hohen PPV von 85%.

Tabelle 3-6: Sensitivität und Spezifität der Blut-basierten Detektion von Brustkrebs der verschiedenen Marker-Kombinationen

| Gen ^a | Sensitivität | | Spezifität | | P Wert ^b | AUC (95% CI) | PPV | NPV |
|--|----------------------|-----------|--------------------------|-----------|--|----------------------------|-----------|-----------|
| | Brustkrebs cfDNA | | Gesund und Benigne cfDNA | | | | | |
| | Methylierung positiv | % | Methylierung negativ | % | | | | |
| <i>RASSF1A</i> <i>ITIH5</i> | 75 von 138 | 54 | 127 von 174 | 73 | $7.8 \times e^{-6}$ | 0,647 (0,585-0,709) | 61 | 67 |
| <i>RASSF1A</i> <i>DKK3</i> | 82 von 138 | 59 | 131 von 174 | 75 | $1.6 \times e^{-8}$ | 0,686 (0,626-0,747) | 66 | 70 |
| <i>DKK3</i> <i>ITIH5</i> | 55 von 138 | 40 | 164 von 174 | 94 | $1.6 \times e^{-7}$ | 0,673 (0,611-0,735) | 85 | 66 |
| <i>RASSF1A</i> <i>DKK3</i> <i>ITIH5</i> | 92 von 138 | 67 | 125 von 174 | 72 | $1.3 \times e^{-10}$ | 0,712 (0,653-0,770) | 65 | 73 |

^amin. ein Gen der Kombination ist methyliert; ^bExakter Test nach Fisher, Exakte Signifikanz (2-seitig) von 0,05; AUC: Area Under Curve; CI: Confidence Interval; NPV: Negative Predictive Value; PPV: Positive Predictive Value.

3.1.3 KORRELATION DER *ITIH5*-, *DKK3*-, UND *RASSF1A*-METHYLIERUNG MIT KLINIKO-PATHOLOGISCHEN PARAMETERN

Um mögliche Assoziationen zu den klinischen Parametern der Patientinnen aufzeigen zu können, wurde der Methylierungsstatus von *ITIH5*, *DKK3* und *RASSF1A* hinsichtlich des Alters bei Diagnosestellung, der Tumorgraduierung, der Tumorgroße, dem Lymphknoten-Status, dem Hormon-Rezeptor-Status und dem Menopausen-Status ausgewertet. Die Detektion einer *ITIH5*-, *DKK3*- und *RASSF1A*-Methylierung war sowohl im Test- als auch im Validierungskollektiv unabhängig vom Alter der Patientin, der Tumorgraduierung, dem Lymphknoten-Status sowie dem Hormon-Rezeptor-Status ($P > 0,05$). Dahingegen zeigte sich im Validierungskollektiv eine signifikante ($P = 0,034$) Assoziation der *DKK3*-Methylierung mit der wichtigen Subgruppe der kleinen Tumoren (pT 1-2), die in Kombination mit der *ITIH5*-Methylierung verstärkt wurde ($P = 0,006$) (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Assoziation der *DKK3*- und *ITIH5*-Methylierung in cfDNA mit der TumorgroÙe

| | TumorgroÙe (pT) | | | | |
|---|-----------------|--------|--------|--------------------------|---------------------|
| | n ^a | pT 1-2 | pT 3-4 | Korrelation ^b | P-Wert ^c |
| <i>DKK3</i> Serum cfDNA | 136 | | | | |
| unmethyliert | | 86 | 10 | 0,182 | 0,034 |
| methyliert | | 40 | 0 | | |
| <i>ITIH5</i> Gewebe-DNA | | | | | |
| <i>DKK3</i> / <i>ITIH5</i> Serum cfDNA | 136 | | | | |
| unmethyliert | | 72 | 10 | 0,229 | 0,006 |
| methyliert | | 54 | 0 | | |

^aNur weibliche Patientinnen mit einem primären Brusttumor; ^bPearson Korrelationskoeffizient; ^cExakter Test nach Fisher, Exakte Signifikanz (2-seitig) von 0,05.

Eine ROC-Analyse der cfDNA-Methylierung in der pT1-2 Subgruppe zeigte zudem eine gesteigerte Sensitivität der kombinierten *DKK3*- und *ITIH5*-Methylierung im Validierungskollektiv von 40% auf 43% (AUC: 0,688 (95% Konfidenzintervall: 0,624-0,752)).

Neben der Subgruppe der kleineren Tumoren wurde ebenfalls ein interessanter Zusammenhang mit dem menopausalen-Status der Patientinnen deutlich. Im Testkollektiv zeigte sich für die *DKK3*- und *ITIH5*-Methylierung, einzeln sowie in Kombination, in prämenopausalen Patientinnen im Vergleich mit den postmenopausalen Frauen eine gesteigerte klinische Effizienz (Tab. 3-8). So war die klinische Sensitivität für das *DKK3*-*ITIH5* Duplett um 6% im Vergleich mit den postmenopausalen Frauen erhöht, wobei die *ITIH5*-Methylierung um 10% und die *DKK3*-Methylierung um 4% in der prämenopausalen Subgruppe gesteigert vorlag.

Tabelle 3-8: Sensitivität und Spezifität der Blut-basierten Brustkrebs Detektion in prä- und postmenopausalen Patientinnen im Testkollektiv

| Gen | Testkollektiv ^a | | | | | | | |
|--|----------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | Prämenopausal | | | | Postmenopausal | | | |
| | Methylierung positiv | Methylierung negativ | P-Wert ^b | AUC (95% CI) | Methylierung positiv | Methylierung negativ | P-Wert ^b | AUC (95% CI) |
| <i>DKK3</i> | 8 von 22 (36%) | 23 von 23 (100%) | 0,033 | 0,682 (0,524-0,840) | 29 von 90 (32%) | 78 von 79 (99%) | 0,001 | 0,655 (0,572-0,737) |
| <i>ITIH5</i> | 7 von 22 (32%) | 23 von 23 (100%) | 0,062 | 0,659 (0,498-0,820) | 20 von 90 (22%) | 73 von 79 (92%) | 0,108 | 0,572 (0,486-0,659) |
| <i>DKK3</i>/ <i>ITIH5</i>^c | 10 von 22 (46%) | 23 von 23 (100%) | 0,008 | 0,727 (0,576-0,879) | 36 von 90 (40%) | 71 von 79 (90%) | 0,001 | 0,648 (0,565-0,731) |

^aEinteilung des Menopausalen-Status nach (McKinlay *et al.* 1985) ab ≥51 Jahren in der Test- und Kontrollgruppe; ^bExakter Test nach Fisher, Exakte Signifikanz (2-seitig) von 0,05; ^cmin. ein Gen ist methyliert; CI: Confidence Interval; AUC: Area Under Curve.

Diese Assoziation konnte im Validierungskollektiv bestätigt werden. Hier zeigte die *DKK3*-Methylierung, die kombinierte *DKK3*-*ITIH5*-Methylierung sowie das 3-Gen-Panel

eine höhere Sensitivität in Patientinnen mit einem prämenopausalen-Status. Einzelnen betrachtet lag die *RASSF1A*-Methylierungsfrequenz hingegen in der postmenopausalen Subgruppe höher vor (Tab. 3-9).

Tabelle 3-9: Sensitivität und Spezifität der Blut-basierten Brustkrebs Detektion in prä- und postmenopausalen Patientinnen im Validierungskollektiv

| Gen | Validierungskollektiv ^a | | | | | | | |
|---|------------------------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| | Prämenopausal | | | | Postmenopausal | | | |
| | Methylierung positiv | Methylierung negativ | P-Wert ^b | AUC (95% CI) | Methylierung positiv | Methylierung negativ | P-Wert ^b | AUC (95% CI) |
| <i>DKK3</i> | 8 von 21 (38%) | 21 von 21 (100%) | 0,037 | 0,690 (0,526-0,855) | 33 von 117 (28%) | 112 von 114 (98%) | 0,001 | 0,627 (0,555-0,700) |
| <i>ITIH5</i> | 3 von 21 (14%) | 21 von 21 (100%) | 0,434 | 0,571 (0,395-0,748) | 16 von 117 (14%) | 107 von 114 (94%) | 0,304 | 0,539 (0,465-0,614) |
| <i>RASSF1A</i> | 9 von 21 (43%) | 16 von 21 (80%) | 0,192 | 0,619 (0,446-0,792) | 54 von 117 (46%) | 81 von 114 (71%) | 0,010 | 0,599 (0,526-0,673) |
| <i>DKK3/ITIH5^c</i> | 11 von 21 (52%) | 21 von 21 (100%) | 0,004 | 0,762 (0,611-0,912) | 44 von 117 (37%) | 105 von 114 (93%) | <0,0001 | 0,653 (0,582-0,724) |
| <i>RASSF1A/ DKK3/ ITIH5^c</i> | 15 von 21 (71%) | 17 von 21 (81%) | 0,002 | 0,7773 (0,628-0,918) | 77 von 117 (66%) | 76 von 114 (68%) | <0,0001 | 0,684 (0,61-0,753) |

^aEinteilung des Menopausalen-Status nach (McKinlay *et al.* 1985) ab ≥ 51 Jahren in der Test- und Kontrollgruppe; ^bExakter Test nach Fisher, Exakte Signifikanz (2-seitig) von 0,05; ^cmin. ein Gen ist methyliert; CI: *Confidence Interval*; AUC: *Area Under Curve*.

Eine ROC-Analyse verdeutlichte die Assoziation der Methylierung mit dem Menopausalen-Status der Patientin. So wurde im Validierungskollektiv für die *DKK3* und *ITIH5* Genkombination bei einer Spezifität von 100% eine Sensitivität von 52% in prämenopausalen Frauen erreicht, während in der postmenopausalen Subgruppe die Sensitivität bei 38% und die Spezifität bei 93% lag. Bei einem Schwellenwert von 1,51% und damit einer 100% Spezifität in sowohl prä- wie auch postmenopausal untersuchten Proben zeigte sich noch eine Sensitivität von 24% in Prämenopausalen, während in den postmenopausalen Frauen die Detektion einer Methylierung auf ein Sensitivitätslevel von 6% reduziert wurde. Abbildung 3-12 zeigt die ROC-Kurven für das *DKK3-ITIH5* Duplett und das *3-Gen-Panel* in prä- und postmenopausalen Frauen.

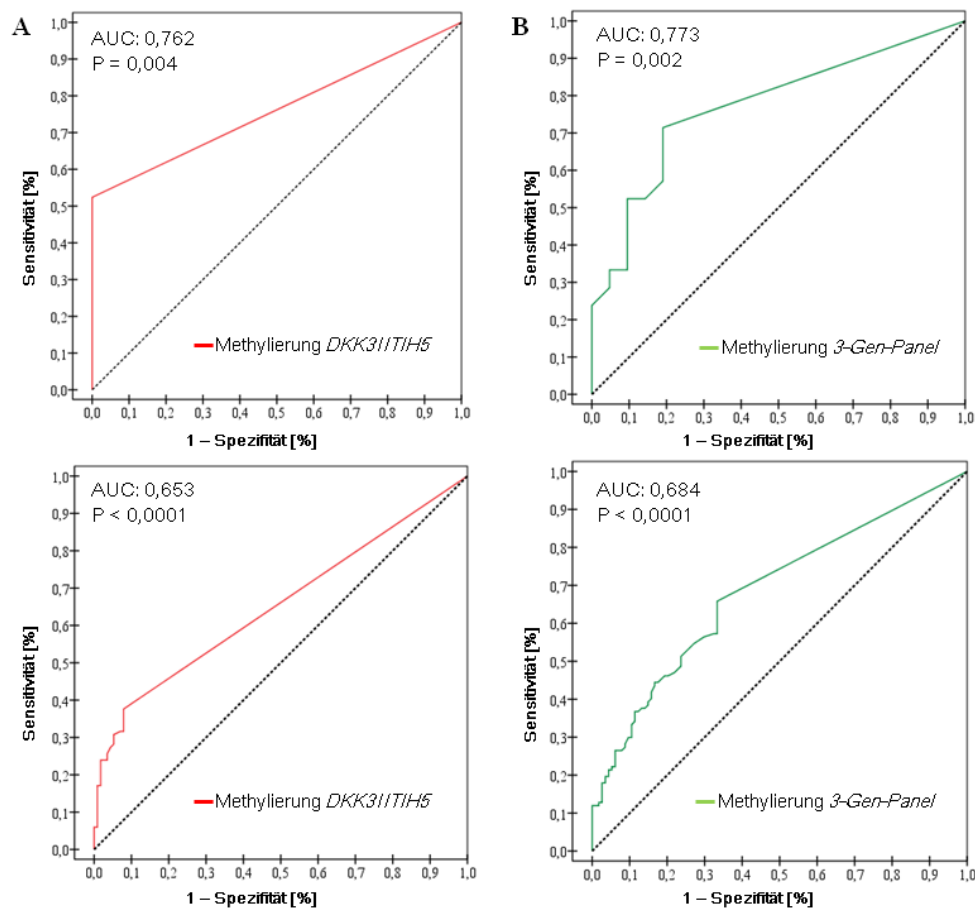


Abbildung 3-12: Das *ITIH5-DKK3* Biomarker-Duplett zeigt eine starke klinische Effizienz in prämenopausalen Frauen. (A) Effizienz Bestimmung der kombinierten *ITIH5*- und *DKK3*-Methylierung in prämenopausalen Brustkrebs-Patientinnen gegenüber prämenopausalen gesunden Frauen (obere Abbildung) im Vergleich zur Subgruppe der postmenopausalen Frauen (untere Abbildung). (B) Effizienz Bestimmung der kumulativen Methylierung des *3-Gen-Panels* in prämenopausalen Brustkrebs-Patientinnen gegenüber prämenopausalen gesunden Frauen (obere Abbildung) im Vergleich zur Subgruppe der postmenopausalen Frauen (untere Abbildung). In der Subgruppe der prämenopausalen Frauen zeigte sich die Methylierung des *DKK3-ITIH5*-Dupletts sowie das *3-Gen-Panels* anhand der AUC bis zu 10% effizienter im Vergleich zu den postmenopausalen Frauen.

3.2 DIE FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON ITIH5 IM HUMANEN MAMMAKARZINOM

Das normale Drüsenepithel der Brust exprimiert größere Mengen des ITIH5-Proteins, während die Expression in 42% aller Mammakarzinome verloren geht (Veeck *et al.* 2008b). Kennzeichnend für die evidente Rolle von ITIH5 im humanen Mammakarzinom ist die starke prognostische Kraft einer hohen ITIH5-Expression in Patientinnen mit einem klinisch relevanten nodal-negativen Mammakarzinom. Dahingegen führt der Verlust des ITIH5-Proteins zu einem verkürzten rezidivfreien Überleben sowie Gesamtüberleben der Brustkrebs-Patientin (Veeck *et al.* 2008b). Trotz dieser markanten Merkmale von ITIH5 in der malignen Progression der Brust, ist es bisher noch nicht gelungen einen Signalweg-basierten

Mechanismus des ITIH5-Moleküls aufzuzeigen. Die vorliegenden deskriptiven Daten bilden somit eine Basis für die weiterführende funktionelle Charakterisierung des ITIH5-Wirkungsspektrums in humanen Brustkrebszelllinien. Die in dieser Arbeit angestrebte funktionelle Analyse des ITIH5-Moleküls erfolgte auf der Grundlage zweier ITIH5-basierter Zellkulturmodelle, welche die suppressiven Eigenschaften von ITIH5 experimentell untermauern sollten. Während das *in vitro* Tumormodell MDA-MB-231 bereits retrospektiv generiert wurde (Rose 2013), wurde das ergänzende Tumormodell BT20 im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Diese *in vitro* Tumormodelle dienten abschließend zur Identifizierung und Charakterisierung ITIH5-assoziiierter Zielgene anhand von *Microarray*-basierten Genexpressionsanalysen.

3.2.1 ETABLIERUNG EINES *IN VITRO* MAMMAKARZINOM-MODELLS

Ein geeignetes Tumormodell für die Wiederherstellung einer ITIH5-Expression, ähnlich des Normalgewebes, stellte die basale, invasive Brustkrebszelllinie BT20 dar. Diese Zelllinie zeigt in Folge einer aberranten Hypermethylierung regulatoriver DNA-Elemente im *ITIH5*-Promotor einen vollständigen Verlust der ITIH5-Expression (Veeck *et al.* 2008b) und stellte ein exzellentes Modell für die Generierung eines stabilen ITIH5 *in vitro* Expressionsmodell (*gain-of-function*) dar. Der ITIH5-Überexpressionsvektor pBK-CMV wurde dazu stabil in das Genom der BT20-Zelllinie integriert. Vor Beginn der Transfektion wurde der notwendige Selektionsdruck über eine entsprechende Genetecin-Verdünnungsreihe mit BT20-Wildtypzellen bestimmt (siehe Material und Methoden 2.14.4). Daraus ergab sich für die Selektion der ITIH5-Klone eine Genetecin-Konzentration von 200 µg/ml. Insgesamt wurden 21 ITIH5-Klone (+ITIH5) und 12 entsprechende Leerklone (-ITIH5) in Reinkultur gebracht. Die transgene ITIH5-Reexpression der in Reinkultur gebrachten Klone wurde zunächst für den jeweiligen Einzel-Klon auf mRNA- und Proteinebene korrespondierend zu den Leervektor-Kontrollzellen verifiziert (Abb. 3-13A). Die Mehrheit der ITIH5-Klone (76%, 16 von 21) zeigte einen deutlichen Anstieg der *ITIH5*-Expression (FC>6) gegenüber den Leerklonen. Der mediane Anstieg der *ITIH5*-Expression innerhalb der ITIH5-Klone war in Kontrast zu den Leerklonen hochsignifikant (P<0,0001) differenziell und kennzeichnend durch eine 581-fache Überexpression (Spannweite: 0,13–22,13; 25-75% Quartile: 23,9-1,75) (Abb. 3-13B).

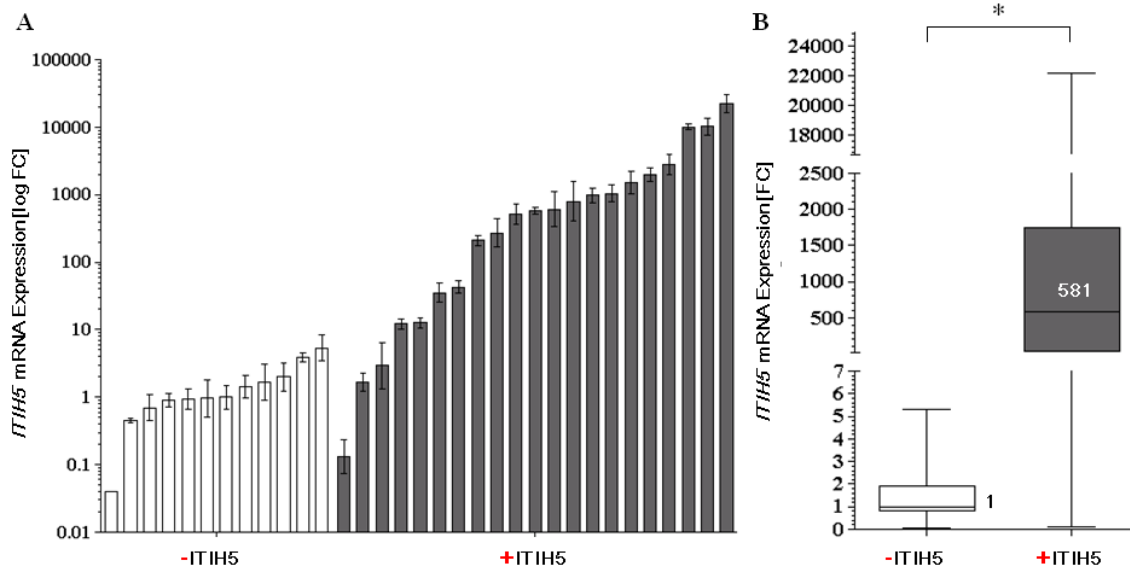


Abbildung 3-13: Die Generierung eines Zellkultur-basierten *gain-of-function* Tumormodells der Brust.

Die ektopische Reexpression der stabil-transfizierten ITIH5 BT20-Klone wurde zunächst mittels der *Real-Time* PCR-Methode verifiziert. **(A)** *Real-Time* PCR-Messung der *ITIH5*-mRNA-Expression (*Fold Change*, FC) in 12 Leer- und 21 ITIH5-Klonen. Die Berechnung der Expression der ITIH5-Klone (+ITIH5) erfolgte durch Normierung auf die Expression der Leerkclone (-ITIH5). Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. **(B)** Box-Plot-Darstellung zum Vergleich der *ITIH5*-Expression in den analysierten ITIH5- und Leerklonen. Die Berechnung der medianen Expression der ITIH5-Klone erfolgte durch Normierung auf die mediane Expression der Leerkclone. Die ITIH5-Klone zeigen eine im Median 581-fach gesteigerte *ITIH5*-Expression im Vergleich zu den Leerklonen. * $P < 0,05$; horizontale Linien: Median; vertikale Linien: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; zweiseitiger *Mann-Whitney* U Test.

Im nächsten Schritt wurden ausgewählte Einzel-Klone hinsichtlich der ITIH5-Proteinexpression analysiert. Neben drei Leerklonen (#5, #6, #8) wurden drei ITIH5-Klone (#14, #13, #10) mit geringem Expressionslevel ($FC < 200$), acht ITIH5-Klone (#16, #5, #20, #12, #21, #22, #4, #15) mit einem mittleren Expressionslevel ($FC = 500-2.800$) und drei ITIH5-Klone (#7, #18, #19) mit einem hohem Expressionsniveau ($FC > 10.000$) untersucht. Erwartungsgemäß zeigten die Leerkclone keine nachweisbare Expression des ITIH5-Proteins. Die ITIH5-Klone mit einem $FC < 200$ zeigten ebenfalls keine ITIH5-Expression auf Proteinebene. Dementgegen zeigten alle ITIH5-Klone mit einem mittleren Expressionslevel (ausgeschlossen Klon #12) eine schwache (#16, #5, #20, #22) bis starke (#21, #4, #15) Proteinexpression. Die ITIH5-Klone mit einem $FC > 10.000$ wiesen eine starke Expression des ITIH5-Proteins auf (Abb. 3-14).

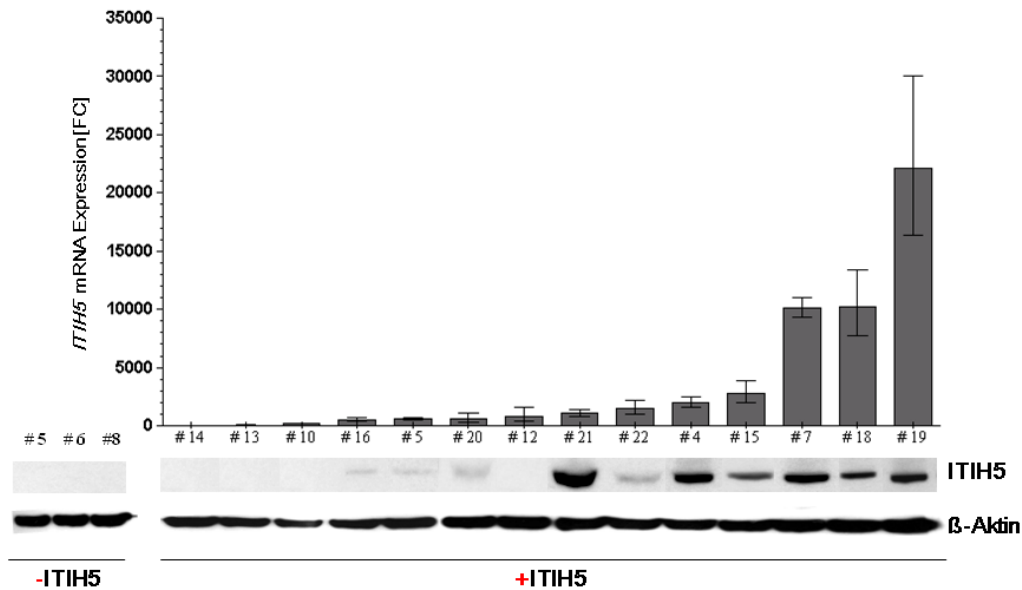


Abbildung 3-14: Die ITIH5-Proteinexpression in der stabil transfizierten humanen Mammakarzinom-Zelllinie BT20. Darstellung der Western Blot-Analyse der ITIH5-Proteinexpression in drei Leerklonen (-ITIH5) und 12 ITIH5-Klonen (+ITIH5) im Vergleich mit dem Klon-spezifischen mRNA-Expressionslevel. Die Leerkclone (-ITIH5) zeigen keine ITIH5-Expression, während in den ITIH5-Klonen mit einem schwachen Expressionsniveau ebenfalls kein ITIH5-Protein nachweisbar ist. Ab einem FC > 1.000 (Klon #21) kann eine erhöhte Expression des ITIH5-Proteins dargelegt werden (Ausnahme Klon #22). β -Aktin wurde als Ladekontrolle für die Gesamtkonzentration an Protein verwendet.

Basierend auf diesen Expressionsdaten wurden die unabhängigen Leerkclone #5, #6 und #8, die keine endogene ITIH5-Expression aufwiesen, sowie der ITIH5-Klon #5 mit einer geringeren Proteinexpression und die ITIH5-Klone #7, #15 und #19 mit einer starken Proteinexpression nachfolgend hinsichtlich der möglichen biologischen Relevanz der ITIH5-Expression untersucht.

3.2.2 DIE FUNKTIONELLE *IN VITRO* ANALYSE DER ITIH5-EXPRESSION IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20

Durch die Bestätigung der erfolgreichen ITIH5-Reexpression auf mRNA- und Proteinebene konnte im nächsten logischen Schritt, die mögliche funktionelle Auswirkung der ITIH5-Überexpression auf den Phänotyp der BT20-Mammakarzinomzellen analysiert werden. Durchgeführt wurden verschiedene funktionelle Tests, mit denen fundamentale Eigenschaften von Tumorzellen bewertet werden können. Der Verlust der Zellzykluskontrolle, ein meist frühes Ereignis in der Tumorgenese, führt oftmals zu einer gesteigerten Proliferation und ist daher als charakteristische Eigenschaft von Tumorzellen anzusehen (Hanahan & Weinberg 2000). Weitere Merkmale, die Hinweise auf die biologische Relevanz von ITIH5 geben können, sind Veränderungen in der Migrationsfähigkeit des generierten Tumormodells sowie

differenzielle Unterschiede in der Adhäsionsfähigkeit zwischen der Kontrollgruppe (-ITIH5) und der Testgruppe (+ITIH5).

3.2.2.1 DER EINFLUSS VON ITIH5 AUF PROLIFERATIVE EIGENSCHAFTEN IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20

Im ersten Schritt sollte das Proliferationsverhalten der invasiven Brustkrebszelllinie BT20 bestimmt und der potentielle Effekt einer ITIH5-Reexpression auf diese Eigenschaft analysiert werden. Die Untersuchung der Zellproliferation wurde mit einem Test durchgeführt, der auf einer Dehydrogenasen-vermittelten mitochondrialen Reduktion eines Tetrazoliumderivats (XTT) basiert, welches von vitalen, stoffwechselaktiven Zellen in das H₂O lösliche orange Formazan umgewandelt wird. Der Farbumschlag steht in einem linearen Verhältnis zu der Zellzahl und lässt sich durch Absorptionsmessung quantifizieren. Je Ansatz wurden 1.000 Zellen in 96-well Kulturschalen ausgesät. Die Zunahme der Zellzahl wurde alle 24 Stunden über einen Zeitraum von vier Tagen gemessen. Für die bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Absorptionswerte je Ansatz auf den gleichen Zeitpunkt (Tag 1) normiert. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt und der Mittelwert der Ergebnisse betrachtet und ausgewertet.

Der direkte Vergleich der vier unabhängigen ITIH5-Klonen mit drei unabhängigen Leerklonen zeigte, dass die ITIH5-Reexpression zu einer verminderten Proliferationsrate der BT20-Zellen führte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-15 aufgeführt und zeigen die relative Proliferationsrate als viertägige Verlaufskurve sowie in der zusammenfassenden Box-Plot-Darstellung für alle untersuchten Klone. Bezogen auf den Leerklon #8 mit der höchsten Proliferationsrate zeigte der ITIH5-Klon #15 die stärkste Proliferationsminderung mit einer maximalen Differenz von 36% am vierten Tag der Messung (Abb. 3-15A). Die weiteren analysierten ITIH5-Klone kennzeichneten sich ebenfalls durch eine Verminderung der Proliferation mit einer maximalen Differenz von 29% (ITIH5-Klon #5), 28% (ITIH5-Klon #7) und 30% (ITIH5-Klon #19) am vierten Tag der Messung. Dementgegen wies der Leerklon #6 eine ebenso starke Proliferationsrate wie der Leerklon #8 auf, während der Leerklon #5 geringer (12% Proliferationsminderung in Bezug zum Leerklon #8 und #6) proliferierte. Über die Zusammenfassung der unabhängigen Einzel-Klone konnte eine im Median signifikante ($P=0,014$) 1,5-fach geminderte Proliferation nach 96 Stunden (Spannweite: 5,2 – 9,8; 25-75% Quartile: 6,6 - 9,3) in den ITIH5-Klonen beobachtet werden (Abb. 3-15B). Die prozentuale mediane Proliferationsreduktion belief sich dabei auf 35% in den ITIH5-positiven Zellen. Allerdings schwankten die gemessenen Absorptionswerte

innerhalb der drei unabhängigen Versuche stark und führten somit zu hohen Standardabweichungen der gemittelten Werte.

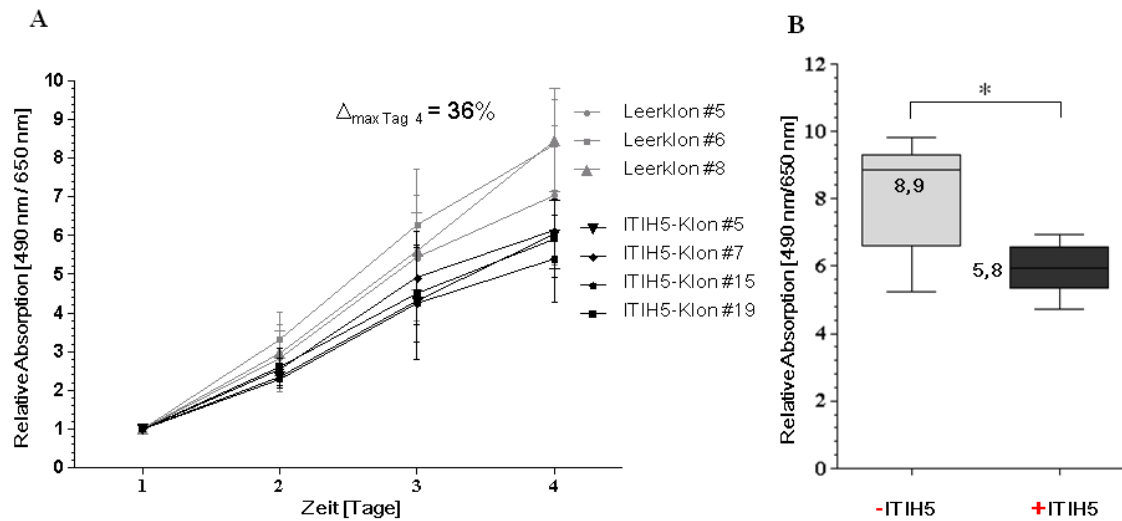


Abbildung 3-15: Einfluss der ITIH5-Reexpression auf die Zellproliferation humaner BT20-Mammakarzinomzellen. Die kolorimetrische Bestimmung der Zellproliferation (XTT-Test) durch Absorptionmessungen (490 nm/650 nm) erfolgten über einen Zeitraum von 4 Tagen. (A) Vergleichende Darstellung des Proliferationsverhaltens der Leerkclone #5, #6, #8 und den unabhängigen ITIH5-Klonen #19, #7, #5, #15. Vertikale Linien: Standardfehler des Mittelwertes (*Standard Error of Mean*, SEM) der Dreifachbestimmung; Δ_{\max} : maximale Differenz der jeweiligen Messreihe; Normierung: die Werte jeder Versuchsreihe wurden auf Tag 1 normiert. (B) Box-Plot-Darstellung der Proliferationsrate aller untersuchten Leerkclone (- ITIH5) (n=3) und ITIH5-Klone (+ ITIH5) (n=4) nach 96 Stunden. Die ITIH5-Klone zeigen eine signifikante, im Median 1,5-fache Proliferationsreduktion gegenüber den Leerklonen. *P<0,05; horizontale Linie: Median; vertikale Linie: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; zweiseitiger *Mann-Whitney* U Test.

3.2.2.2 DER EINFLUSS VON ITIH5 AUF DIE KOLONIEBILDUNG IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20

Der Kolonienbildungstest (engl. *Colony Formation Assay*, CFA) bietet neben dem XTT-*Assay* eine weitere Möglichkeit der Zellproliferationsanalyse. Zudem erlaubt dieser *Assay* eine Aussage über mögliche morphologische Unterschiede der Zellen sowie das Migrationsverhalten und das Koloniebildungsvermögen im Allgemeinen. Zudem wird die Interaktion der Zellen untereinander und zu der ECM (Hanahan & Weinberg 2011) in diesem Versuch näher betrachtet. Für die Bestimmung des Kolonienbildungsvermögens wurden pro Versuchsansatz 3 x je 1.000 Zellen pro Zellklon in 6-well Kulturschalen ausgesät. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt.

Die Ergebnisse für die analysierten Klone sind in Abbildung 3-15 zusammengestellt. Makroskopisch zeigte sich nach 14 Tagen ein reduziertes Koloniewachstum der ITIH5-transfizierten BT20-Zellen. Die Messung der fixierten und Kristallviolett gefärbten Kolonien erfolgte durch eine semiquantitative densitometrische Messung, um die qualitativ beobachtete differenzielle Wachstumsverminderung der ITIH5-Klone innerhalb der besiedelten Oberfläche

zu bestimmen. Die Auswertung ergab, im Einklang mit der makroskopischen Beobachtung, eine moderate Verminderung der mit ITIH5-Klonen bewachsenen Fläche (Abb. 3-16A). Das mediane Kolonienwachstum der BT20 Kontroll-Zellen wurde gleich 100% gesetzt (Mittleres Wachstum: $99,4 \pm 23,3$ (STABW); Spannweite: 67,3-145,4) und diente der Normierung. Im Vergleich hierzu lag die mediane Reduktion der Kolonienbildung nach ITIH5-Reexpression mit 24% (Mittleres Wachstum: $72,89 \pm 26,8$ (STABW); Spannweite: 35,7-112,5) signifikant ($P < 0.05$) vor (Abb. 3-16B). Die lichtmikroskopische Analyse der Zellmorphologie von BT20-Einzelzellen ergab keinen Unterschied zwischen Leer- und ITIH5-transfizierten Zellen.

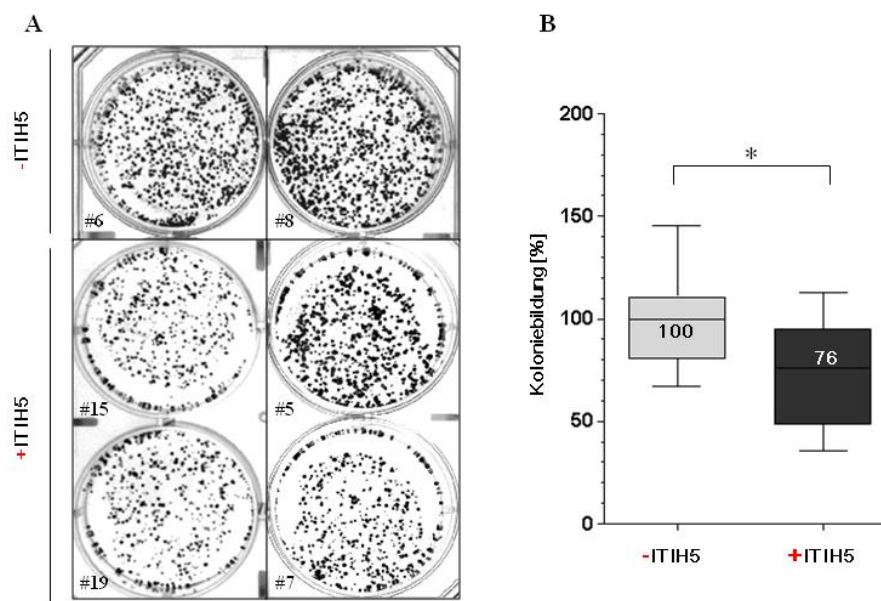


Abbildung 3-16: Der Einfluss der ITIH5-Reexpression auf das Kolonienbildungsvermögen humaner BT20-Mammakarzinomzellen. Für die Bestimmung des Kolonienbildungsvermögens wurden pro Versuchsansatz 3x je 1.000 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät, 14 Tage unter Standardbedingungen kultiviert, fixiert und für die Auszählung der Kolonien mit Kristallviolett angefärbt. (A) Die Repräsentative Darstellung von fixierten und gefärbten Kolonien zeigt eine leichte Reduktion der Zelldichte in den ITIH5-Klonen (+ITIH5) im Vergleich zu den Leerkolonien (-ITIH5). (B) Die Vergleichende Box-Plot-Darstellung verdeutlicht das verminderte Kolonienbildungsvermögen der BT20-Zellen nach ITIH5-Reexpression. Horizontale Linie: Median; vertikale Linie: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; * $P < 0.05$, zweiseitiger *Mann-Whitney U* Test.

3.2.2.3 DER EINFLUSS VON ITIH5 AUF DIE ZELL-MATRIX ADHÄSION IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20

Die Fähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie BT20 in Abhängigkeit der ITIH5-Expression innerhalb eines definierten Zeitrahmens auf einer Oberfläche zu adhären, wurde im nächsten Schritt untersucht. Zu diesem Zweck wurden die ITIH5-Klone im Vergleich zu den Leerkolonien einem Adhäsionstest unterzogen. Für die Quantifizierung der Adhäsionsraten wurde das Prinzip der Kristallviolettfärbung von fixierten Zellen angewendet: Je mehr adhären Zellen vorhanden waren, desto mehr Kristallviolett wurde absorbiert und konnte in

einem anschließendem Schritt aus den Zellen gelöst, fotometrisch quantifiziert und verglichen werden. Der Adhäsionstest wurde auf zwei unterschiedlichen Beschichtungsmaterialien, dem Zellmatrixprotein- und Wachstumsfaktorreichen Matrigel, welches die natürliche Basalmembran simuliert sowie der Hyaluronsäure (HA), einer Hauptkomponente der extrazellulären Matrix, durchgeführt. Auf dem Matrigel zeigten die analysierten ITIH5-Klone mit $2,150 \pm 0,500$ (Spannweite: 1,016 - 2,687; 25-75% Quartile: 1,722 - 2,394) im Vergleich zu den analysierten Leerklonen ($1,349 \pm 0,271$, Spannweite: 1,004 - 1,741; 25-75% Quartile: 1,042 - 1,619) eine deutlich höhere mediane Absorption (Abb. 3-17A und B). In Prozent ausgedrückt bedeutet dies, dass die BT20-Leerklone verglichen mit den BT20 ITIH5-Klonen eine mit 59,38% hochsignifikante ($P < 0,0001$) reduzierte Zell-Matrix Adhäsionsrate besaßen. Die zwischen Leer- und Vollklonen differenzielle Adhäsionsrate fiel auf mit Hyaluronsäure beschichteten Kulturplatten deutlich geringer aus. So zeigten die ITIH5-Klone mit $2,194 \pm 0,323$ (Spannweite: 1,768 - 2,889; 25-75% Quartile: 2,083 - 2,644) im Vergleich zu den Leerklonen mit $2,085 \pm 0,442$ (Spannweite: 1,271 - 2,762; 25-75% Quartile: 1,577 - 2,273) eine geringfügig erhöhte mediane Absorption (Abb. 3-17C und D), die einer 5,23% gesteigerten Adhäsionsrate der ITIH5-Klone entsprach. Zusätzlich wurde die Adhäsionsrate auf unbeschichteten Kulturplatten untersucht. Hier zeigte sich zwischen den BT20 Leer- und ITIH5-Klonen ein minimaler Streubereich von 1%, wobei die ITIH5-Klone ein Absorptionsniveau von 2,5 und die Leerklone ein Niveau von 2,53 aufwiesen (Abb. 3-17E und F). Die analoge Beurteilung der Zelladhäsionsrate von Leer- und ITIH5-Klonen auf unbeschichteten Kulturflaschen verdeutlichte den Einfluss der ITIH5-Reexpression auf die Zell-Matrix Adhäsion. Kennzeichnend war eine um 46,6% erhöhte Zell-Adhäsion der Leerklone auf den unbeschichteten Platten im Vergleich zum Matrigel. Obgleich die ITIH5-Klone gegenüber dem unbeschichteten Zustand eine geringere Zell-Matrix Adhäsion auf dem Matrigel aufwiesen, so fiel diese mit 14,1%, in Kontrast zu den Leerklonen, wesentlich geringer aus. Auch auf der Hyaluronsäure zeigte sich im Vergleich mit den unbeschichteten Platten eine geringere Adhäsionsrate, die jedoch zwischen den Leer- (17,52%) und ITIH5- (12,31%) Klonen ähnlich ausfiel. Ein evidentere Einfluss von ITIH5 auf die Zell-Matrix-Adhäsion von BT20-Zellen konnte folglich unter dem Einfluss des Zellmatrixprotein- und Wachstumsfaktorreichen Matrigel gezeigt werden.

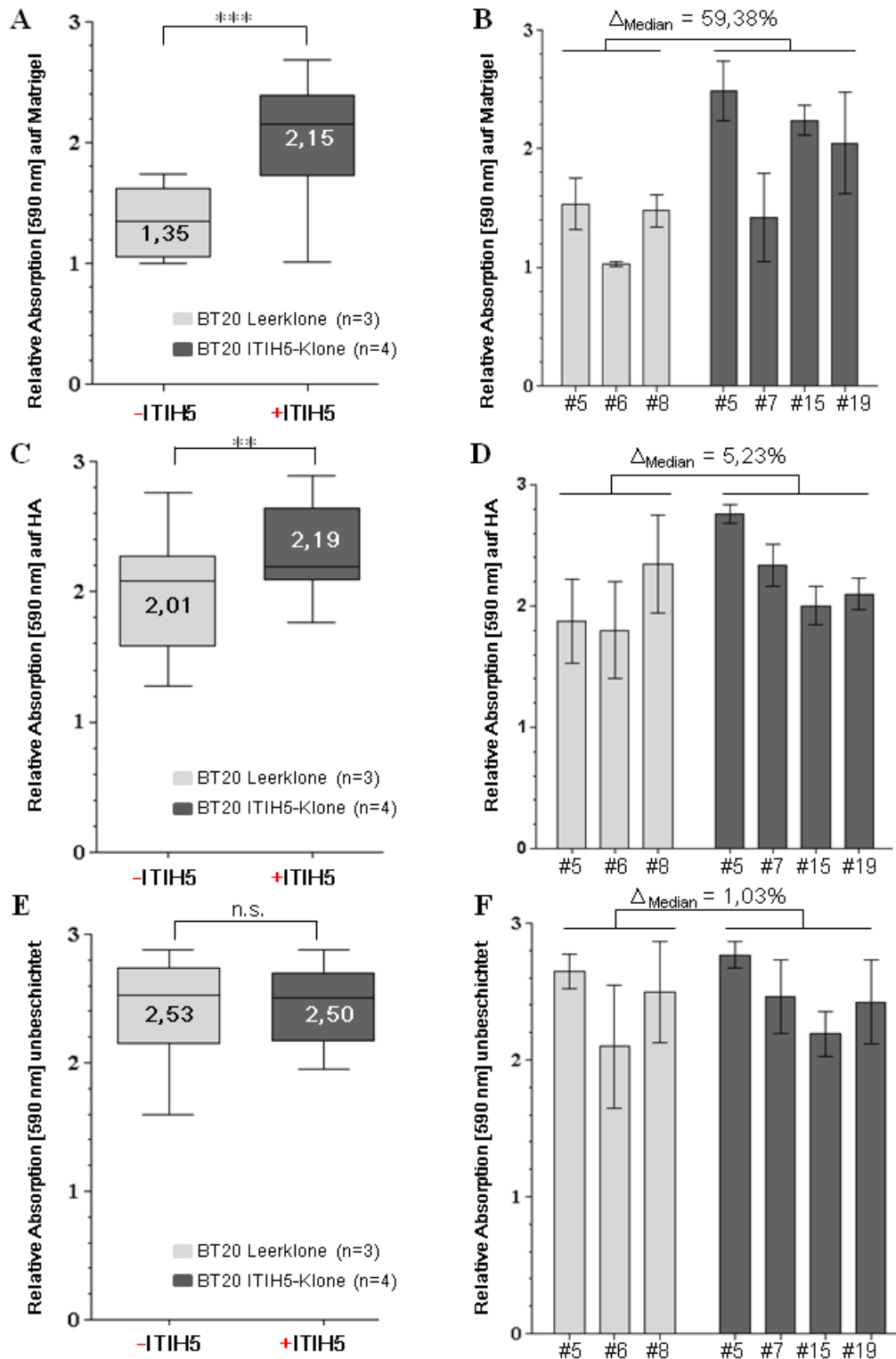


Abbildung 3-17: Der Einfluss von ITIH5 auf die Adhärenz humaner BT20-Mammakarzinomzellen. Dargestellt sind die kolorimetrischen Auswertungen ($\lambda=590$ nm) der Kristallviolett mengen der analysierten Zellklone. Alle Ansätze wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Vergleich der Absorptionswerte für die BT20 Leer- und ITIH5-Klone in der Box-Plot-Darstellung auf Matrigel- (A) und Hyaluronsäure (HA)- (C) beschichteten sowie unbeschichteten Platten (E) sowie für jeden Klon einzeln dargestellt ((B) Matrigel, (D) HA und (F) unbeschichtet). Δ , mediane Änderung der Absorption (%) zwischen der Kontrollgruppe (#5, #6, #8) und den ITIH5-Klonen (#5, #7, #15, #19); Vertikale Linien in B, D und F: STABW der Dreifachbestimmung; Horizontale Linie in A, C und E: Median; vertikale Linie: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; ***P<0,0001; **P<0,01; n.s.: nicht signifikant (P>0,05), zweiseitiger Mann-Whitney U Test.

3.2.2.4 DER EINFLUSS VON ITIH5 AUF DIE MIGRATIONSFÄHIGKEIT IN DEM HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELL BT20

Abschließend sollte die Migrationsfähigkeit der stabilen BT20-Zellen mit Hilfe des Wundheilungs-Tests (engl. *scratch-assay*) analysiert werden. Bei diesem Test wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze ein *scratch* in einen konfluenten Zellrasen gesetzt. Die Zeit bis zum vollständigen Bewuchs der zellfreien Fläche durch die migrierenden Zellen wurde alle 24 Stunden anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen dokumentiert. So konnte für jeden Klon eine Abnahme der freien Fläche pro Tag bestimmt werden. Abbildung 3-18 fasst die Abnahme der zellfreien Fläche für die analysierten Leerkclone (#5, #6, #8) und ITIH5-Klone (#5, #7, #15, #19) zusammen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die ITIH5-Klone wie auch die Leerkclone vier Tage benötigten, um den eingebrachten *scratch* vollständig zu besiedeln. Die ITIH5-Klone charakterisierten sich durch eine geringfügig verminderte Migrationsfähigkeit mit einer maximalen Differenz von 17,53% am zweiten Tag der Analyse. Die Migrationsrate der Leerkclone betrug bis zum dritten Tag ca. 30% pro Tag, während die ITIH5-Klone im Median am ersten und zweiten Tag eine Migrationsrate von 25% aufwiesen und am dritten Tag mit einer Rate von 40% migrierten. Im Besonderen wies der ITIH5-Klon #5 eine noch höhere Migration auf verglichen mit den Leerklonen und hatte bereits am dritten Tag die zellfreie Fläche vollständig bewachsen.

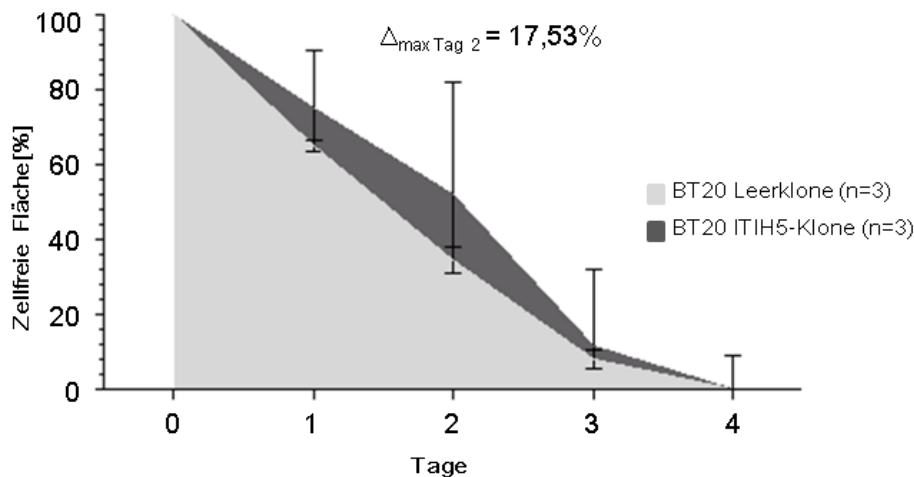


Abbildung 3-18: Das Migrationsverhalten von stabilen BT20-Klonen. Vergleichende Darstellung für die Änderung der zellfreien Fläche in den BT20-Leerklonen (#5, #6, #8) und BT20-ITIH5-Klonen (#5, #7, #15) für einen Zeitraum von 4 Tagen. Vertikale Balken: STABW der Dreifachbestimmung. Δ_{\max} : Maximale Änderungsrate für den angegebenen Zeitpunkt (Tag), zwischen den Leer- und ITIH5-Klonen. Alle Werte sind auf Tag 0 normiert (Fläche=100%).

Abbildung 3-19 zeigt repräsentativ den Leerklon #6 mit der höchsten Wachstumsrate verglichen mit dem ITIH5-Klon #7, den eine geringe Migrationsrate auszeichnet.

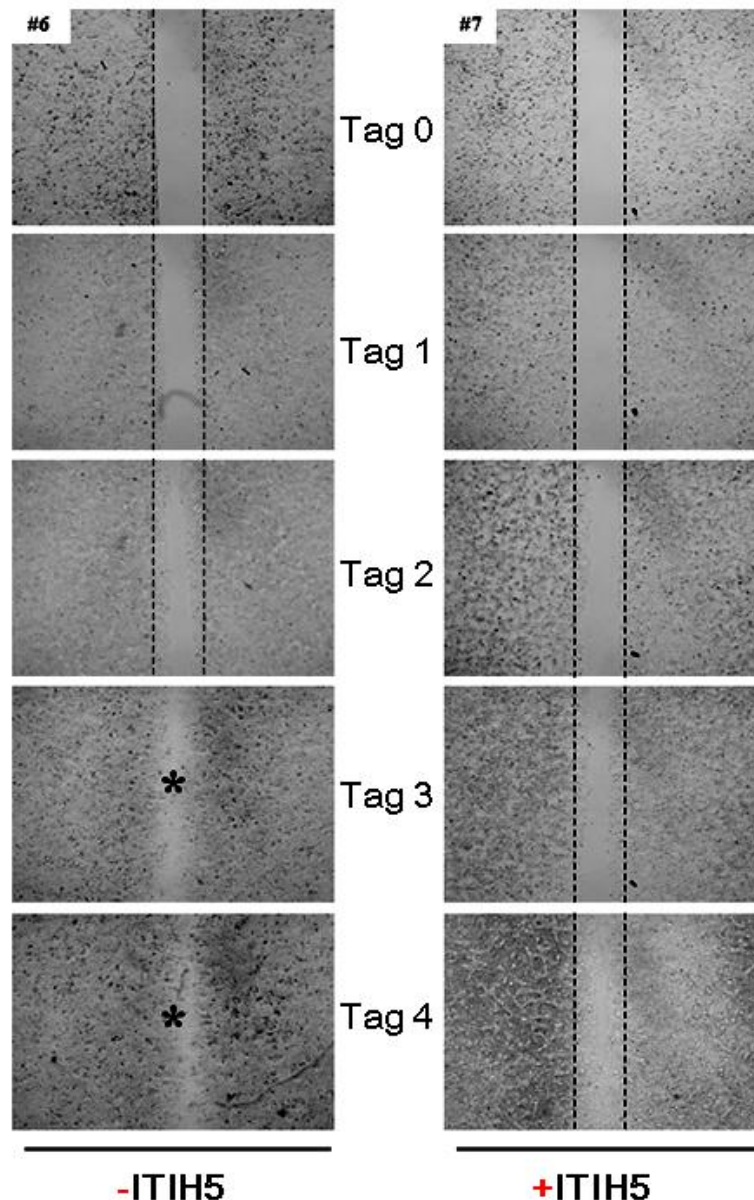


Abbildung 3-19: Repräsentative Darstellung des Migrationsverhaltens der stabilen BT20-Klone #6 und #7. Exemplarische Phasenkontrast-Aufnahmen des Wundheilungstests für den Leervektor Klon #6 und ITIH5-Klon #7. Vergleichende Darstellung der Reduzierung der zellfreien Fläche über einen Zeitraum von fünf Tagen. Vergrößerung: 50-fache Originalvergrößerung; Gestrichelte vertikale Linie markiert den ursprünglichen Rand der zellfreien Fläche an Tag 0; Stern: Vollständige Besiedelung der Wunde.

Zusammenfassend ist es in diesem experimentellen Abschnitt gelungen, ITIH5 in der invasiven, basalen humanen Brustkrebszelllinie BT20 durch eine stabile Transfektion auf RNA- und Proteinebene zu reexprimieren. Anhand des generierten Zellmodells konnte auf der ersten Stufe der angestrebten funktionellen Analyse ein moderater negativer Einfluss von ITIH5 auf das Proliferations- und Koloniebildungsvermögen der BT20-Zellen gezeigt werden. Weiterhin kennzeichnete die ITIH5-positiven BT20-Zellen eine erhöhte Adhäsionsfähigkeit auf dem ECM-simulierenden Matrigel. Dementgegen schien ITIH5 in den BT20-Zellen keinen direkten Einfluss auf die Zellmigration zu haben.

Auf der zweiten Stufe der angestrebten funktionellen ITIH5-Charakterisierung sollte das in dieser Studie, auf der molekularen Grundlage der BT20-Zellen, generierte Tumormodell sowie das MDA-MB-231-Tumormodell (Rose 2013) als Basis einer *Microarray* Genexpressionsanalyse eingesetzt werden, die anhand der Darstellung ITIH5-assoziiierter Zielgene erste Hinweise auf einen ITIH5-interagierenden Signalweg geben sollte.

3.3 DIE ANALYSE ITIH5-ASSOZIIERTER ZIELGENE IN DEN HUMANEN ITIH5 MAMMAKARZINOM-MODELLEN BT20 UND MDA-MB-231

Die zweite Stufe der funktionellen Charakterisierung von ITIH5 hatte das Ziel, die tumorsuppressive Eigenschaft von ITIH5, die bereits *ex vivo* an Brusttumoren (Veeck *et al.* 2008b) und *in vitro* in den humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (Rose 2013) und BT20 gezeigt wurde, hinsichtlich der biologischen und molekularen Funktion zuordnen und tiefgehend erforschen zu können. Besonders die humane Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 zeigte nach der ITIH5-Reexpression eine drastische phänotypische Veränderung der Zellmorphologie, die mutmaßlich zu der *in vitro* dargelegten Verminderung proliferativer und migratorischer Eigenschaften beigetragen hat. So kennzeichnete sich die Kontrollgruppe (-ITIH5) durch ein mesenchymales, ungeordnetes Zellwachstum aus. Dementgegen zeigte die Testgruppe (+ITIH5) eine epitheliale, geordnete Zellmorphologie (Rose 2013). Die humane Brustkrebszelllinie BT20 wies hingegen nach der ITIH5-Reexpression keine phänotypische Veränderung der Zellmorphologie auf. Um die biologische Funktion der ITIH5-Wirkung über einen breiteren molekularen Hintergrund analysieren zu können, schien es sinnvoll diese heterogenen Zellkulturmodelle hinsichtlich ITIH5-assoziiierter Zielgene zu untersuchen.

3.3.1 DIE IDENTIFIZIERUNG ITIH5-ASSOZIIERTER GENMUSTER IN BT20-ZELLEN

Die Möglichkeit zur simultanen Analyse der Expression mehrerer Tausend Gene bietet die cDNA-*Microarray*technik. Die Identifizierung ITIH5-regulierter Gene erfolgte über den humanen cDNA-basierten *1.0 ST Genchip* der Firma Affymetrix in einer der zentralen Service-Einheiten (*Chip Facility*) des Uniklinikum RWTH Aachen. Der *1.0 ST Genchip Microarray* besitzt 28.869 annotierte Vollängen Gene von RefSeq, Ensembl und CDS (engl. *coding sequence*) GenBank Transkripten. Die Auswertung der Daten erfolgte in dieser Arbeit mit dem Programm *BRB-ArrayTools* (Simon *et al.* 2007), welches eine differenzielle Strukturierung sowie umfassende Darstellungsmöglichkeit der Daten bietet (siehe 2.15.5).

Für die Analyse ITIH5-assoziiierter Zielgene in dem humanen Brustkrebsmodell BT20 dienten die Leerklone (#5, #6, #8) sowie der BT20-Wildtyp als Kontrollgruppe (-ITIH5). In die Testgruppe (+ITIH5) wurden die auf RNA- und Proteinebene bestätigten Klone #4, #18,

#7 und #15 integriert. Durch die Anwendung der beschriebenen Vergleich-Analyse (siehe 2.15.5) zwischen der Test- und Kontroll-Zellpopulationen konnten für das BT20-Zellkulturmodell 85 Gene identifiziert werden, die den Kriterien entsprachen. Diese Gene waren mindestens 1,8-fach signifikant ($P < 0,05$) differenziell exprimiert. Von diesen Genen waren neun herunter-reguliert und 76 herauf-reguliert. Abbildung 3-20A zeigt die Zusammenstellung der 85 Kandidatengene in einer *Heatmap*-Darstellung. Die Expression eines Sets von Genen, die speziell mit proliferativen und invasiven Eigenschaften von Tumorzellen im Mammakarzinom assoziiert sind (Lehtinen *et al.* 2012; Stavik *et al.* 2011), wurde im Folgenden mit der quantitativen PCR validiert. Diese Gene kodieren für das Glykoprotein (Transmembran) nmb (GPNMB) (medianer FC:+10,5, $P < 0,05$), den Gewebe Faktor Signalweg Inhibitor (*tissue factor pathway inhibitor*, TFPI) (medianer FC:+2,2, $P < 0,05$), die Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-(NAD) (HPGD) (medianer FC:-149, $P < 0,05$) und das Apolipoprotein D (APOD) (medianer FC:+4,1, $P < 0,05$) (Abb. 3-20B).

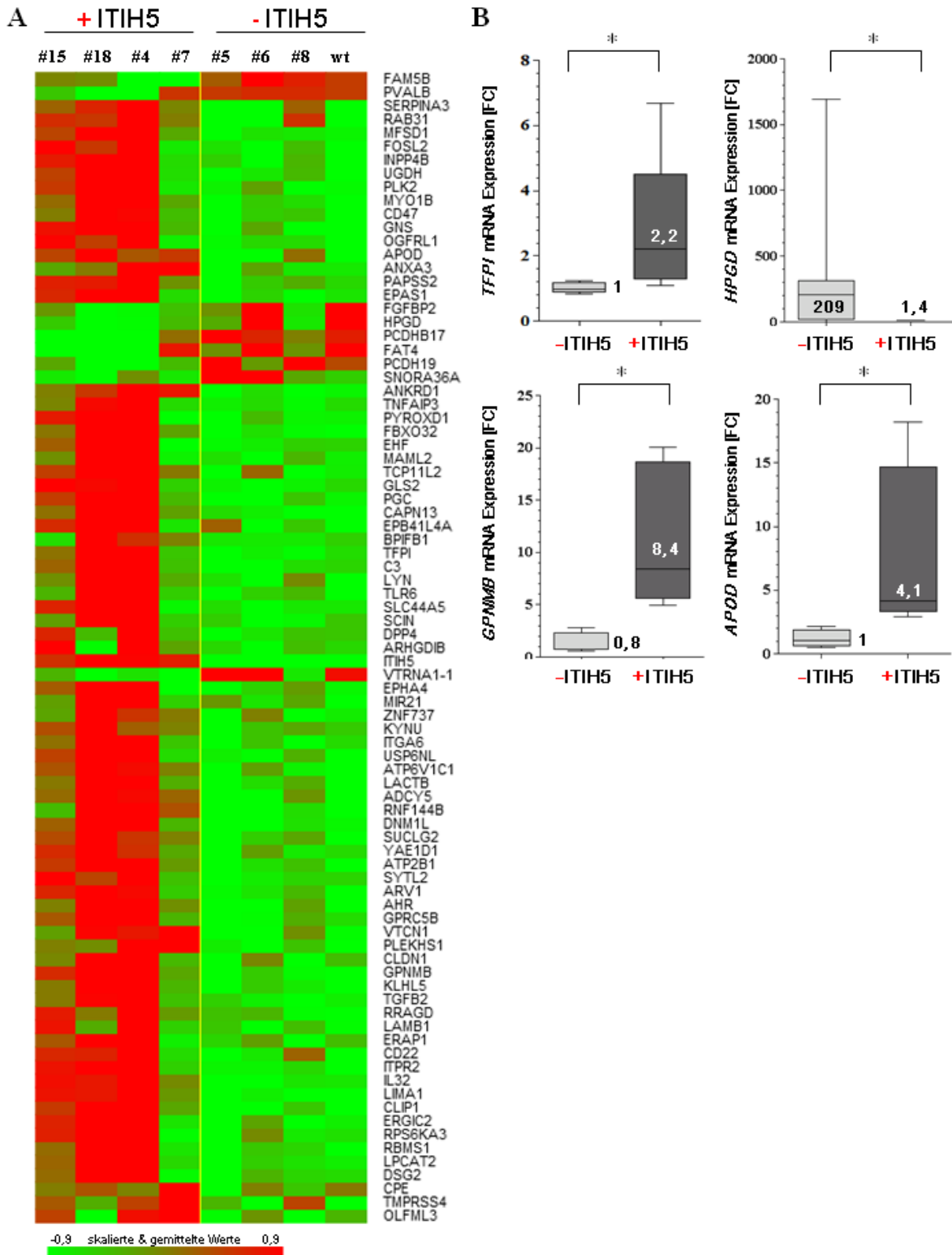


Abbildung 3-20: Genexpressionssignatur differenzieller ITIH5-assoziierter Zielgene in dem humanen Mammakarzinom-Modell BT20. (A) *Heatmap*-Darstellung der 85 Kandidatengene mit einer mindestens 1,8-fach signifikanten ($P < 0,05$) differentiellen Expression (rot: überexprimiert; grün: supprimiert) zwischen der Kontroll- (-ITIH5) und Testgruppe (+ITIH5). (B) Eine *Real-time* PCR bestätigte differenziell regulierte Gene der 85 Kandidatengenliste, welche mit Proliferations- und Invasionsprozessen assoziiert sind. Die Box-Plot-Analyse illustriert die differenzielle mRNA-Expression [FC] herauf-regulierter (*TFPI*, *GPNMB*, *APOD*) und herunter-regulierter (*HPGD*) Gene in den ITIH5-Klonen ($n=4$) verglichen mit den Leerklonen ($n=4$). Horizontale Linie: Median; vertikale Linie: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; * $P < 0,05$, zweiseitiger *Mann-Whitney* U Test.

3.3.1.1 GEN-ONTOLOGIE (GO) ANALYSE ITIH5-ASSOZIIERTER ZIELGENE IN BT20-ZELLEN

Um die biologischen Prozesse, in denen ITIH5 möglicherweise involviert ist, erstmalig zu definieren, wurden die 85 differenziell exprimierte Kandidatengene zunächst nach der Gen-Ontologie (GO) Datenbank annotiert. Die GO-Datenbank gruppiert die Gene dabei in drei unterschiedliche GO-Klassen („Zelluläre Komponenten“, „Molekulare Funktion“ und „Biologischer Prozess“). Die GO-Klassen unterteilen sich wiederum in zahlreiche GO-Termini, die eine weitere Unterteilung der ITIH5-assoziierten Zielgene zulässt. Überrepräsentierte Annotationen zeigen biologische Prozesse, in denen ITIH5 involviert sein könnte. So zeigte sich in der GO-Klasse „Zelluläre Komponenten“, die GO-Termini „Laminin Komplex“ und „Basallamina“ mit jeweils 8 von 85 Genen (9,4%) während lediglich 2% der Gene innerhalb dieser beiden Termini erwartet wurden. Das „Beobachtet vs. Erwartet“ Verhältnis betrug 3,98 und entspricht damit einer ca. 4-fachen Über-Repräsentation dieser 8 Gene. Neben einer möglichen Assoziation mit dem Zytoskelett zeigte sich vor allem ein evidenter Zusammenhang mit neurobiologischen Prozessen wie z.B. der Gliogenese. Unterstrichen wurde dies durch den GO-Term Axon (2,49-fach Über-Repräsentiert) in der GO-Klasse „Zelluläre Komponenten“. Daneben zeigte sich ein klarer Bezug zum Phospholipid Metabolismus (3,12-fach Über-Repräsentiert), was aktuelle Studien unterstützt, die ITIH5 als mögliches Adipokin eine Rolle im Fettstoffwechsel zuordnen (Anveden *et al.* 2012; Dahlman *et al.* 2012).

Die GO-Evaluierung der 85 Kandidatengenliste wurde auf der zweiten Stufe durch eine Gen-Ontologie Annotation des gesamten Arrays über eine Genset-Vergleichsanalyse validiert. Biologisch interessante Gene, die gleich oder unter dem Signifikanzniveau von 0,05 (LS/KS Permutations Test, Efron-Tibshirani's Genset Analyse) lagen, werden in Tabelle 3-10 zusammengefasst. Insgesamt lagen 232 von 1136 untersuchten Genen unter dem definierten Signifikanzniveau von $P < 0,05$. Der LS/KS Permutations Test hat dabei 166 signifikante Gene gefunden, der Efron-Tibshirani's Test 135 signifikante Gene. Davon konnten 23 von 126 analysierten Genen zur GO-Klasse „Zelluläre Komponenten“, 47 von 134 analysierten Genen zur GO-Klasse „Molekulare Funktion“ und 162 von 876 analysierten Genen zur GO-Klasse „Biologischer Prozess“ zugeordnet werden. Über-repräsentative Gene waren hauptsächlich mit biologischen Prozessen wie dem Lipid Metabolismus und der zellulären Lipidantwort assoziiert. Zusätzlich zeigte sich eine ITIH5-Assoziation mit den biologischen Prozessen der Wundheilung, der Regulation der Apoptose sowie der Neuronen-Entwicklung. Innerhalb der

zellulären Komponenten zeigte sich ein evidenter Zusammenhang von ITIH5 mit dem extrazellulären Bereich der Zelle sowie dem Zytoskelett.

Tabelle 3-10: Ausgewählte GO-Klassen mit den zugehörigen GO-Termini des BT20-Tumormodells innerhalb des gesamten *Microarray*

| GO Klasse | GO ID | GO Term | Anzahl Gene | LS Permutation P-Wert | KS Permutation P-Wert | Efron-Tibshirani P-Wert |
|-----------|---------|-----------------------------------|-------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|
| CC | 0005576 | Extrazelluläre Region | 49 | 0,082 | 0,039 | 0,035 |
| CC | 0005667 | Transkriptionsfaktor Komplex | 5 | 0,015 | 0,127 | 0,005 |
| CC | 0044430 | Zytoskelettaler Part | 33 | 0,041 | 0,067 | 0,055 |
| MF | 0004866 | Endopeptidase Inhibitor Aktivität | 5 | 0,001 | 0,001 | <0,005 |
| MF | 0003677 | DNA Bindung | 34 | 0,029 | 0,044 | 0,165 |
| MF | 0008289 | Lipid Bindung | 28 | 0,037 | 0,03 | 0,110 |
| BP | 0050714 | Regulation der Proteinsekretion | 5 | 0,009 | 0,003 | 0,010 |
| BP | 0042060 | Wundheilung | 20 | 0,023 | 0,080 | <0,005 |
| BP | 0044255 | Zellulärer Lipid-Metabolismus | 20 | 0,035 | 0,034 | 0,050 |
| BP | 0043065 | Apoptotische Prozesse | 10 | 0,036 | 0,046 | 0,035 |
| BP | 0045017 | Glycerollipid Biosynthese | 5 | 0,041 | 0,090 | 0,010 |
| BP | 0071396 | Zelluläre Lipidantwort | 8 | 0,043 | 0,050 | 0,025 |
| BP | 0009611 | Antwort auf Wundheilung | 36 | 0,028 | 0,036 | <0,005 |

CC: *Cellular Component*; MF: *Molecular Function*; BP: *Biological Process*; fett gedruckte Werte zeigen signifikante Werte auf einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

In Abbildung 3-21 ist der GO-Term „Extrazelluläre Region“ als *Heatmap* dargestellt, um die kategorisierten Gene innerhalb dieser Gruppe klar herauszustellen. Das Apolipoprotein D (APOD), welches bereits über die *Real-time* PCR bestätigt werden konnte (vergl. 3-20B), findet sich in dem GO-Term „Extrazelluläre Region“ in den ITIH5-Klonen überexprimiert wieder. Auch das validierte Gen *TFPI* wird in dem GO-Term „Extrazelluläre Region“ gelistet. In diesem GO-Term wird auch ITIH5 selber gelistet, was aufgrund der beschriebenen Sekretion in den extrazellulären Raum (Himmelfarb *et al.* 2004) auf eine mögliche Interaktion mit diesen Genen hinweist.

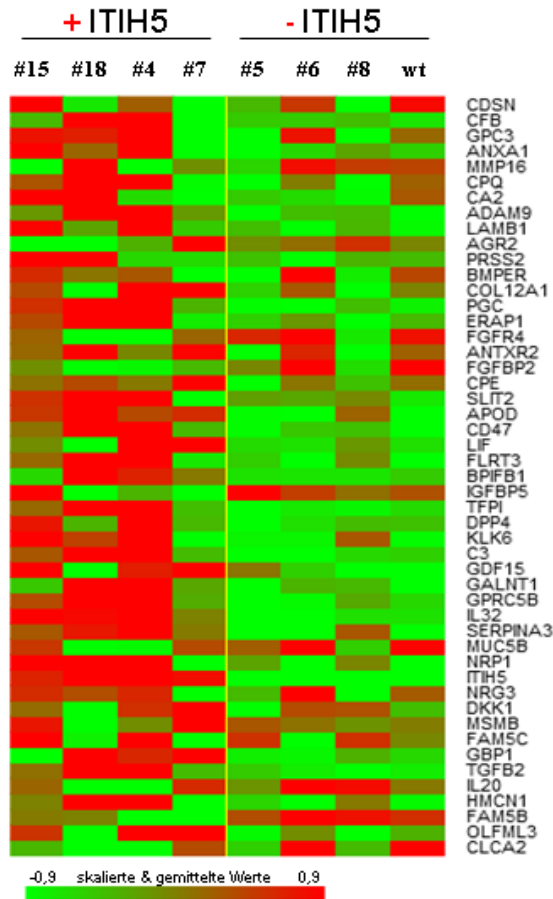


Abbildung 3-21: Genexpressionssignatur differenzieller ITIH5-assoziiierter Zielgene in dem GO-Term „Extrazelluläre Region“. Heatmap-Darstellung der kategorisierten Kandidatengene mit einem Signifikanzlevel von $P < 0,05$ in den angewandten Tests (LS/KS Permutations Test und Efron-Tibshirani's Genset Analyse) Rot: überexprimiert; grün: supprimiert, zwischen der Kontroll- (-ITIH5) und Testgruppe (+ITIH5).

3.3.1.2 DIE *IN SILICO* ANALYSE ITIH5-ASSOZIIERTER ZIELGENE IN BT20-ZELLEN

Um eine mögliche klinische Relevanz der unter ITIH5 transkriptionell reaktivierten Zielgene im Mammakarzinom bewerten zu können, wurde das Genexpressionsmuster ITIH5-koexprimierter Kandidatengene über eine *in silico* Analyse mit der GOBO (*Gene expression-based Outcome for Breast cancer Online*) Datenbank näher charakterisiert (Ringner *et al.* 2011). GOBO ist eine Online-basierte Datenbank, die es ermöglicht einzelne Gene bzw. Gen-Kombination bezüglich ihrer prognostischen Aussagekraft zu verifizieren. Das Programm basiert auf Expressionsdaten des *Affymetrix Chip U133A* von 1.881 umfangreich annotierten Brustkrebs Gewebeproben. Die Analyse ermöglicht eine Betrachtung des Fernmetastasen-freien (FMFÜ) und des Rezidiv-freien Überlebens (RFÜ) als essentieller Indikator für das Auftreten rezidivierender sowie metastasierender Tumoren in fünf Subgruppen: 1) alle 1881 Tumoren, 2) ER-positive Tumoren ($n=1225$), 3) ER-negative Tumoren ($n=395$), 4) systematisch unbehandelte Patienten ($n=927$), und 5) Patienten mit Tamoxifen-Behandlung ($n=326$). In jeder Subgruppe erfolgt zusätzlich eine Analyse basierend auf dem molekularen

Genexpressionsprofils des Tumors (*basal-like*, HER-2-positiv, luminal A, luminal B, und *normal-like*). Weitere klinisch-pathologische Parameter, die für die Analyse ausgewählt werden können, sind der Lymphknoten-Status, der Tumor-Differenzierungsgrad, die Tumorgroße (≤ 20 mm oder >20 mm) sowie das Alter der Patientin (≤ 50 Jahre oder >50 Jahre). Für die univariate Analyse wird der Log-Rank Test entsprechend der Kaplan-Meier Methode angewendet (Kaplan & Meier, 1958).

Zunächst wurde das von Veeck *et al.* beschriebene verringerte Rezidiv-freie und Gesamtüberleben von Brustkrebs-Patientinnen mit niedriger *ITIH5*-Expression (Veeck *et al.* 2008b) anhand der GOBO-Datenbank-Analyse untermauert. So zeigte die GOBO-Analyse des gesamten Tumorkollektivs, dass eine schwache (\log_2 Expression -5,49 bis -0,39) *ITIH5*-Expression mit einem verkürzten Rezidiv-freien ($P=0,002$), einem verkürzten Fernmetastasen-freien ($P=0,011$) Überleben sowie einem verringerten Gesamtüberleben (GÜ) ($P=0,022$) von Brustkrebs-Patientinnen assoziiert ist. Im nächsten Schritt wurden diese Analysen für das *ITIH5*-gesteuerte Genexpressionsprofil des BT20-Brustkrebsmodells durchgeführt. Unter der Prämisse das zwei Drittel der *ITIH5*-Gen-Signatur ko-regulierte Gene umfasst, die bekannte putative Tumorsuppressorgene darstellen, wurde in dieser Arbeit die klinische Bedeutung dieser Signatur auf das Überleben von Brustkrebs-Patientinnen untersucht. Insgesamt waren 61 von 76 ko-regulierten Genen (inklusive *ITIH5*) in der GOBO-Datenbank verfügbar. Wie in Abbildung 3-22A und B dargestellt, prognostiziert eine hohe Expression (\log_2 Expression 0,137 bis 0,805) der 61-Gen-Signatur inklusive *ITIH5* (Genliste siehe Anhang A.3) einen signifikant besseren Verlauf, d.h. ein längeres Rezidiv-freies sowie Fernmetastasen-freies ($P<0,001$) Überleben der Mammakarzinom-Patientinnen. Die nachfolgende multivariate Analyse diente zur Prüfung, ob die beobachtete univariate prognostische Assoziation der Kandidatengen-Expression mit dem RFÜ und FMFÜ von anderen Prognosefaktoren des Mammakarzinoms unabhängig ist und demnach einen eigenständigen und prognostisch relevanten Informationsgewinn bietet. In die multivariate Analyse wurden neben der 61-Kandidatengen-Expression der Lymphknotenstatus, die histologische Tumorgraduierung sowie der Östrogenrezeptorstatus über einen Zeitraum von 10 Jahren eingeschlossen. Das Modell ergab für Brustkrebs-Patientinnen mit geringer (\log_2 Expression -0,113 bis -1,316) Expression der 61-Gen-Signatur ein erhöhtes 10 Jahres-Risiko von 1,67 (95% KI: 1,23 zu 2,26, $P=0,001$) für die Rezidiventwicklung, während ein 1,15-fach erhöhtes Risiko für eine Fernmetastasierung (95% KI: 0,77 zu 1,73, $P=0,489$) vorlag. Damit stellt das über *ITIH5* gesteuerte Genexpressionsmuster *in vitro* aktivierter Zielgene einen

prognostisch unabhängigen Faktor für das Rezidiv-freie, jedoch nicht für das Fernmetastasen-freie Überleben von Brustkrebs-Patientinnen dar (Abb. 3-21 C und D).

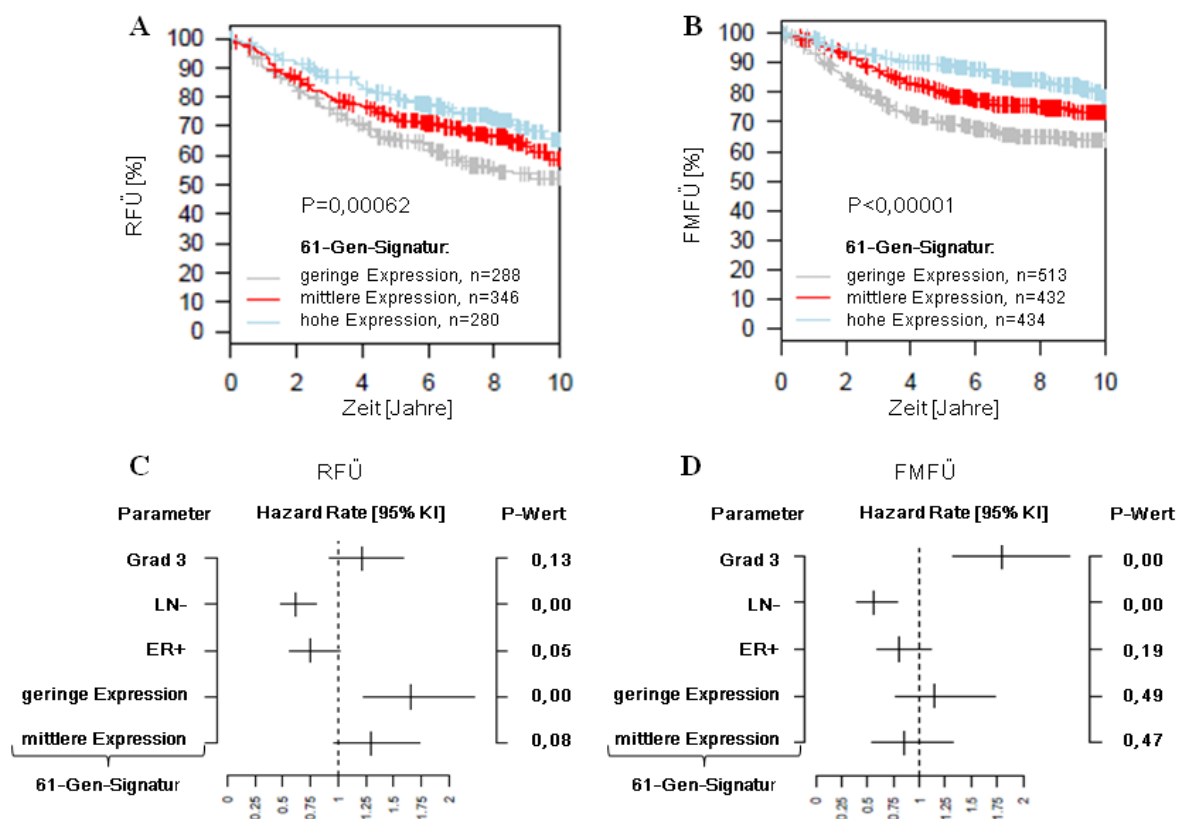


Abbildung 3-22: Univariate und multivariate Überlebens-Analyse der 61-Kandidatengen-Expression des BT20-Tumormodells. Die Überlebensfraktion aller Tumorfälle der GOBO-Datenbank in Abhängigkeit der Expression der 61-Gen-Signatur. (A) und (B) Kaplan-Meier Kurven illustrieren das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) und Fernmetastasen-freie Überleben (FMFÜ) für Patientinnen mit hoher Expression der 61-Gen-Signatur (\log_2 Expression 0,137 bis 0,805, blaue Kurve) in Relation zu Patientinnen mit einer moderaten (\log_2 Expression -0,113 bis 0,137, rote Kurve) bis geringen Expression (\log_2 Expression -0,113 bis -1,316, hellgraue Kurve). Vertikale Linien: zensierte Fälle. (C) und (D) Multivariate Cox Regressions-Analyse des RFÜ und FMFÜ. LN-: Lymphknoten-Status negativ; ER+: Östrogenrezeptor positiv; KI: Konfidenzintervall.

Die Aufteilung der Brustkrebs-Patientinnen des Gesamtkollektivs in die klinisch relevanten Subgruppen der ER-positiven bzw. Lymphknoten-negativen Tumoren, verdeutlichte eine evidente Assoziation der erhöhten 61-Gen-Signatur Expression mit einem erhöhten RFÜ und FMFÜ innerhalb beider Subgruppen. Eine hohe Expression der 61-Kandidatengene zeigte einen hochsignifikanten ($P<0,0001$) Einfluss auf das RFÜ in den ER-positiven Tumoren und das FMFÜ in beiden Subgruppen sowie einen signifikanten ($P=0,0396$) Einfluss auf das RFÜ in LN-negativen Tumoren (Abb. 3-23A und B). Zusätzlich offenbarte die multivariate Analyse eine prognostisch unabhängige Relevanz des ITIH5-gesteuerten Genexpressionsmusters bezüglich des RFÜ und FMFÜ. Das Modell ergab für Brustkrebs-Patientinnen mit schwacher Expression der 61-Kandidatengruppe in der

Subgruppe der ER-positiven Tumoren ein erhöhtes Risiko von 1,99 (95% KI: 1,4 zu 2,83, $P=0,0001$) für die Rezidiventwicklung, während ein 1,83-fach erhöhtes Risiko für eine Fernmetastasierung (95% KI: 1,03 zu 3,26, $P=0,039$) vorlag. In der Gruppe der Lymphknoten-negativen Tumoren war eine geringe Zielgen-Expression ebenfalls mit einem schwach erhöhten Risiko der Rezidiventwicklung von 1,29 (95% KI: 0,91 zu 1,82, $P=0,153$), jedoch nicht mit einem erhöhten Risiko der Fernmetastasen Entwicklung (HR: 1,01; 95% KI: 0,66 zu 1,54 $P=0,958$) verbunden.

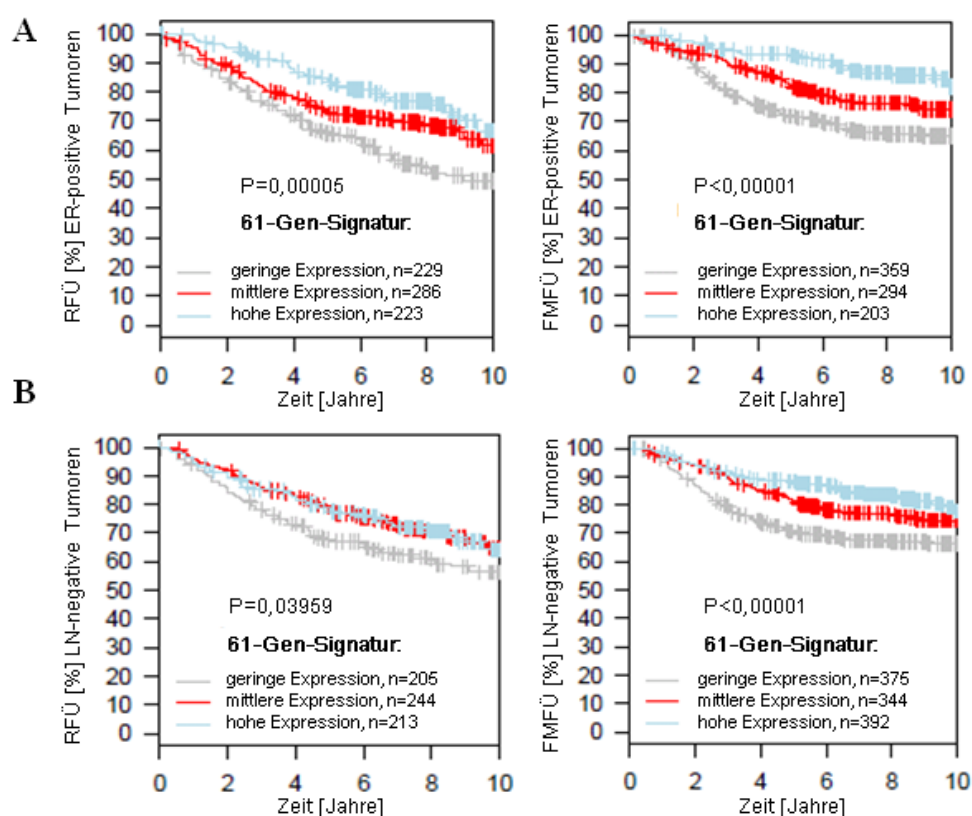


Abbildung 3-23: Univariate Überlebens-Analyse der 61-Kandidateng-Expression des BT20-Tumormodells in ER-positiven und LN-negativen Mammakarzinomen. Die Überlebensfraktion der ER-positiven und LN-negativen Tumoren der GOBO-Datenbank in Abhängigkeit der Expression der 61-Gen-Signatur. Kaplan-Meier Kurven illustrieren das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) und Fernmetastasen-freie Überleben (FMFÜ) für Patientinnen mit hoher Expression der Kandidatengruppe (\log_2 Expression 0,137 bis 0,805, blaue Kurve) in Relation zu Patientinnen mit einer moderaten (\log_2 Expression -0,113 bis 0,137, rote Kurve) bis geringen Expression (\log_2 Expression -0,113 bis -1,316, hellgraue Kurve) in ER-positiven (A) und LN-negativen (B) Tumoren. Vertikale Linien: zensierte Fälle.

Dementgegen zeigte die erhöhte Expression der 61-Gen-Signatur in den Subgruppen der ER-negativen keinen Einfluss auf das Überleben (Abbildung 3-24A), während in den LN-positiven Tumoren eine hohe Expression der 61-Gen-Signatur ein erhöhtes RFÜ prognostiziert (Abbildung 3-24B).

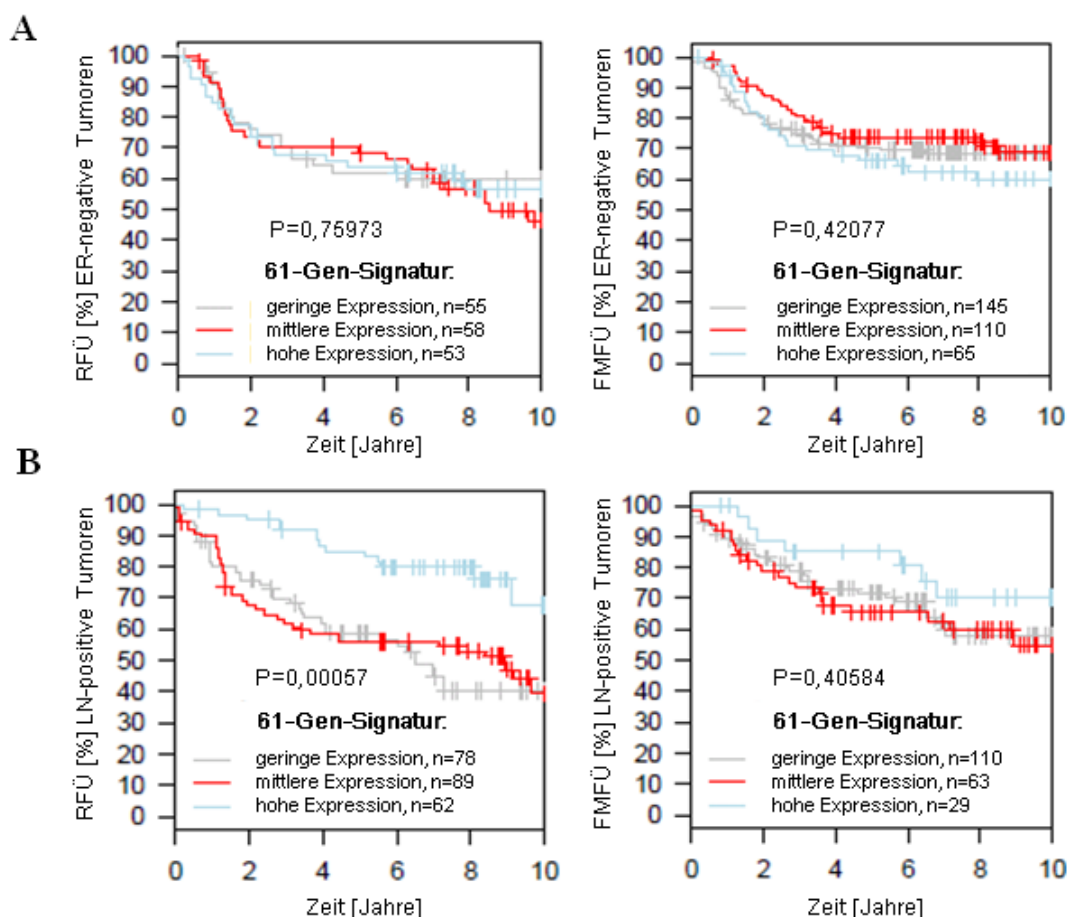


Abbildung 3-24: Univariate Überlebens-Analyse der 61-Kandidatengen-Expression des BT20-Tumormodells in ER-negativen und LN-positiven Mammakarzinomen. Die Überlebensfraktion der ER-negativen und LN-positiven Tumoren der GOBO-Datenbank in Abhängigkeit der Expression der 61-Gen-Signatur. Kaplan-Meier Kurven illustrieren das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) und Fernmetastasen-freie Überleben (FMFÜ) für Patientinnen mit hoher Expression der Kandidatengruppe (\log_2 Expression 0,137 bis 0,805, blaue Kurve) in Relation zu Patientinnen mit einer moderaten (\log_2 Expression -0,113 bis 0,137, rote Kurve) bis geringen Expression (\log_2 Expression -0,113 bis -1,316, hellgraue Kurve) in ER-positiven (A) und LN-negativen (B) Tumoren. Vertikale Linien: zensierte Fälle.

Frauen mit Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen, sind für eine adjuvante Therapie mit selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (z.B. Tamoxifen) zugänglich und stellen eine prognostisch wichtige Subgruppe dar. Eine unterstützende prognostische Aussage könnte das ITIH5-gesteuerte 61-Gen-Signatur *in vitro* aktivierter Zielgene bieten, das einen prognostisch unabhängigen Faktor für das Rezidiv-freie sowie das Fernmetastasen-freie Überleben in ER-positiven Mammakarzinomen darstellt.

3.3.2 DIE IDENTIFIZIERUNG ITIH5-ASSOZIIERTER GENMUSTER IN MDA-MB-231 ZELLEN

In die MDA-MB-231-basierte Chip-Analyse wurde ebenfalls der MDA-MB-231-Wildtyp sowie drei aggressive Leerkclone (#1, #2B, #3) als Kontrollgruppe (-ITIH5) integriert,

während vier schwach aggressive ITIH5-Klone (#4, #4B, #7, #15) die Testgruppe bildeten (+ITIH5). Durch die Anwendung der beschriebenen Vergleichs-Analyse (siehe 2.15.5) zwischen der Test- und Kontroll-Zellpopulationen konnten für das MDA-MB-231-Zellkulturmodell 117 Gene identifiziert werden, die den Kriterien entsprachen. Diese Gene waren mindestens 1,8-fach signifikant ($P < 0,05$) differenziell exprimiert. Von diesen Genen waren 34 herunter-reguliert und 83 herauf-reguliert. Abbildung 3-25A zeigt die Zusammenstellung der 117 Kandidatengene als *Heatmap*. In dem MDA-MB-231-Zellkulturmodell zeigten sich eine Reihe von Genen, die im speziellen mit Invasions- und Metastasierungsprozessen assoziiert sind (Henry *et al.* 2011; Koblinski *et al.* 2005; Oh *et al.* 2012). Ein Set dieser Gene wurde im Folgenden mit der quantitativen PCR validiert. Diese Gene kodieren für das *N-Myc downstream regulated gene 2* (NDRG2) (medianer FC:+265, $P < 0,05$), Endoglin (medianer FC:+43, $P < 0,05$), das *coiled-coil domain containing 80* (CCDC80) (medianer FC:+3,7, $P < 0,05$), das *matrix-remodelling associated 8* (MXRA8) (medianer FC:-262, $P < 0,05$) und das *secreted protein, acidic, cysteine-rich* (SPARC) (medianer FC:+9,2, $P < 0,05$) (Abb. 3-25B).

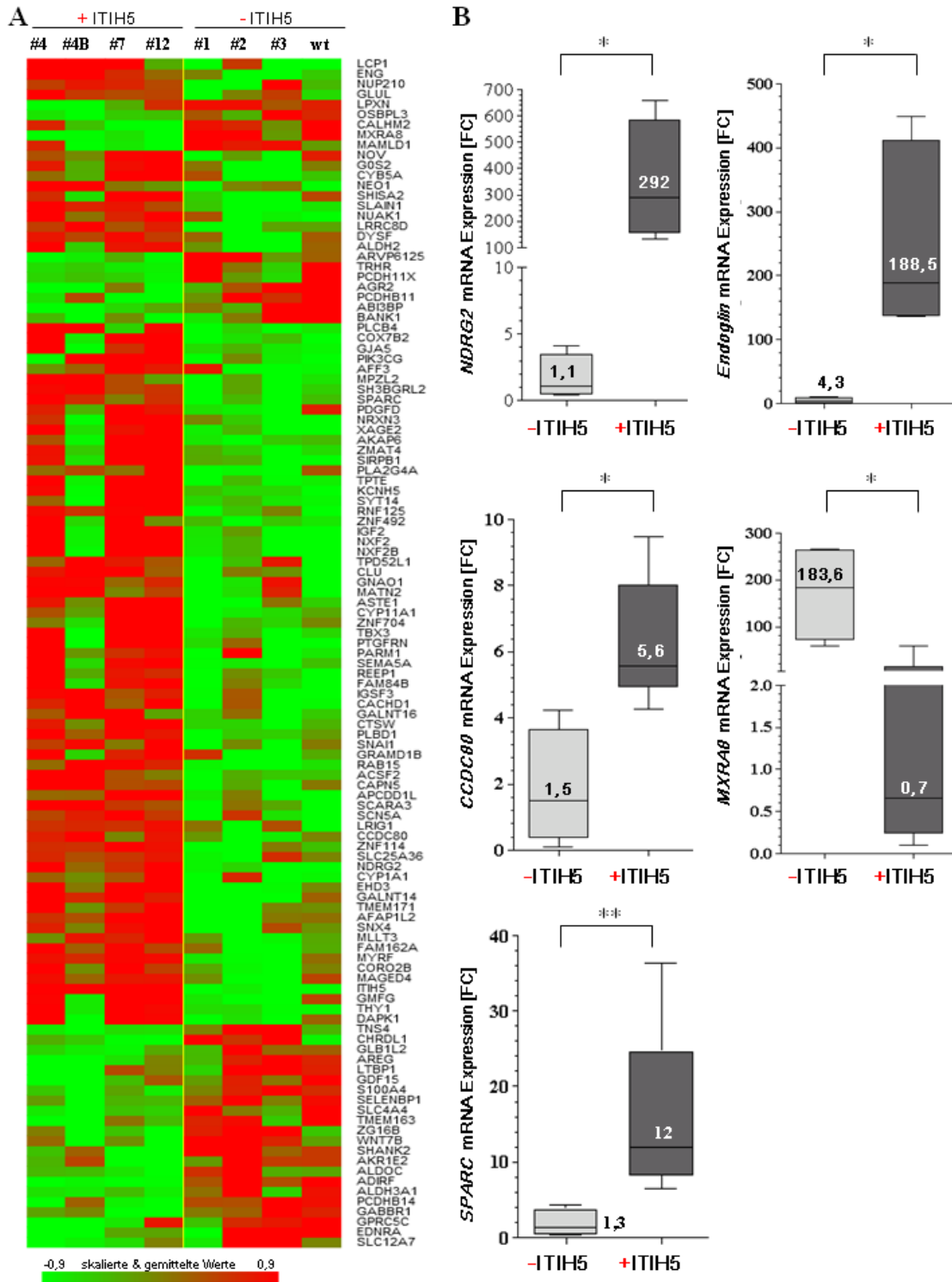


Abbildung 3-25: Genexpressionssignatur differenzieller ITIH5-assoziiierter Zielgene in dem humanen MDA-MB-231-Brustkrebsmodell. (A) Heatmap-Darstellung der 117 Kandidatengene mit einer mindestens 1,8-fach signifikanten ($P < 0,05$) differentiellen Expression (rot: überexprimiert; grün: supprimiert) zwischen der Kontroll- (-ITIH5) und Testgruppe (+ITIH5). (B) Real-time PCR bestätigte differentiell regulierte Gene der 117 Kandidatengenliste, welche mit Invasions- und Migrationsprozessen assoziiert sind. Die Box Plot Analyse illustriert die differentielle mRNA-Expression [FC] herauf-regulierter (*NDRG2*, *Endoglin*, *CCDC80*, *SPARC*) und herunter-regulierter (*MXRA8*) Gene in den ITIH5-Klonen ($n=4$) verglichen mit den Leerklonen ($n=4$). Horizontale Linie: Median; vertikale Linie: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; *: $P < 0,05$, zweiseitiger Mann-Whitney U Test.

3.3.2.1 GEN-ONTOLOGIE (GO) ANALYSE ITIH5-ASSOZIIERTER ZIELGENE IN MDA-MB-231-ZELLEN

Die Einordnung der 117 Kandidatengene nach der Gen Ontologie Datenbank verdeutlichte in allen GO-Klassen einen evidenten Bezug zu Zellmembran-assoziierten Prozessen. So zeigte sich in der GO-Klasse „Biologischer Prozess“ die GO-Termini „Regulation der Membran Depolarisation“ abundant mit einer 10,8-fachen Über-Repräsentation der Gene. Mit einem beobachteten Anteil von 4,3% (5 von 117 Genen) lagen die Gene bezüglich des GO-Terms „Epitheliale mesenchymale Transition“ Über-Repräsentiert vor, obwohl nur 1,1% der Gene erwartet wurden. Daneben zeigte sich als ein weiterer Membran-assoziiertes GO-Term „Passive Transmembran Transporteraktivität“ mit 9 von 117 Genen (7,7%), wohingegen nur 2,7% der Gene erwartet wurden. Hier betrug das „Beobachtet vs. Erwartet“ Verhältnis 3,4. Weitere Assoziationen der Kandidatengene mit den GO-Klassen sind in Tabelle 3-11 dargestellt.

Tabelle 3-11: Ausgewählte GO-Klassen mit den zugehörigen GO-Termini der 117 Genliste des MDA-MB-231-Tumormodells

| GO Klasse | GO ID | GO Term | Beobachtet | Erwartet | Beobachtet /Erwartet |
|-----------|---------|---|------------|----------|----------------------|
| CC | 0044456 | Mitochondrium | 9 | 4,27 | 2,11 |
| CC | 0015629 | Zellkern Membran | 7 | 3,30 | 2,10 |
| CC | 0030425 | Dendrit | 5 | 2,45 | 2,04 |
| MF | 0022803 | Passive Transmembran Transporteraktivität | 9 | 2,65 | 3,40 |
| MF | 0004497 | Monooxygenase Aktivität | 5 | 1,27 | 3,93 |
| MF | 0008083 | Wachstumsfaktor Aktivität | 5 | 1,17 | 4,29 |
| BP | 0086010 | Membran Depolarisierung in der Regulation des Aktionspotentials | 8 | 0,53 | 15,06 |
| BP | 0090092 | Regulation des Transmembranrezeptor Serin/Threonin Kinase Signalweg | 7 | 2,66 | 2,64 |
| BP | 0042063 | Gliogenese | 6 | 1,99 | 3,01 |
| BP | 0003254 | Regulation der Membran Depolarisation | 5 | 0,46 | 10,76 |
| BP | 0001837 | Epitheliale mesenchymale Transition | 5 | 1,13 | 4,43 |

CC: Cellular Component; MF: Molecular Function; BP: Biological Process.

Neben der Assoziation mit Membran-basierten Prozessen zeigte sich erneut, parallel zu dem BT20-Zellkulturmodell, ein Zusammenhang mit neurobiologischen Prozessen wie der „Membran Depolarisierung in der Regulation eines Aktionspotentials“ (GO: 0086010) und der „Gliogenese“ (GO: 0042063). In diesen beiden GO-Termini der GO-Klasse „Biologische Prozesse“ zeigte sich eine 15,1-fache (GO: 0086010) bzw. 3-fache (GO: 0003254) Über-Repräsentation der beobachteten Gene. Unterstrichen wurde dies durch den GO-Term „Dendrit“ (2-fach Über-Repräsentiert) in der GO-Klasse „Zelluläre Komponente“.

Die GO-Evaluierung der 117 Kandidatengenliste wurde durch eine Gen Ontologie Annotation des gesamten Arrays über eine Genset Vergleichsanalyse bestätigt. Biologisch interessante Gene, die gleich oder unter dem Signifikanzniveau von 0,05 (LS/KS Permutations-Test, Efron-Tibshirani's Genset Analyse) lagen, werden in Tabelle 3-12 zusammengefasst. Insgesamt lagen 543 von 2634 untersuchten Genen unter dem definierten Signifikanzniveau von $P < 0,05$. Der LS/KS Permutations Test hat dabei 398 signifikante Gene gefunden, der Efron-Tibshirani's Test 279 signifikante Gene. Davon konnten 45 von 237 analysierten Genen zur GO-Klasse „Zelluläre Komponenten“, 71 von 299 analysierten Genen zur GO-Klasse „Molekulare Funktion“ und 427 von 2098 analysierten Genen zur GO-Klasse „Biologischer Prozess“ zugeordnet werden. Über-repräsentative Gene waren signifikant mit biologischen und molekularen Prozessen wie der Signalrezeptor-Aktivität, der TGF- β aktivierten Rezeptor-Aktivität oder dem ERK-Signalweg verknüpft. Weiterhin konnte innerhalb der zellulären Komponenten ein klarer Bezug zu der Extrazellulären Matrix (ECM) (GO: 0031012, GO: 0044420, GO: 0005578) gezeigt werden. Zusätzlich deutete die Annotation wiederholt auf einen evidenten Zusammenhang von ITIH5 mit neurologischen Prozessen, Regulationsmechanismen von Peptidasen und Endopeptidasen sowie dem Lipidstoffwechsel.

Tabelle 3-12: Ausgewählte GO-Klassen mit den zugehörigen GO-Begriffen des MDA-MB-231-Tumormodells innerhalb des gesamten *Microarray*

| GO Klasse | GO ID | GO Term | Anzahl Gene | LS Permutations P-Wert | KS Permutations P-Wert | Efron-Tibshirani P-Wert |
|-----------|---------|---|-------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| CC | 0031012 | Extrazelluläre Matrix | 60 | 0,002 | 0,000 | 0,175 |
| CC | 0044420 | Teil der Extrazelluläre Matrix | 28 | 0,014 | 0,001 | 0,060 |
| CC | 0097458 | Neuronen Part | 89 | 0,028 | 0,036 | 0,320 |
| CC | 0005578 | Proteinöse extrazelluläre Matrix | 49 | 0,007 | 0,005 | 0,180 |
| CC | 0031966 | Mitochondrien Membran | 39 | 0,006 | 0,008 | 0,025 |
| CC | 0032994 | Protein-Lipid Komplex | 6 | 0,029 | 0,016 | 0,020 |
| MF | 0038023 | Signalrezeptor Aktivität | 93 | 0,001 | 0,000 | 0,040 |
| MF | 0061134 | Peptidase Regulation | 23 | 0,025 | 0,488 | 0,015 |
| MF | 0004866 | Endopeptidase Inhibitor Aktivität | 25 | 0,029 | 0,559 | 0,015 |
| MF | 0005024 | TGF- β -aktivierte Rezeptor-Aktivität | | 0,013 | 0,020 | 0,015 |
| BP | 0007267 | Regulation des Aktionspotentials | 18 | 0,009 | 0,002 | 0,040 |
| BP | 0070372 | Regulation ERK1 und ERK2 Kaskade | 13 | 0,005 | 0,006 | 0,110 |
| BP | 0007417 | Entwicklung Zentralnervensystem | 83 | 0,017 | 0,012 | 0,110 |
| BP | 0043062 | Extrazelluläre Struktur Organisation | 25 | 0,030 | 0,027 | 0,080 |

CC: Cellular Component; MF: Molecular Function; BP: Biological Process; fett gedruckte Werte zeigen signifikante Werte auf einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$.

3.3.2.2 DIE ANALYSE ECM-ASSOZIIERTER ITIH5 ZIELGENE IN MDA-MB-231-ZELLEN

Der Hinweis einer möglichen Assoziation von ITIH5 mit dem strukturellen Aufbau und der Organisation der Extrazellulären Matrix erhärtete sich insbesondere in den MDA-MB-231-Zellen. In Einklang mit diesen GO-Annotationen steht die aufgezeigte strukturelle Veränderung der Zellmorphologie in den ITIH5-positiven MDA-MB-231-Zellen (Rose 2013). Diese morphologischen Veränderungen gingen einher mit der Reexpression desmosomaler Komponenten sowie der kortikalen Strukturierung des Aktin-Zytoskelettes. Die morphologische Umstrukturierung der ITIH5-positiven Zellen impliziert den Prozess der mesenchymalen epithelialen Transition, der mutmaßlich mit der tumorsuppressiven Wirkung von ITIH5 einhergeht. Die vielfach beschriebene komplexe Interaktion der ECM mit dem stromalen Mikromilieu der Zelle (Bissell *et al.* 2005; Bissell *et al.* 2002) leitete zu der Hypothese, dass ITIH5 ECM-assoziierte Signaltransduktions-Prozesse moduliert und in Folge dessen proliferative und migratorische Prozesse supprimiert.

Die Gen-Ontologie Einordnung signifikanter ITIH5-assoziiierter Zielgene deutete auf eine „TGF- β -aktivierte Rezeptor-Aktivität“ (GO:0005024) hin, diesbezüglich der TGF- β Ko-Rezeptor Endoglin zugeordnet und mit einer im Median 43-fachen herauf-regulierten Expression in den ITIH5-Klonen verifiziert werden konnte. Endoglin wurde bereits mit der Modulation struktureller Zellkomponenten in Verbindung gebracht (Henry *et al.* 2011; Sanz-Rodriguez *et al.* 2004) und konnte nachfolgend auch auf Proteinebene mit einer Reexpression in den ITIH5-Klonen dargelegt werden (Abb. 3-26) (Die Generierung dieser Daten erfolgte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Weiskirchen des Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Uniklinik RWTH Aachen).

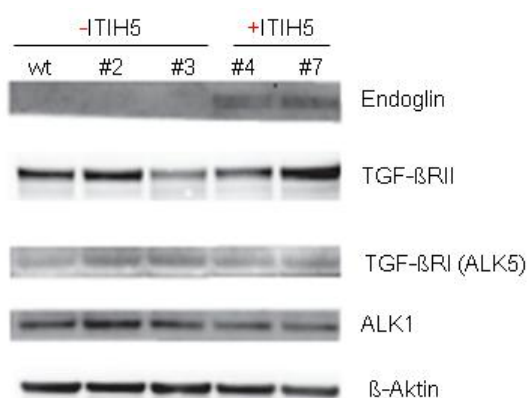


Abbildung 3-26: Die Endoglin-Reexpression kann auch auf Proteinebene in den ITIH5-Klonen nachgewiesen werden. Die Endoglin-Reexpression in den MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen wurde mittels der Westernblot Methode verifiziert. Analysiert wurden die Leerkclone #2 und #3 sowie der Wildtyp gegenüber den ITIH5-Klonen #4 und #7. Neben dem Ko-Rezeptor Endoglin wurden komplementierend die TGF- β Signalrezeptoren Typ I (ALK1 und ALK5) sowie Typ II (TGF- β RII) analysiert. Die Ladekontrolle β -Aktin verdeutlicht die eingesetzte Proteinmenge (Kooperation mit Prof. Dr. Ralf Weiskirchen).

Mit der Ausnahme des TGF- β Ko-Rezeptors Endoglin, wiesen die TGF- β Rezeptoren Typ I und II ein ähnliches Expressionsniveau unabhängig von der ITIH5-Expression auf. Neben der Rolle innerhalb der TGF- β Signalkaskade moduliert Endoglin die Zellmigration durch die Regulation der Zusammensetzung fokaler Adhäsionskomplexe (Conley *et al.* 2004; Sanz-Rodriguez *et al.* 2004). Die Fokale Adhäsions Kinase (FAK), eine intrazelluläre nicht-Rezeptor Tyrosin Kinase, spielt eine essentielle Rolle in der Signaltransduktion zwischen der ECM und den fokalen Adhäsionskomplexen (Burrige *et al.* 1988). So konnte auf der nächsten Stufe gezeigt werden, dass die basale FAK-Expression in den ITIH5-positiven Zellen herauf-reguliert vorlag, während die phosphorylierte, aktive Form (pFAK) in den ITIH5- und Leerklonen auf einem ähnlichen Level vorlag. Ein zentrales Molekül der FAK-Signalkaskade stellt die Src-Kinase dar, deren basale Expression im Folgenden analysiert wurde. Interessanterweise konnte hier eine mutmaßliche Degradation der Kinase beobachtet werden. Der scheinbare Abbau der Src-Kinase wurde durch die Ausbildung distinkter Doppelbanden in den analysierten ITIH5-Klonen #4 und #7 ersichtlich. Diese Doppelbanden konnten jedoch auch in dem Leerklon #3 nachgewiesen werden, wodurch ein direkter Einfluss von ITIH5 auf diese Degradationserscheinung fraglich ist. Weiterhin konnte als intermediäres Zielmolekül der FAK/Src Signaltransduktions-Kaskade eine evidente Abnahme der Phosphorylierung von STAT1 (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*), aber nicht von STAT3 unter dem Einfluss von ITIH5 aufgezeigt werden. Zudem kennzeichneten sich die ITIH5-Klone durch eine erhöhte Expression von Calveolin-1, dem eine inhibitorische Funktion der c-Src-Kinase zugetragen wird. Die prominenten Proliferations- und Migrationsmarker Marker Cyclin D1 und c-MYC, die über Moleküle wie etwa dem STAT1 transkriptionell aktiviert werden können, wurden abschließend untersucht. Hier konnte eine moderate Reduzierung der Cyclin D1-Expression in den ITIH5-positiven Zellen aufgezeigt werden, während die c-MYC-Expression in allen Klonen nahezu identisch vorlag. Abbildung 3-27 fasst die Proteinexpression der untersuchten Zielgene der möglichen ITIH5-modulierten Signaltransduktionskaskade zusammen (Die Generierung dieser Daten erfolgte in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Weiskirchen des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Uniklinik RWTH Aachen).

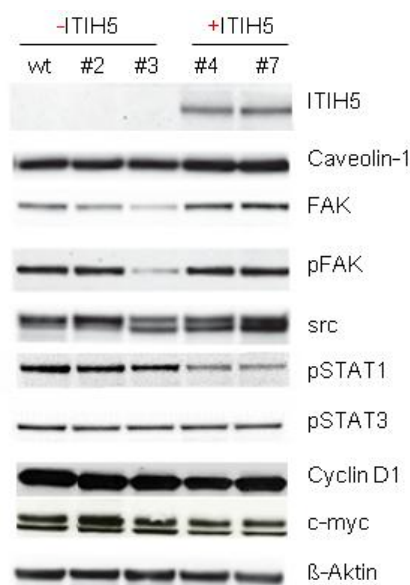


Abbildung 3-27: Die differenzielle Expression FAK/Src-assoziiierter Signaltransduktions-Moleküle in den ITIH5-Klonen. Die Reexpression der aufgezeigten Moleküle in den MDA-MB-231-Mammakarzinomzellen wurde mittels der Westernblot-Methode verifiziert. Analysiert wurden die die Leerkclone #2 und #3 sowie der Wildtyp gegenüber den ITIH5-Klonen #4 und #7. Die Ladekontrolle β -Aktin verdeutlicht die eingesetzte Proteinmenge (Kooperation mit Prof. Dr. Ralf Weiskirchen).

3.3.2.3 METHYLIERUNGSANALYSE ITIH5-ASSOZIIERTER ZIELGENE

Ein zentrales Charakteristikum der Tumorgenese ist ein aberrantes DNA-Methylierungsprofil zentraler Tumorsuppressorgene, welche unmittelbar zu Beginn oder im Verlauf einer Neoplasie transkriptionell stillgelegt werden und so in ihrer evidenten Kontrollfunktion nicht mehr agieren können. Über eine CpG-Insel Vorhersage Analyse (EMBOSS Cpgplot) konnte für das BT20-Zellkulturmodell gezeigt werden, dass 53 der 76 (69,7%) mit ITIH5 koexprimierten Zielgene eine CpG-Insel im Genpromotor besitzen. In dem MDA-MB-231-Tumormodell zeigten sogar 76 der 83 (80,7%) unter ITIH5 herauf-regulierten Gene eine CpG-Insel im Genpromotor. Dabei wurde eine Zielgenesequenz von jeweils 600 Basenpaaren 5'-aufwärts und 1.000 Basenpaaren 3'-abwärts vom Transkriptionsstartpunkt betrachtet und nur CpG-Inseln mit DNA-Regionen >500 bp und einem GC-Gehalt von mehr als 55% gewertet (Takai and Jones 2002). Damit stellen die ITIH5-assoziierten Zielgene, die durch die Expression von ITIH5 reexprimiert werden, in beiden Tumormodellen ein interessantes Target für DNA-Methylierung im Verlauf der Karzinogenese dar. Aufgrund des höheren Anteils CpG-Insel assoziierter ITIH5-Zielgene wurde sich im weiteren Verlauf der experimentellen Analysen nur auf das MDA-MB-231-Zellmodell konzentriert. In diesem Zusammenhang erschien die phänotypische Veränderung der MDA-MB-231-Zellen nach ITIH5-Reexpression zu einer epithelialen geordneten Struktur, mit einer deutlich geringeren Aggressivität der Zellen (Rose 2013) besonders interessant. Der strukturelle Prozess der

Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) impliziert bereits Veränderungen innerhalb des DNA-Methylierungsmusters zentraler EMT-assoziiierter Gene (Lombaerts *et al.* 2006). In diesem Kontext wurde für das MDA-MB-231-Tumormodell die Hypothese erstellt, dass die ITIH5-koexprimierten Kandidatengene möglicherweise durch eine Demethylierung des Genpromotors transkriptionell reaktiviert werden. Aufgrund dessen wurde nachfolgend das DNA-Methylierungsprofil in drei ausgewählten koexprimierten ITIH5 Zielgenen in den MDA-MB-231 Leer- und ITIH5-Klonen untersucht (Abb. 3-28). Die ausgewählten Zielgene ließen sich anhand der GO-Annotationen u.a. in Tumorgenese-relevante GO-Termini einordnen. So konnte Endoglin in den GO-Termini „Rezeptor Aktivität“ (GO:0004872), „Extrazellulärer Raum“ (GO:0005615) und „Regulation der Zelladhäsion“ (GO:0030155) eingeordnet werden. Dahingegen wurde NDRG2 innerhalb der Termini „Regulation der Signalwege ERK1/ERK2“ (GO:0070372), „MAPK1“ (GO:0043408) und „Wnt“ (GO:0016055) gelistet, die im Mammakarzinom häufig dereguliert sind. EHD3 konnte den GO Termini „Homöostase“ (GO:0042592), „Organisation der Plasmamembran“ (GO:0007009) und der „Wundheilung“ (GO:0042060) zugeordnet werden. Über diese Zielgene wurde folglich ein breites Spektrum relevanter Prozesse und Lokalisationen der Karzinogenese abgedeckt.

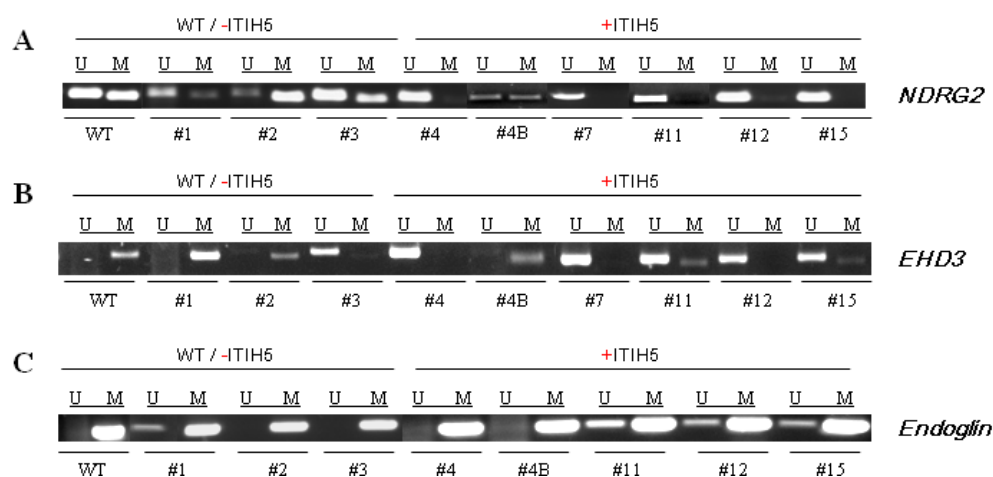


Abbildung 3-28: DNA-Methylierungsprofil der ausgewählten koexprimierten ITIH5-Zielgene *NDRG2*, *EHD3* und *Endoglin*. Die Zielgene *NDRG2* und *EHD3* zeigen, mit Ausnahme des ITIH5-Klons #4B, in den ITIH5-Klonen im Vergleich zu den Leerklonen einen evidenten Verlust der DNA-Methylierung. MSP-Analysen der *NDRG2* (A), *EHD3* (B) und *Endoglin* (C) Promotorsequenz in ausgewählten Leer- und ITIH5-Klonen sowie dem MDA-MB-231-Wildtyp (#). Mit U und M gekennzeichnete Banden repräsentieren unmethylierte (U) und methylierte (M) Bis-DNA für den jeweils untersuchten Promotorbereich. *In vitro* hergestellte polymethylierte humane Bis-DNA (M-Kontrolle) sowie vollständig unmethylierte humane Bis-DNA (U-Kontrolle) (Qiagen, Hilden) dienten als Spezifitätskontrollen. Wasser fungierte als Negativkontrolle (engl. *no template control*, NTC). Zur Qualitätssicherung wurde jeder Assay mit genomischer unbehandelter humaner DNA (DNA-Kontrolle) (Qiagen, Hilden) analysiert.

Die MSP-Analyse zeigte eine Demethylierung der untersuchten CpG-Dinukleotide. Bezüglich des *NDRG2*-Promotors zeigten der Wildtyp und die Leerkclone eine moderate (#1) bis starke (#WT, #2, #3) Methylierung, während in den *ITIH5*-Klonen #7 und #1 keine und in den *ITIH5*-Klonen #4, #11, #12 nur eine schwache Methylierung vorhanden war. Lediglich der *ITIH5*-Klon #4B zeigte noch eine deutlich nachweisbare Methylierung. Dieser *ITIH5*-Klon zeigte sich auch im *EHD3*-Promotor methyliert ohne detektierbare unmethylierte DNA. Die weiteren *ITIH5*-Klone kennzeichneten sich bezüglich der *EHD3*-Methylierung durch einen hohen Anteil unmethylierter DNA. Die unmethylierte DNA war bis auf Leerklon #3 im Wildtyp und den Leerklonen #1 und #2 nicht aufzuzeigen. Dieser „Methylierungsswitch“ in der untersuchten Promotorsequenz von Endoglin, wenn auch mit einem heterogenen Profil, ebenfalls dargelegt werden. Hier zeichneten sich sowohl die *ITIH5*- wie auch die Leerkclone durch eine starke Methylierung aus, wobei die *ITIH5*-Klone #11, #12 und #15 ebenfalls einen Anteil unmethylierter DNA aufwiesen.

Durch eine nachfolgende Literaturrecherche rückte vor allem das putative Tumorsuppressorgen *NDRG2* in den Fokus weiterer experimenteller Analysen. Neben der klaren tumorsuppressiven Rolle von *NDRG2* in unterschiedlichen Tumorentitäten zeigten verschiedene Studien einen Zusammenhang mit dem TGF- β -Signalweg sowie den postulierten GO-Termini. In Kombination mit der Demethylierung des *NDRG2*-Promotors stellte *NDRG2* ein interessantes Target für nachfolgende Analysen dar, um das biologische Wirkungsspektrum von *ITIH5* weiter aufschlüsseln zu können.

3.4 DAS TUMORSUPPRESSORGEN *NDRG2* ALS POTENTIELLES TARGET DER *ITIH5*-VERMITTELTELTEN SIGNALTRANSDUKTION

3.4.1 PYROSEQUENZIERUNGSANALYSE DES *NDRG2*-PROMOTORS

Um die beobachtete Demethylierung distinkter CpG-Dinukleotide des *NDRG2*-Promotors nach *ITIH5*-Reexpression neben der qualitativen MSP-Analyse auch auf quantitativer Ebene bestätigen zu können, sollten im Folgenden die MDA-MB-231-Zellklone einer detaillierteren Pyrosequenzierungsanalytik unterzogen werden. Einen quantitativen Überblick über den Methylierungsgrad 29 analysierter CpGs innerhalb des pyrosequenzierten *NDRG2*-Promotorareals (Pyrogramm) der Leer- und *ITIH5*-Klone ist in Abbildung 3-29 dargestellt.

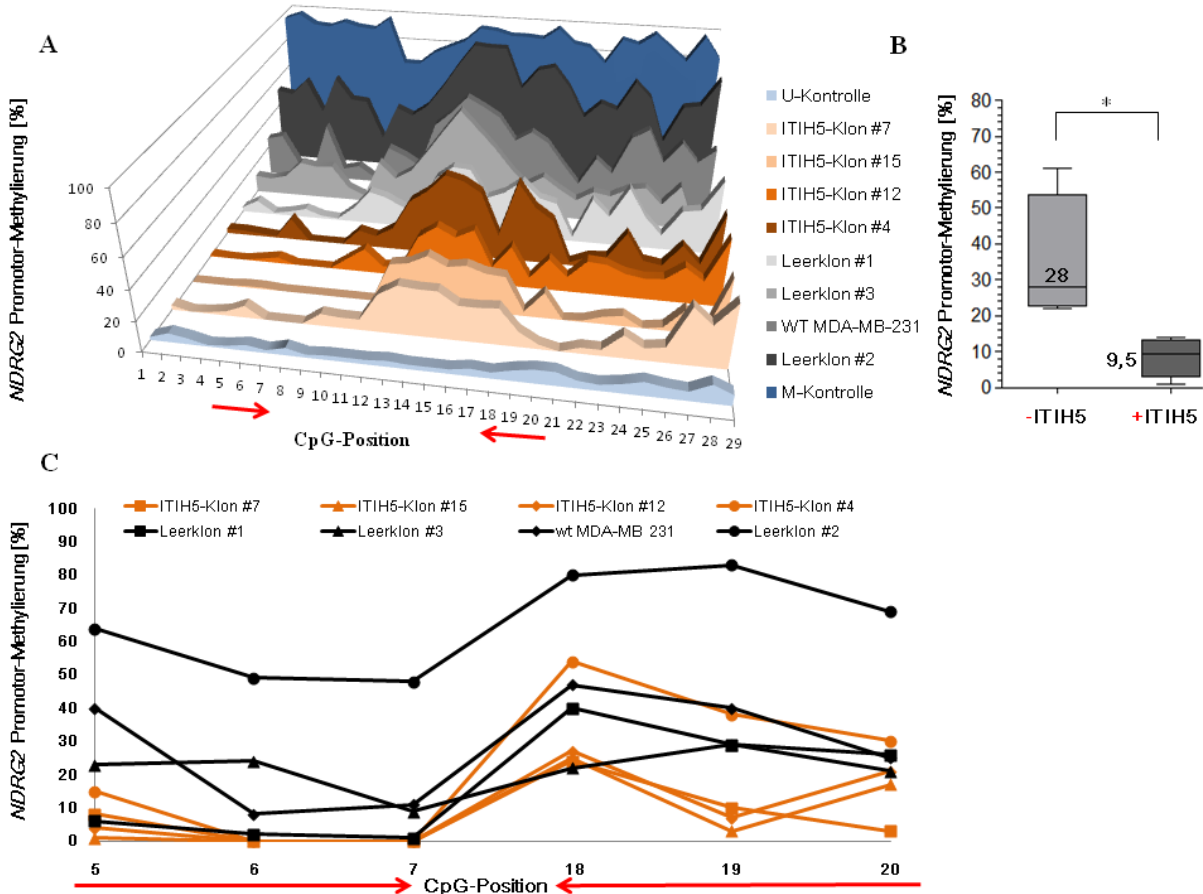


Abbildung 3-29: Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide im *NDRG2*-Promotor der MDA-MB-231-Zellklone. (A) 3D-Darstellung der analysierten CpG-Einheiten im *NDRG2*-Promotor als Pyrogramm für die untersuchten MDA-MB-231-Wildtyp Zellen, die Leerklone (#1, #2, #3) sowie die ITIH5-Klone (#4, #7, #12, #15). Die ITIH5-Klone (rosa: geringste Methylierung in der ITIH5-Gruppe; braun: stärkste Methylierung in der ITIH5-Gruppe) zeigen im Median (vergl. Abb. 3-28 B) eine geringere Methylierungsfrequenz gegenüber der Leerklone und dem Wildtyp (hellgrau: geringste Methylierung in der Leerklon/Wildtyp-Gruppe; dunkelgrau: stärkste Methylierung in der Leerklon/Wildtyp-Gruppe), wenngleich sich das Methylierungsprofil in allen Klonen sehr heterogen darstellt. UK: unmethylierte Kontrolle; MK: *in vitro* methylierte Kontrolle. Die Methylierungsstärke jedes CpG-Dinukleotides wurde mit der Methylierungsfrequenz (Hintergrundrauschen) der korrespondierenden CpG-Einheit der U-Kontrolle verrechnet. (B) Box-Plot-Darstellung der medianen Methylierungsfrequenz aller 29 CpG-Positionen. Die ITIH5-Klone zeigten eine im Median 19% geringere Methylierungsfrequenz. Horizontale Linie: Median; vertikale Linie: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; *P<0,05, zweiseitiger *Mann-Whitney U* Test. (C) 2D-Ansicht der heterogenen Methylierungsfrequenzen der sechs CpG-Dinukleotide, welche qualitativ mit der MSP im *NDRG2*-Promotorbereich analysiert wurden. Die roten Pfeile repräsentieren die relativen Hybridisierungsbindestellen der MSP-Primer. In Bezug zur Methylierungsfrequenz zeigte sich CpG 5-7 in den ITIH5-Klonen nahezu unmethyliert, während bei den CpG-Positionen 18-20 ein Anstieg festzustellen war.

Die Pyrosequenzierungsanalyse des *NDRG2*-Promotors in den MDA-MB-231-Zellklonen bestätigte das differenzielle Methylierungsmuster zwischen den Leer- und ITIH5-Klonen. In Einklang mit den Ergebnissen der qualitativen MSP zeigte der Leerklon #1 über die Gesamtheit der analysierten CpG-Positionen die geringste

Methylierungsrate (Median: 22%). Parallel dazu wiesen die *ITIH5*-Klone #4 (Median: 11%) und #12 (Median: 15%), verglichen mit den *ITIH5*-Klonen #7 (Median: 8%) und #15 (Median: 1%) höhere mediane Methylierungswerte auf (Abb. 3-28A und Abb. 3-29A). Insgesamt kennzeichnete die *ITIH5*-Klone (Median: 9,5% ± 5,6) eine signifikant geringere Methylierungsfrequenz von 18,5% gegenüber der Kontrollgruppe (-*ITIH5*, Median: 28% ± 18) (Abb. 3-29B). Der Methylierungsnachweis der MSP basiert auf den relativen Hybridisierungsbindestellen der eingesetzten MSP-Primer. So zeigte sich, dass besonders die Hybridisierungsbindestellen der *sense* Strang amplifizierenden M-Primer (CpG-Position 5, 6, 7) mit Ausnahme des Leerklons #1 deutlich geringere Methylierungsraten aufzeigten und damit eine hohe diskriminatorische Kraft zwischen der Methylierung in den *ITIH5*- und Leerklonen abbildeten (Abb. 3-29C). Die Hybridisierungs-CpG-Positionen der *anti-sense* Strang amplifizierenden M-Primer (CpG-Position 18, 19, 20) manifestierten ein heterogenes Methylierungsprofil, wobei die CpG-Position 19 die stärkste diskriminatorische Kraft besaß.

3.4.2 *NDRG2*-REEXPRESSION NACH *IN VITRO* DEMETHYLIERUNG

Die Korrelation zwischen der *NDRG2*-Promotormethylierung und dem Expressionsverlust in den Leerklonen des MDA-MB-231-Tumormodells lies auf einen epigenetisch-assoziierten reprimierenden Regulationsmechanismus schließen. Auf dieser Schlussfolgerung aufbauend sollte eine *in vitro* Demethylierung des *NDRG2*-Promotors mit einer Reexpression des Gens einhergehen. Zu diesem Zweck wurden MDA-MB-231-Wildtyp-Zellen sowie die Leerklone mittels 5'-Aza-2'-Deoxycyridin (DAC) behandelt. DAC führt zu einer globalen Demethylierung der Zellen, die lediglich den Methylierungsstatus der Tochterzellen und nicht den der parentalen Zellen beeinflusst. Der synergistische Einfluss übergeordneter epigenetischer Mechanismen wird u.a durch die Histonacetylierung gesteuert und führt zu einer transkriptionell reprimierenden Kondensation des Chromatins (Jones & Baylin 2002). Dieser Prozess sollte zusätzlich durch den Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) unterbunden werden. Als Folge der demethylierenden Behandlung konnte anschließend mittels MSP eine moderate qualitative Abnahme der M-Bandenstärke verifiziert werden. Repräsentative MSP-Bilder sind in Abbildung 3-30A für die behandelten Leerklone und den Wildtyp dargestellt. Die Quantifizierung des Methylierungsgrades mittels Pyrosequenzierung bekräftigten die qualitativen MSP-Ergebnisse, obgleich die Reduktion der medianen Methylierungsfrequenz mit 5,5% gering war (Abb.3-30B). Leerklon #1 zeigte mit 11% die stärkste mediane Verringerung der Methylierungsfrequenz gegenüber der DAC/TSA Behandlung. Der Nachweis einer Demethylierung konnte ebenfalls mittels einer *Real-Time*

PCR basierten Expressionsanalyse für den *NDRG2*-Promotor auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Korrespondierend zu dem Methylierungsstatus zeigte der Leerklon #1 eine 126-fache, der Leerklon #2 eine 52-fache, der Leerklon #3 eine 18-fache und die Wildtyp Zellen eine 4-fache Induktion der *NDRG2*-Expression nach Behandlung mit DAC/TSA. Die *in vitro* Applikation von TSA rief unabhängig von der Demethylierung ein deutlich erhöhtes Expressionsprofil hervor (Abb. 3-30C).

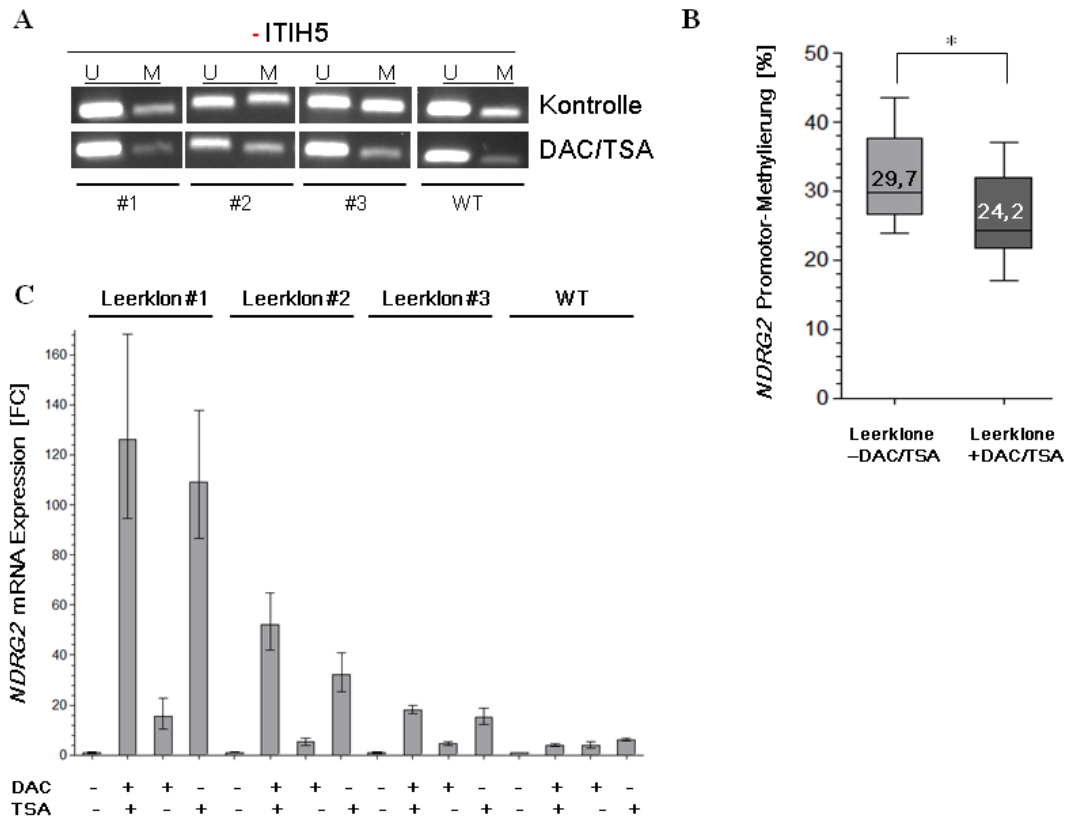


Abbildung 3-30: Die *NDRG2*-Reexpression korreliert mit einer *NDRG2*-Promotor-Demethylierung. **(A)** Der Methylierungsstatus des mittels MSP untersuchten *NDRG2*-Promotorbereichs vor (Kontrolle) und nach (DAC/TSA) *in vitro* Demethylierung der MDA-MB-231-Wildtyp- und Leerklon-Zellen. Mit U und M gekennzeichnete 2%ige-Agargaosegel-Banden stellen unmethylierte (U) und methylierte (M) *NDRG2*-Sequenzen dar. *In vitro* hergestellte polymethylierte humane Bis-DNA (M-Kontrolle) sowie vollständig unmethylierte humane Bis-DNA (U-Kontrolle) (Qiagen, Hilden) dienen als Spezifitätskontrollen. Wasser fungierte als Negativkontrolle (engl. *no template control*, NTC). **(B)** Box-Plot-Darstellung der quantitativ ermittelten Methylierungsstärke (Pyrosequenzierung) des *NDRG2*-Promotors vor (-) und nach (+) DAC/TSA Behandlung für die MDA-MB-231-Wildtyp- und Leerklon-Zellen. Horizontale Linie: Median; vertikale Linie: Minimum und Maximum; Box: 25% bis 75% Quartile; * $P < 0,05$, zweiseitiger *Mann-Whitney* U Test. **(C)** Semiquantitative *Real-Time* PCR der *NDRG2*-Reexpression (FC) in Relation zum Haushaltsgen *GAPDH* nach DAC, TSA oder DAC/TSA Behandlung des gleichen Demethylierungs-Experiments in den MDA-MB-231-Wildtyp- und Leerklon-Zellen. Die *NDRG2*-Expressionswerte vor DAC/TSA Behandlung dienten jeweils als Normierung und wurden gleich 1 gesetzt. Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung.

3.4.3 DIE ASSOZIATION DER *ITIH5*- UND *NDRG2*-EXPRESSION IN PRIMÄREN MAMMAKARZINOMEN

Die anhand des MDA-MB-231-Tumormodells gewonnenen Daten der *NDRG2*-Expression, die durch die *ITIH5*-Induktion auf das 265-fache gegenüber der Wildtyp- und Leerklon Zellen gesteigert wurde (vergl. Abb. 3-25B), sollte im Folgenden bezüglich der *in vitro* Proteinexpression in den Zellklonen sowie der *ex vivo* Expression an Brustkrebsgeweben verifiziert werden. Die Demethylierung des *NDRG2*-Promotors in den *ITIH5*-Klonen impliziert einen möglichen *ITIH5*-basierten epigenetischen Mechanismus der transkriptionellen Reaktivierung des *NDRG2*-Promotors und korrelierend damit konnte in den *NDRG2* exprimierenden *ITIH5*-Klonen ebenfalls eine Reexpression des *NDRG2*-Proteins (Abb. 3-31) gezeigt werden.

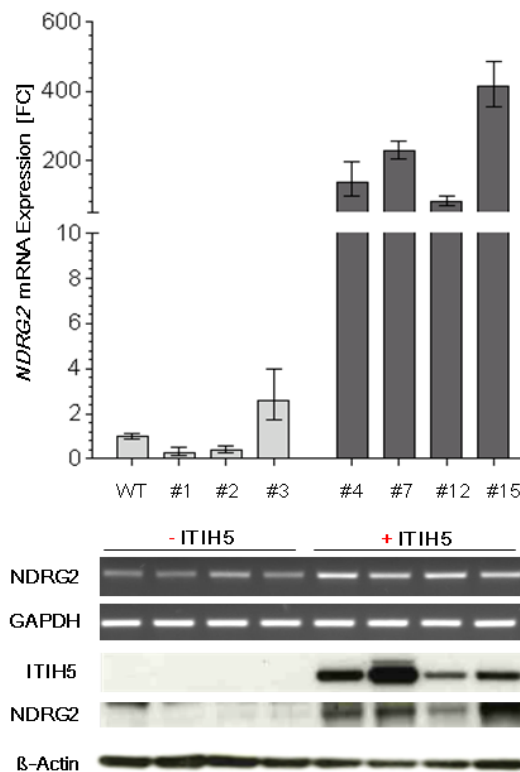


Abbildung 3-31: Die *NDRG2*-Reexpression in den *ITIH5*-Klonen findet auf RNA- und Proteinebene statt.

Die *NDRG2*-Reexpression in den MDA-MB-231-Brustkrebszellen wurde mittels *Real-Time* und der Western Blot Methode verifiziert. Der obere Graph zeigt die relative *NDRG2*-mRNA-Expression in MDA-MB-231-Wildtyp-Zellen (WT), die zur Normierung aller weiteren Expressionslevel herangezogen und gleich 1 gesetzt wurde. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. Im unteren Bereich der Abbildung ist die korrespondierende *NDRG2*-Proteinexpression im Vergleich zur *ITIH5*-Proteinkonzentration und zur Ladekontrolle β -Aktin dargestellt und zeigt sichtbare *ITIH5*- und *NDRG2*-Proteinbanden ausschließlich in den *ITIH5*-transfizierten MDA-MB-231-Klonen.

Um eine mögliche physiologische Relevanz zwischen dem tumorsuppressiven Wirkungsspektrum von *ITIH5* und *NDRG2* weiter zu entschlüsseln - unter der Hypothese einer *ITIH5*-vermittelten Reaktivierung der *NDRG2*-Expression - wurde an *ex vivo* gewonnenen Brustkrebsgeweben das lineare Korrelationsverhältnis der *NDRG2*- und *ITIH5*-Expression analysiert. Dazu wurde ein Kollektiv aus 37 Brustkrebsgeweben und neun angrenzenden Normalgeweben derselben Patientinnen bezüglich der *NDRG2*- und *ITIH5*-Expression untersucht. Die Ergebnisse der *NDRG2*-Expressionsanalyse des Kollektivs sind in Abbildung 3-32 dargestellt.

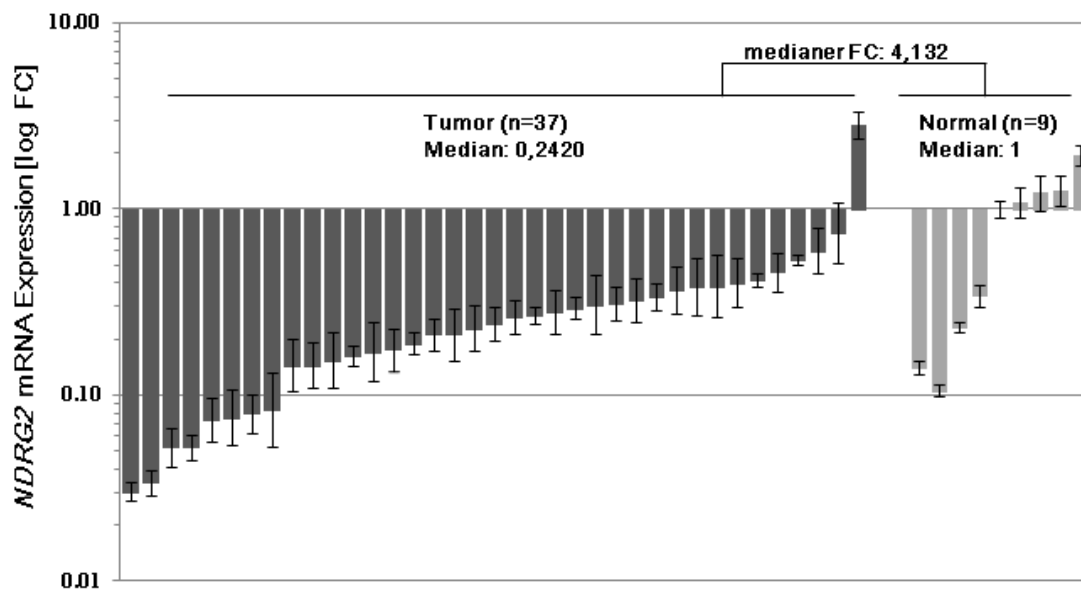


Abbildung 3-32: Die *NDRG2*-Expression geht im Brustkrebsgewebe verloren. (A) *Real-time* PCR Analyse der *NDRG2*-Expression (*Fold Change*, FC) in 37 Brustkrebsgeweben und neun angrenzenden Normalgeweben. Die Berechnung der medianen *NDRG2*-Expression der Tumorgewebe erfolgte durch Normierung auf die mediane Expression der angrenzenden Normalgewebe. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: \pm Fehler der Dreifachbestimmung. Die Analyse zeigte einen signifikanten, im Median 4-fachen Verlust der *NDRG2*-Expression in den Tumorgeweben.

In dieser Arbeit konnte ein im Median signifikanter ($P=0,040$) 4,13-facher Verlust der *NDRG2*-Expression in Brusttumoren (Median: 0,242; Spannweite: 0,03-2,83; 25-75% Quartile: 1,45-0,37) gegenüber den angrenzenden Normalgeweben gezeigt werden. Normiert auf die mediane Expression der angrenzenden Normalgewebe war die *NDRG2*-Expression in 36 von 37 (97,3%) der analysierten Tumoren herunter-reguliert. Die heterogene *NDRG2*-Expression in den Normalgeweben könnte durch die Tumor-angrenzende Lokalisation dieser Gewebe begründet sein, die zwar histologisch gesund erscheinen, jedoch auf genetischer Ebene durchaus molekulare Veränderungen aufzeigen können (Yan *et al.* 2006).

Um den Zusammenhang der *NDRG2-ITIH5*-Expression im Mammakarzinom aufzeigen zu können, wurde im Folgenden eine Korrelationsanalyse mit den Expressionsdaten beider Moleküle durchgeführt. Die Dichotomisierung erfolgte auf den jeweiligen medianen *Fold Change* (FC) der Tumorgewebe-Expression. In der Korrelationsanalyse (Abb.3-33) zeigte sich ein hochsignifikanter ($P=0,0062$) linearer Zusammenhang zwischen der *ITIH5*- und der *NDRG2*-Expression im Tumorgewebe. Die relativen RNA-Expressionswerte beider Gruppen zeigten einen positiven Korrelationskoeffizienten von 0,442 (*Spearman*-Korrelation).

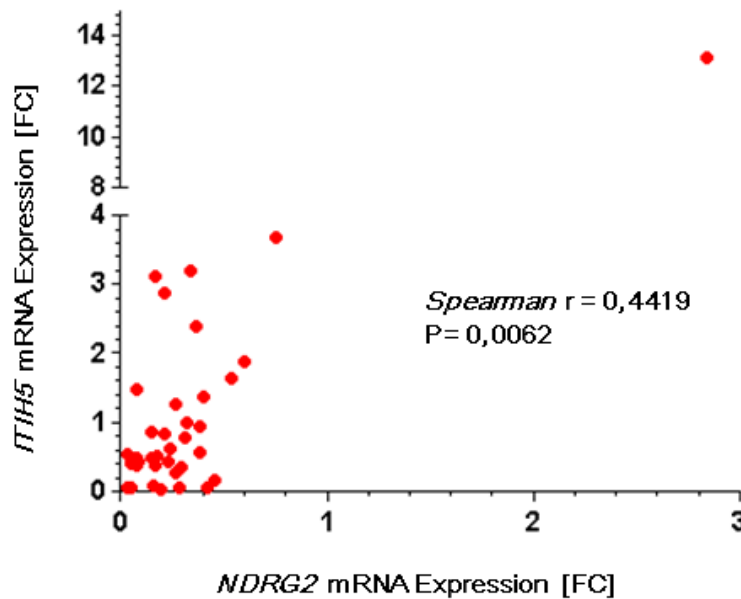


Abbildung 3-33: Positive Korrelation zwischen der *ITIH5*- und der *NDRG2*-RNA-Expression in Mammakarzinomgeweben. Ordinate: relative *ITIH5* RNA-Expression. Abszisse: relative *NDRG2*-RNA-Expression. Die roten Punkte zeigen die Expressionswerte jeweiliger Patienten-Proben. r: Korrelationsanalyse nach *Spearman*.

Ebenfalls ließ sich eine signifikante ($P=0,013$) positive Korrelation zwischen der *NDRG2*- und *ITIH5*-Expression auf RNA-Ebene mit dem *Chi-Quadrat Test* nach Pearson nachweisen (Tab. 3-13).

Tabelle 3-13: Korrelation der mRNA-Expression von *ITIH5* und *NDRG2* in primären Mammakarzinomen

| <i>NDRG2</i> -mRNA-Expression | n ^a | <i>ITIH5</i> -mRNA-Expression | | Korrelation ^c | P-Wert ^d |
|-------------------------------|----------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------|
| | | gering (FC≤0,577) | hoch (FC>0,577) ^b | | |
| gering (FC≤0,242) | 19 | 13 | 6 | 0,406 | 0,013 |
| hoch (FC>0,242) | 18 | 5 | 13 | | |

^aProben von Patientinnen mit einem primären, unilateralen, invasiven Mammakarzinom; ^bDichotomisierung am medianen *Fold Change* (FC) der Tumorgewebe-Expression; ^c*Pearsons* Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient; ^d*Chi-Quadrat* Test nach *Pearson* mit zweiseitigem Signifikanzlevel ($P<0,05$).

Um die physiologische Relevanz der *NDRG2-ITIH5*-Expression auch auf Proteinebene aufzeigen zu können, wurde im Rahmen dieser Studie ein *Tissue Micro Array* (TMA) für beide Moleküle gefärbt, miteinander korreliert und statistisch analysiert. In dieser Studie wurde eine starke *NDRG2-* (IRS=6-12) sowie *ITIH5*-Expression (IRS=9-12) in Anlehnung an den Median der jeweiligen gesamten Immunreaktivitätswerte des TMA dichotomisiert. Im Einklang mit den mRNA-Expressionsdaten konnte auf Proteinebene eine signifikante positive Korrelation ($P < 0,0001$) zwischen der *NDRG2-* und *ITIH5*-Expression bestätigt werden (Tab. 3-14).

Tabelle 3-14: Korrelation der Protein-Expression von *ITIH5* und *NDRG2* in primären Mammakarzinomen

| <i>NDRG2</i> Immunoreaktivität ^b | n ^a | <i>ITIH5</i> Immunoreaktivität ^b | | Korrelation ^d | P-Wert ^e |
|---|----------------|---|------------------------------|--------------------------|---------------------|
| | | gering (IRS 0-8) | hoch (IRS 9-12) ^c | | |
| gering (IRS 0-5) | 77 | 49 | 28 | 0,343 | <0,0001 |
| hoch (IRS 6-12) | 85 | 25 | 60 | | |

^aProben von Patientinnen mit einem primären, unilateralen, invasiven Mammakarzinom; ^bImmunoreaktiver Wert (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele & Stegner 1987); ^cDichotomisierung am medianen Immunoreaktiven Wert der Tumorgewebe; ^d*Pearsons* Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient; ^e*Chi-Quadrat* Test nach *Pearson* mit zweiseitigem Signifikanzlevel ($P < 0,05$).

3.4.4 DER EINFLUSS DER *ITIH5-NDRG2*-EXPRESSION AUF DAS UNIVARIATE UND MULTIVARIATE ÜBERLEBEN DER PATIENTINNEN

Im nächsten Schritt sollte die klinische Relevanz der auf RNA- und Proteinebene korrelierenden *NDRG2-ITIH5*-Expression auf das Überleben von Brustkrebs-Patientinnen gezeigt werden. Zunächst wurde eine mögliche Assoziation mit den klinisch-pathologischen Parametern der Tumorgewebe des TMA überprüft. Die Analyse zeigte, dass die Kombination der *NDRG2-* und *ITIH5*-Expression keine Signifikanz hinsichtlich der untersuchten Parameter aufweist (Tab. 3-15).

Im Anschluss wurde eine univariate sowie multivariate Überlebensanalyse durchgeführt, um einen möglichen Einfluss der *NDRG2-ITIH5*-Expressionsachse auf die Rezidiv- und Metastasenentwicklung darzulegen. Dazu wurde eine *in silico* Analyse der *ITIH5-NDRG2*-Expression in der großen und unabhängigen Kohorte der GOBO-Datenbank durchgeführt.

Tabelle 3-15: Die Assoziation der *NDRG2-ITIH5*-Expression zu den klinisch-pathologischen Parametern.

| | n ^a | NDRG2-ITIH5-Expression | | P-Wert ^b |
|--|----------------|--|--|---------------------|
| | | NDRG2 ⁰⁻⁶ ITIH5 ⁰⁻⁸ | NDRG2 ⁶⁻¹² ITIH5 ⁹⁻¹² | |
| Total | 109 | 49 | 60 | |
| Parameter | | | | |
| Alter bei Diagnose | | | | |
| | | Median; 60 ^a | | |
| | | <60 | 32 | 0,765 |
| | | ≥60 | 28 | |
| Tumorgröße^c | | | | |
| | | pT1-2 | 48 | 0,245 |
| | | pT3-4 | 12 | |
| Lymphknotenstatus^c | | | | |
| | | pN0 | 24 | 0,737 |
| | | pN1-3 | 34 | |
| Histologischer Grad^d | | | | |
| | | G1-2 | 33 | 0,974 |
| | | G3 | 27 | |
| Östrogenrezeptor | | | | |
| | | Negativ (IRS ^e 0-2) | 18 | 0,507 |
| | | Positiv (IRS ^e 3-12) | 34 | |
| Progesteronrezeptor | | | | |
| | | Negativ (IRS ^e 0-2) | 35 | 0,102 |
| | | Positiv (IRS ^e 3-12) | 17 | |
| HER-2 Status^f | | | | |
| | | Negativ (0, 1+, 2+) | 44 | 0,19 |
| | | Positiv (3+) | 10 | |

^aProben von Patientinnen mit einem primären, unilateralen, invasiven Mammakarzinom; ^bExakter Test nach Fischer, zweiseitiges Signifikanzniveau von $P < 0,05$; ^cEntsprechend der TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind; ^dNach Bloom und Richardson und modifiziert durch Elston und Ellis (Elston & Ellis 1993); ^eImmunoreaktiver Wert (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele & Stegner 1987); ^fÜberexpression des *HER-2* Gens wurde entsprechend dem DAKO-Score IHC-System diagnostiziert.

3.4.5 DIE *IN SILICO* ANALYSE DER *NDRG2-ITIH5*-EXPRESSIONSACHSE IM MAMMAKARZINOM

In Anbetracht der aufgezeigten moderaten Korrelation der *NDRG2-ITIH5*-Expression auf RNA- und Proteinebene sollte anhand der GOBO-Datenbank dieser Zusammenhang im Folgenden verifiziert werden. Das *in vitro* mit *ITIH5*-koexprimierte Kandidatengen *NDRG2* zeigte *in silico* in Kombination mit *ITIH5* ein signifikant erhöhtes RFÜ ($P=0,016$) und FMFÜ ($P=0,017$) in den Patientinnen mit einer hohen Expression (\log_2 Expression 0,393 bis 2,815) gegenüber einer mittleren (\log_2 Expression -0,307 bis 0,393) sowie niedrigen Expression (\log_2 Expression -0,307 bis -3,905) dieser beiden Gene. Die nachfolgende multivariate Analyse ergab ein für Brustkrebs-Patientinnen mit schwacher Expression des Kandidatengen-Dupletts ein erhöhtes 10 Jahres-Risiko von 1,39 (95% KI: 1,03 zu 1,87, $P=0,032$) für die Rezidiventwicklung, während ein 1,37-fach erhöhtes Risiko für eine Fernmetastasierung

(95% KI: 0,99 zu 1,89, $P=0,057$) vorlag. Damit stellt die *ITIH5-NDRG2*-Expressionsachse einen prognostisch unabhängigen Faktor für das Rezidiv-freie, jedoch nicht für das Fernmetastasen-freie Überleben von Brustkrebs-Patientinnen dar. Auffällig zeigte sich zudem ein signifikanter ($P<0,05$) positiver Einfluss einer hohen *NDRG2-ITIH5*-Expression auf das RFÜ in der Subgruppe der ER-positiven Tumoren (Abb. 3-34A), welcher in der Subgruppe der ER-negativen Tumoren verloren ging (Abb. 3-34B). Die multivariate Analyse zeigte eine starke prognostisch unabhängige Relevanz der hohen *NDRG2-ITIH5*-Expression für das Überleben der Patientinnen in den ER-positiven Tumoren (Abb. 3-34C). Bezüglich der Entstehung eines Rezidivs ergab das Modell für Brustkrebs-Patientinnen mit schwacher *NDRG2-ITIH5*-Expression ein erhöhtes Risiko von 1,43 (95% KI: 1,01 zu 2,02, $P=0,041$), während in der ER-negativen Gruppe der Tumoren eine geringe Zielgen-Expression mit einem 1,23-fach erhöhten Risiko der Rezidiventstehung (95% KI: 0.68 zu 2.241, $P=0,493$) einherging (Abb. 3-34D).

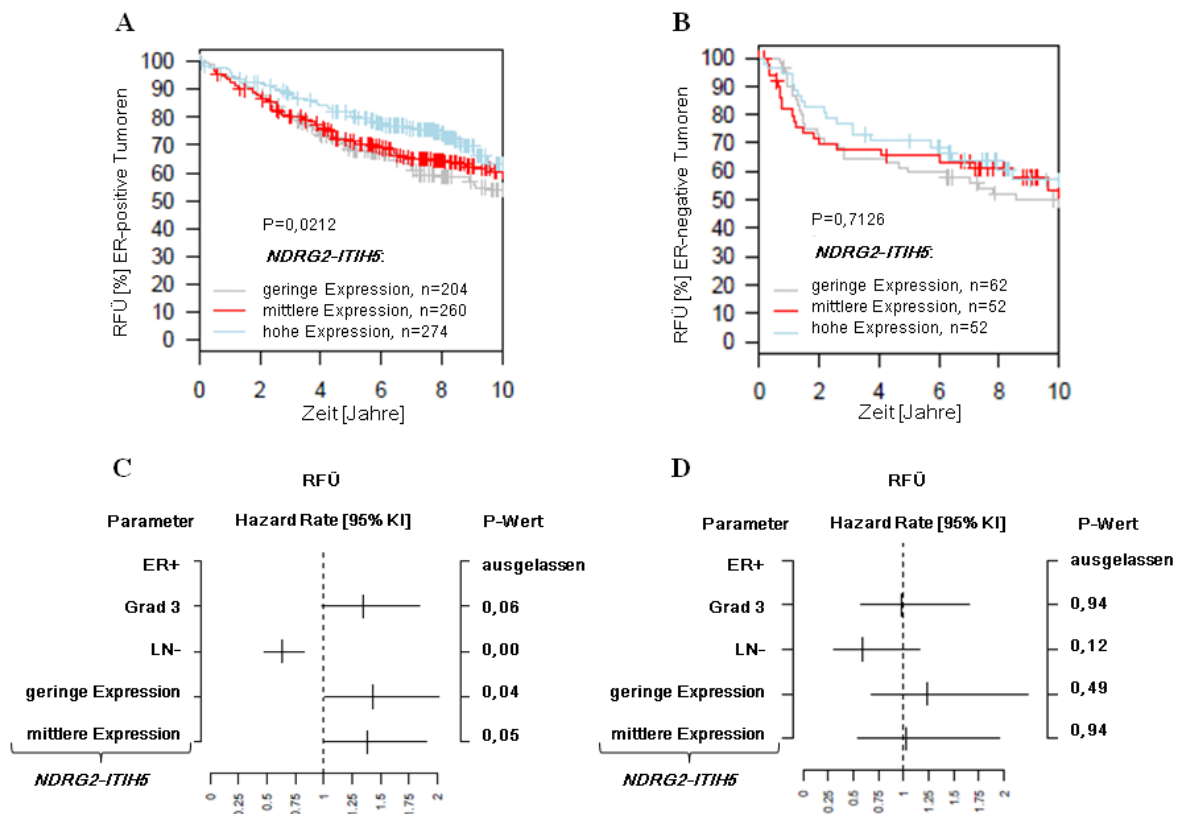


Abbildung 3- 34: Univariate und multivariate Überlebens-Analyse der *NDRG2-ITIH5*-Expressionsachse. Die Überlebensfraktion der ER-positiven und ER-negativen Tumoren der GOBO-Datenbank in Abhängigkeit der *NDRG2*- und *ITIH5*-Expression. (A) und (B) Kaplan-Meier Kurven illustrieren das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) für Patientinnen mit hoher Expression des Kandidatengen-Dupletts (log2 Expression 0,393 bis 2,815, blaue Kurve) in Relation zu Patientinnen mit einer mittleren (log2 Expression -0,307 bis 0,393, rote Kurve) bis niedrigen Expression (log2 Expression -0,307 bis -3,905, hellgraue Kurve). Vertikale Linien: zensierte Fälle. (C) und (D) Multivariate Cox Regressions-Analyse des RFÜ; ER+: Östrogenrezeptor positiv; KI: Konfidenzintervall.

3.4.6 DER EINFLUSS DES *NDRG2* *KNOCK-DOWN* AUF DAS WACHSTUMSVERHALTEN VON *MDA-MB-231-ZELLEN*

Auf der Basis der *in vitro* und *ex vivo* gewonnenen Datenlage bezüglich der korrelierenden *NDRG2*-*ITIH5*-Expression, die auch *in silico* einen evident positiven Einfluss auf die Überlebensrate aufweist, wurde die Hypothese formuliert, dass der Verlust der *NDRG2*-Expression in einem invasiveren Phänotyp der *MDA-MB-231-ITIH5*-Klone resultiert. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die RNAi Technologie genutzt (Kap. 2.14.6), um *NDRG2* in den *ITIH5*-Klonen posttranskriptionell zu inhibieren und so die funktionellen Eigenschaften dieses putativen Tumorsuppressorgens in den *ITIH5*-Klonen genauer zu definieren. Für die transiente Suppression der *NDRG2*-Expression wurden vier unterschiedliche *NDRG2*-siRNA-Sequenzen eingesetzt, um eine erhöhte Stabilität der *NDRG2*-mRNA Stilllegung zu erreichen. Als Negativkontrolle diente eine siRNA-Sequenz, die keinerlei Homologie zum menschlichen Genom besitzt, während siRNA gegen den Proliferationsmarker *MAPK1* als Positiv-Kontrolle diente. Für die Versuche wurden die *ITIH5*-Klone #4 und #7 eingesetzt.

Die siRNA-Behandlung zeigte, in Relation zu der Negativkontrolle (K) des jeweiligen Klons, bereits nach 48-stündiger Transfektion eine effektive Herabregulation der *NDRG2* mRNA im *ITIH5*-Klon #4 auf 19% sowie im *ITIH5*-Klon #7 auf 30%. Die *NDRG2*-Expression verminderte sich nach 96 Stunden auf 15% bis hin zu 13% nach 144 Stunden für den *ITIH5*-Klon #4, während der *ITIH5*-Klon #7 eine verminderte *NDRG2*-Expression von 15% nach 96 Stunden und eine noch 10%ige Restexpression nach 144 Stunden aufwies. So konnte ein fast vollständiger Verlust der *NDRG2*-mRNA-Expression nach 144 Stunden erreicht werden. Die *NDRG2*-mRNA-Mengen in den unbehandelten Zellen (U) lagen im Vergleich zu der Negativkontrolle (K) 15% bis 20% erhöht vor, wonach ein möglicherweise leicht unspezifischer Einfluss des Transfektionsreagenz auf die *NDRG2*-Expression in Betracht gezogen werden muss. Abbildung 3-35A zeigt die *NDRG2*-Expression in den siRNA-Transfektanden. Der in Abbildung 3-35B dargestellte *knock-down* der *MAPK1*-Expression zeigte sich erst nach 192 Stunden auf dem geringsten Expressionsniveau von 15% der Ausgangsstärke. Die Positivkontrolle bestätigte somit die prinzipielle Funktionalität des RNAi-vermittelten *knock-down* Experiments. Die Etablierung des induzierten *NDRG2*-Verlusts in den *MDA-MB-231-ITIH5*-Zellklonen #4 und #7 war demnach erfolgreich und übertraf in ihrer Effizienz sogar die Positivkontrolle. Der Grund hierfür könnte die Kombination von vier verschiedenen *NDRG2*-siRNAs sein.

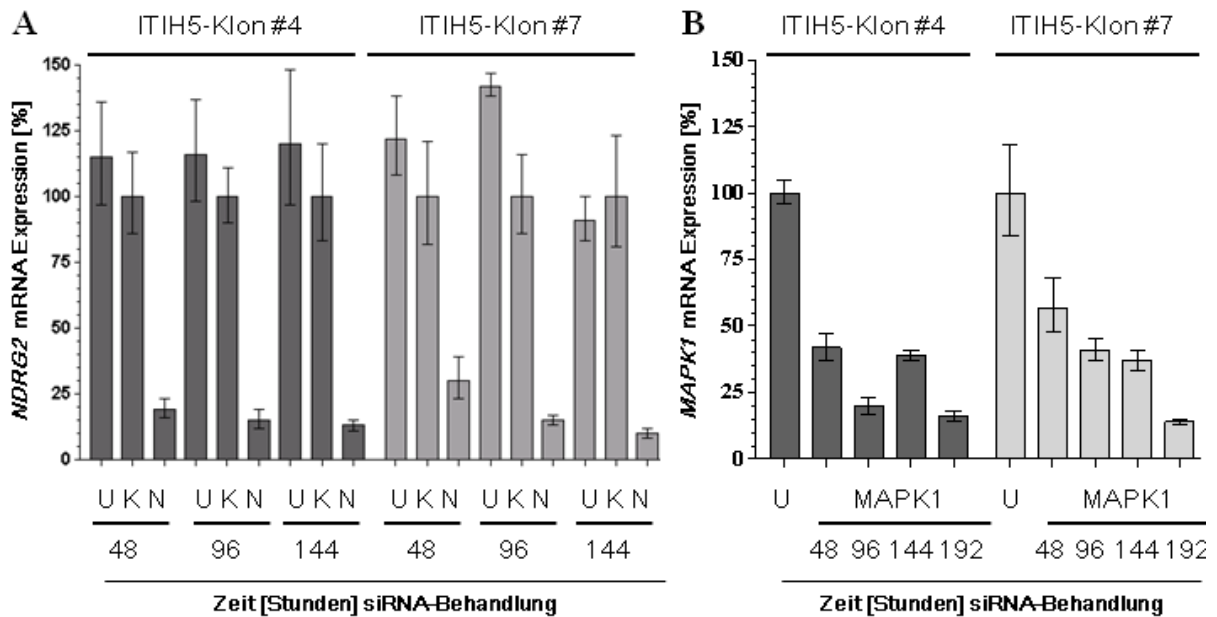


Abbildung 3-35: Der RNAi-induzierte *NDRG2*-mRNA-Expressionsverlust in den MDA-MB-231-Zellklonen ITIH5 #4 und #7. Die *NDRG2*-Expression wurde durch eine kombinierte Anwendung vier unterschiedlicher *NDRG2*-spezifischer siRNA Oligonukleotiden [je 1 μ M] auf mRNA Ebene (*Real-Time* PCR) herunter-reguliert. Für den induzierten *NDRG2* knock-down wurden 5×10^5 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät und anschließend mit den siRNAs transfiziert. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt erfolgte die Probenentnahme für die RNA-Isolation. (A) Die *NDRG2*-mRNA-Expression in unbehandelten (U), mit einer Kontroll siRNA (K) transfizierten und mit den *NDRG2*-siRNA's transfizierten ITIH5-Klonen. Dargestellt ist die Änderung der *NDRG2*-Expression 48-144 Stunden nach Transfektion. Alle Werte sind auf die Negativkontrolle (K) normiert (=100%). (B) Darstellung der kontinuierlichen Abnahme der mRNA-Expression der kommerziellen Positivkontrolle *MAPK1* während der Transfektion (48, 96, 144 und 192 Stunden) mit einer spezifischen *MAPK1* siRNA [10 μ M]. Alle Werte sind auf die basale *MAPK1*-Expression in MDA-MB-231-ITIH5-Klon #4 und #7 Zellen vor Beginn der Transfektion normiert (0 Stunden). Vertikale Linien: \pm Fehler.

Im nächsten Schritt folgte die Validierung des RNAi bedingten *NDRG2*-Verlusts auf Proteinebene. Für die Western Blot Analyse wurden im gleichen Zeitfenster zu der mRNA-Analyse Proben genommen. Allerdings wurde der Zeitrahmen für die Analyse des Proteinverlusts auf 192 Stunden erhöht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-36A und C (ITIH5-Klon #4) sowie Abbildung 3-36B und D (ITIH5-Klon #7) dargestellt. In Bezug zur Negativkontrolle (K) zeigte sich nach 96 Stunden bereits ein evidenter Proteinverlust auf 66% (ITIH5-Klon #4) und 52% (ITIH5-Klon #7) der Ausgangsstärke. Nach 192 Stunden verzeichnete der ITIH5-Klon #7 einen fast vollständigen Verlust der *NDRG2*-Expression (7% Restexpression), wohingegen der ITIH5-Klon #4 noch eine Protein-Expression von 24% aufzeigte.

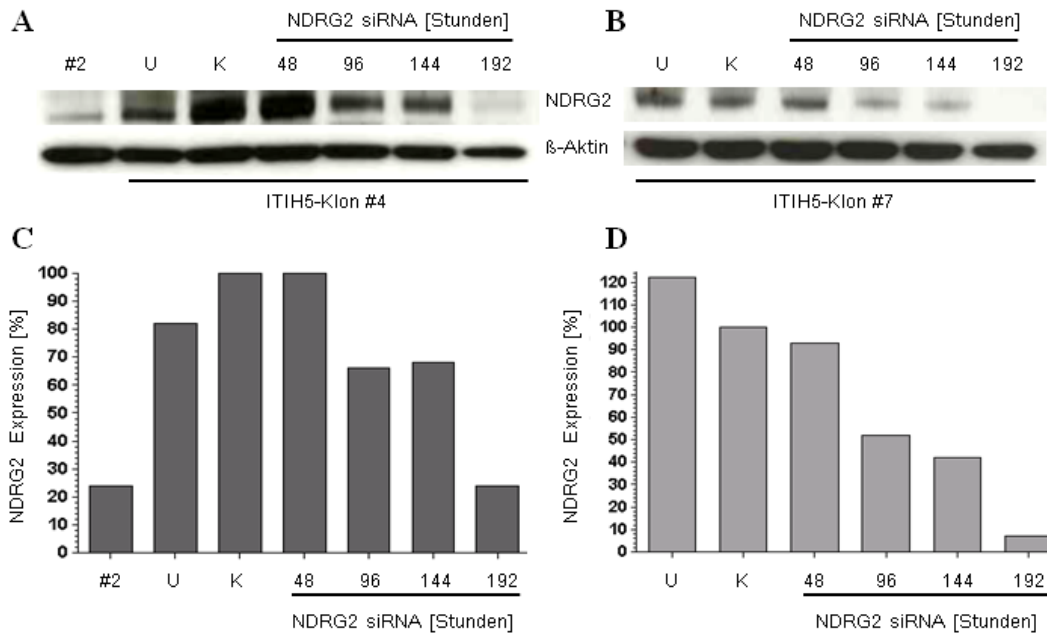


Abbildung 3-36: Der RNAi-induzierte *NDRG2*-Proteinverlust in den MDA-MB-231-Zellklonen *ITIH5* #4 und #7. Die *NDRG2*-Expression wurde durch eine kombinierte Anwendung vier unterschiedlicher *NDRG2*-spezifischer siRNA Oligonukleotiden [je 1 μ M] auf Proteinebene (WB) herabreguliert. Für den induzierten *NDRG2 knock-down* wurden 5×10^5 Zellen in 6-well Kulturschalen ausgesät und anschließend mit den siRNAs transfiziert. Zu jedem angegebenen Zeitpunkt erfolgte die Probenentnahme für die Proteininsolation. (A) und (B) Verifizierung des *NDRG2*-Proteinverlusts (WB) für den *ITIH5*-Klon #4 (A) und *ITIH5*-Klon #7 (B) über einen Zeitraum von 48 bis 192 Stunden. Die *NDRG2*-Expression ist auf die Expression von β -Aktin (Ladekontrolle) normiert. Der MDA-MB-231-Leerklon #2 diente als zusätzliche neg. Kontrolle der *NDRG2*-Proteinexpression. (C) und (D) Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse für den *ITIH5*-Klon #4 (C) und *ITIH5*-Klon #7 (D). Die siRNA-induzierte Abnahme der *NDRG2*-Expression ist auf die basale *NDRG2*-Expression der Negativkontrolle normiert.

Im Anschluss an die erfolgreiche transkriptionelle Suppression von *NDRG2*, die mit einem deutlichen Verlust der *NDRG2*-Proteinexpression einherging, wurde das Proliferations- und Migrationsverhalten der *ITIH5*-Zellklone #4 und #7 im Vergleich mit dem Leerklon #2 analysiert.

3.4.6.1 DER EINFLUSS DES *NDRG2*-VERLUSTS AUF DIE ZELLPROLIFERATION

Wie einleitend bereits formuliert sollte geklärt werden, ob der Expressionsverlust des putativen Tumorsuppressorgens *NDRG2* zu einer erhöhten Proliferation und Migration der *ITIH5*-Klone führt und damit maßgeblich an der tumorsuppressiven Wirkungsweise von *ITIH5* beteiligt ist. Zu diesem Zweck wurden die *ITIH5*-Zellklone #4 und #7 entsprechend dem etablierten RNAi-Protokoll für 192 Stunden behandelt und anschließend einem dreitägigem XTT-Proliferationsstest unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-37 zusammengefasst. Abbildung 3-37A und C zeigt das Absorptionsniveau von dem unbehandelten und RNAi-induzierten *ITIH5*-Klon #4 bzw. *ITIH5*-Klon #7 jeweils im

Vergleich mit dem Leerklon #2. Zur besseren Darstellung wurden alle Werte auf den ersten Tag der Messung normiert. Abbildung 3-37B und D kennzeichnet die prozentuale Proliferationsrate, bezogen auf die siRNA-Negativkontrolle, am dritten Tag der Analyse für den Leerklon #2 sowie ITIH5-Klon #4 und #7. Insgesamt stellte sich heraus, dass ein *NDRG2*-Expressionsverlust keinen nachweisbaren Einfluss auf die Proliferation der untersuchten ITIH5-Klone besitzt. Der Leerklon #2 wies erwartungsgemäß gegenüber den unbehandelten ITIH5-Klone sowie der Negativkontrolle eine um 30% erhöhte Proliferationsrate auf, während der Verlust des Proliferationsmarkers *MAPK1* in einer 20% verminderten Proliferation resultierte. Dahingegen zeigten die *NDRG2*-defizienten Klone, entgegen der formulierten Hypothese, keine gesteigerte Proliferation, wie es in einer Studie von Oh *et al.* 2012 bereits gezeigt werden konnte (Oh *et al.* 2012).

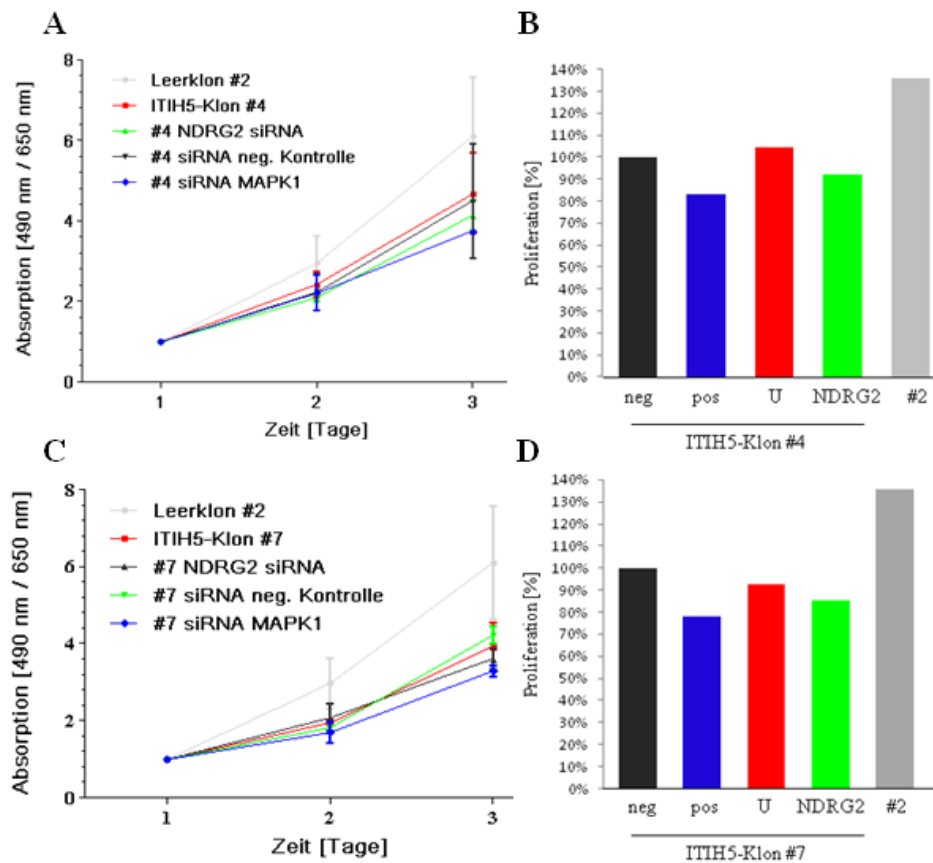


Abbildung 3-37: Einfluss des RNAi-induzierten *NDRG2*-Expressionsverlusts auf die Zellproliferation der MDA-MB-231 ITIH5-Klone #4 und #7. Die kolorimetrische Bestimmung der Zellproliferation (XTT-Test) durch Absorptionsmessungen (490 nm/650 nm) erfolgten über einen Zeitraum von drei Tagen. Vergleichende Darstellung des Proliferationsverhaltens anhand der Absorption (A) und (C) sowie der prozentualen Proliferationsrate (B) und (D) von Leerklon #2 und dem ITIH5-Klon #4 bzw. ITIH5-Klon #7 unbehandelt (U), mit siRNA-Negativkontrolle (K), mit siRNA gegen *MAPK1* als Positivkontrolle (P) und mit siRNA gegen *NDRG2* (N). Vertikale Linien in (A) und (C): Standardabweichung (STABW) der Dreifachbestimmung. Normierung: Die Werte jeder Versuchsreihe wurden auf Tag 1 normiert.

3.4.6.2 DER EINFLUSS DES *NDRG2*-VERLUSTS AUF DIE ZELLMIGRATION

Neben der Proliferation sollte die Migrationsfähigkeit der *NDRG2*-defizienten *ITIH5*-Zellklone #4 und #7 mit Hilfe des Wundheilungs-Tests (*scratch-assay*) analysiert werden. Die *ITIH5*-Zellklone wurden entsprechend dem etablierten RNAi-Protokoll für 192 Stunden behandelt und anschließend hinsichtlich der Migration in die eingebrachte „Wundfläche“ beobachtet. Die Dauer bis zum vollständigen Bewuchs der zellfreien Fläche durch die migrierenden Zellen wurde alle 24 Stunden anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen dokumentiert. So konnte für jeden Klon eine Abnahme der freien Fläche pro Tag bestimmt werden. Aufgrund des transienten Charakters dieses Versuchs wurde die Beobachtung der Migration nach drei Tagen abgebrochen, um sicherzustellen, dass die Migration nicht durch eine mögliche *NDRG2*-Reexpression beeinflusst wird. Abbildung 3-38 fasst die Abnahme der zellfreien Fläche für den analysierten *ITIH5*-Klon #4 und den unbehandelten Leerklon #2 zusammen.

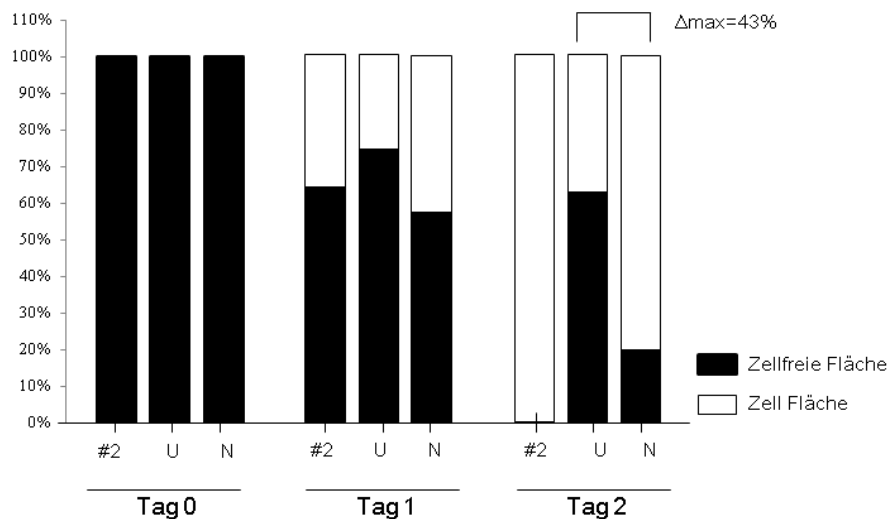


Abbildung 3-38: Grafische Darstellung des Migrationsverhalten von dem RNAi-behandeltem MDA-MB-231 *ITIH5*-Klon #4 sowie dem unbehandeltem Leerklon #2. Darstellung für die Änderung der zellfreien Fläche in dem Leerklon 2 (#2), dem unbehandeltem *ITIH5*-Klon #4 (U) und dem *NDRG2*-siRNA-induziertem (N) *ITIH5*-Klon #4 für einen Zeitraum von zwei Tagen. Δ_{max} : maximale Änderungsrate für den angegebenen Zeitpunkt (Tag). Alle Werte sind auf Tag 0 normiert (Fläche=100%).

Es zeigte sich, dass die unbehandelten (U) *ITIH5*-Zellen im Vergleich zu dem Leerklon #2 und dem *NDRG2*-defizienten (N) *ITIH5*-Klon #4 langsamer in die zellfreie Fläche migrierten. Der *NDRG2*-defiziente Klon #4 charakterisierte sich durch eine erhöhte Migrationsfähigkeit, mit einer maximalen Differenz von 43% gegenüber dem unbehandeltem *ITIH5*-Klon #4 nach 48 Stunden (2. Tag) der Migrations-Analyse. Die Migrationsrate des Leerklons #2 war erwartungsgemäß hoch und so hatte dieser nach 48 Stunden (2.Tag) die „Wunde“ bereits vollständig besiedelt. Dennoch zeigte nach 24 Stunden (1.Tag) der *NDRG2*-

defiziente ITIH5-Klon eine um 7% gesteigerte Migrationsrate gegenüber dem Leerklon, was dessen gesteigerte Migrationsfähigkeit verdeutlichte. Dementgegen zeigte der *NDRG2*-defizienten ITIH5-Klon #7 keine erhöhte Migrationsfähigkeit. Abbildung 3-39 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme der Migration des *NDRG2*-defizienten (-*NDRG2*) ITIH5-Klon #4 im Kontrast zu dem *NDRG2*-positiven (+*NDRG2*) ITIH5-Klon #4 über einen Zeitraum von 48 Stunden.

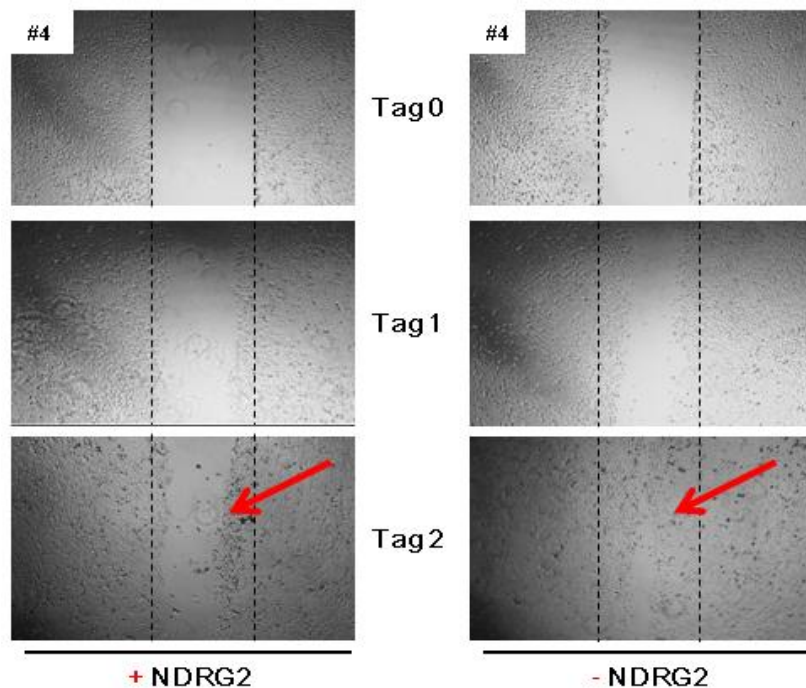


Abbildung 3-39: Der *NDRG2*-defiziente MDA-MB-231-ITIH5-Klon #4 zeigt eine erhöhte Migrationsrate im Vergleich zu dem *NDRG2*-positiven ITIH5-Klon #4. Exemplarische Phasenkontrast-Aufnahmen des Wundheilungs-Tests für den unbehandelten ITIH5-Klon #4 (+*NDRG2*) und den *NDRG2*-defizienten ITIH5-Klon #4 (-*NDRG2*). Vergleichende Darstellung der Reduzierung der zellfreien Fläche über einen Zeitraum von zwei Tagen. Vergrößerung, 50-fache Originalvergrößerung; gestrichelte vertikale Linie markiert den ursprünglichen Rand der zellfreien Fläche an Tag 0. Rote Pfeile sollen die bewachsene „Wunde“ am Tag 2 der lichtmikroskopischen Aufnahme verdeutlichen.

Auf der Grundlage von siRNA-Experimenten ist es gelungen das Tumorsuppressorgen *NDRG2* in den ITIH5-Klonen #4 und #7 sowohl auf mRNA- wie auch Protein-Ebene herunter zu regulieren. Obgleich *NDRG2* bereits mit einer Proliferations-inhibierenden Funktion (Oh *et al.* 2012) im Mammakarzinom in Verbindung gebracht werden konnte, zeigten die *NDRG2*-defizienten ITIH5-Klone keine erhöhte Proliferation. Der beschriebene negative *NDRG2*-Einfluss auf Migrationsprozesse im Mammakarzinom (Oh *et al.* 2012; Zheng *et al.* 2010), konnte *in vitro* für den *NDRG2*-positiven Klon #4 dargelegt werden.

4. DISKUSSION

4.1 CHARAKTERISIERUNG DER NEUEN PUTATIVEN SERUM-ASSOZIIERTEN BRUSTKREBS FRÜHERKENNUNGS-BIOMARKER *ITIH5* UND *DKK3*

Der Früherkennung eines bösartigen Mammakarzinoms kommt ein hoher Stellenwert zu, da die rechtzeitige Diagnose entscheidend ist für eine erfolgreiche Behandlung der Patientin (Etzioni *et al.* 2003). So haben Frauen mit kleinen Tumoren ohne Befall der axillären Lymphknoten eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 90% und können üblicherweise Brusterhaltend operiert werden. Bei weiter fortgeschrittenen Tumorstadien fällt die Überlebensrate dagegen auf lediglich 20% ab (Etzioni *et al.* 2003). Die Mammographie ist derzeit die Standard-Vorsorgeuntersuchung im *Screening* von Brustkrebs, die in Abhängigkeit der Dichte des Brustgewebes eine Sensitivität zwischen 70% und 91% aufweist (Houssami *et al.* 2002). Zudem gewährleistet die Mammographie eine sensitive Detektion des Duktalen Karzinom *In Situ* (*DCIS*). Dennoch zweifeln neuste Publikationen einen effektiven Nutzen des Mammographie-*Screening* für das Überleben von Patientinnen an. Demnach profitieren einzelne Frauen sehr wohl von der Untersuchung, jedoch sind diese Effekte nicht auf breiter Bevölkerungsebene erkennbar (Mukhtar *et al.* 2013). Eine Studie von Bleyer und Welch *et al.* impliziert sogar einen möglicherweise stärkeren Nachteil der mammographischen Überdetektion gegenüber einem Nutzen bezüglich der Sterblichkeitsreduktion (Bleyer & Welch 2012). Im Einklang mit dieser Schlussfolgerung wurde in einer aktuellen norwegischen *Screening*-Studie ein Anteil von 15% bis 25% überdiagnostizierter Tumoren aufgezeigt (Kalager *et al.* 2012). Eine Überdiagnose kann theoretisch eintreten, wenn der Tumor nicht in die klinisch invasive Form progressieren kann oder wenn die Frau aus einem anderen Grund verstirbt, bevor der Brusttumor klinisch symptomatisch wird. Diese Überdiagnostik resultiert in einer erheblichen ethischen Zwangslage, jedoch vor allem in einer hohen Belastung der Patientin und des Gesundheitssystems (Kalager *et al.* 2012). Wenn auch die Ergebnisse der mammographischen Früherkennung in Ländern erhoben wurden, in denen das *Screening* bereits mehr als 10 Jahre durchgeführt wird (z.B. England, Norwegen, USA), so ist auch in Deutschland mit einer hohen Zahl überdiagnostizierter Fälle in den nächsten Jahren zu rechnen. Daher bedarf es, sowohl aus Patienten- als auch aus ökonomischer Sicht, der Entwicklung neuartiger nicht-invasiver Detektionsmethoden zur Früherkennung des Mammakarzinoms.

Eine vielversprechende, neuartige Methode der Brustkrebs-Früherkennung basiert auf der Detektion der DNA-Hypermethylierung von Promotorsequenzen zentraler Tumorsuppressorgene der Brust-Karzinogenese. Dabei ist der Nachweis eines spezifischen

DNA-Methylierungsmusters geeignet, da es den klinischen und technischen Vorteil eines *gain-of-signal* (Zugewinn an Signal) aufweist. Das spezifische Methylierungsprofil eines Tumors spiegelt sich in der frei zirkulierenden DNA (cfDNA) im Blut wider (Fleischhacker & Schmidt 2007; Herman 2004) und bildet auf diese Weise eine attraktive Grundlage der Blut-basierten Früherkennung von Brustkrebs (zusammengefasst in: Van, V *et al.* 2012). Dennoch findet bis heute noch keines der beschriebenen Kandidatengene eine tatsächliche Anwendung in der klinischen Routine zur Früherkennung des Mammakarzinoms. Zu beachten ist, dass die aberrante DNA-Methylierung einzelner putativer Tumorsuppressorgene in der Karzinogenese sehr heterogen ist und bisherige Studien noch kein Einzelgen darlegen konnten, welches die Gesamtheit molekularer sowie genotypischer Subtypen des Mammakarzinoms über das spezifische Methylierungsprofil abdeckt. Zudem war die Sensitivität in diesen Studien zu gering für eine mögliche klinische Nutzung putativer Einzel-Biomarker (Van, V *et al.* 2012). Aus diesem Grund ist die Anwendung eines *Gen-Panels*, d.h. die kombinierte Anwendung von Einzelgenen, für das Brustkrebs-*Screening* vorteilhaft. Jüngste Studien identifizierten zahlreiche potentielle *Gen-Panels* für die Blut-basierte Früherkennung von Brustkrebs (Brooks *et al.* 2010; Jing *et al.* 2010; Kim *et al.* 2010; Radpour *et al.* 2011; Taback *et al.* 2006). In Übereinstimmung mit Van de Voorde *et al.* erfolgte die Analyse vieler dieser putativen Biomarker in relativ kleinen Patienten-Kohorten und die folgende Validierung in einer größeren Patienten- und Alters-gepaarten gesunden Kohorte wurde in den meisten Studien nicht angestrebt. Weiterhin fehlte in vielen Studien eine akkurate d.h. objektive Beurteilung der klinischen Effizienz der identifizierten Biomarker mit Hilfe der ROC-Analyse, was möglicherweise in einer Fehlinterpretation der analysierten Daten mündete (Van, V *et al.* 2012). Die andauernde Identifizierung putativer Früherkennungs-Biomarker ohne weiterfolgende klinische Validierungsstufen führte zur Formulierung spezifischer Leitlinien für eine ökonomische sowie klinisch effiziente Identifizierung und Validierung von *Screening*-Biomarker im Blut (Pepe *et al.* 2001; Pepe & Feng 2011). Vor allem ein schwaches Studiendesign ohne eine adäquat auf die Tumorfälle abgestimmte Kontroll-Kohorte führt möglicherweise zu einer falschen Darstellung potentieller Biomarker. Denn hauptsächlich stellt eine hohe Spezifität die maßgebliche Priorität für das *Screening* einer breiten Bevölkerungsebene dar. Eine geringe Spezifität resultiert in unnötigen, kostenintensiven Behandlungen und psychologischem Stress für die Patientin (Pepe *et al.* 2001). In Anbetracht der Datenlage und den dargelegten Richtlinien für ein optimales Studiendesign wurde in dieser Studie die Effizienz eines Blut-basierten PCR-Tests für die Detektion methylierter cfDNA in zwei unabhängigen Serumkollektiven (Test- und Validierungskollektiv) mit

insgesamt 604 Seren und 112 gepaarten Tumorgeweben bestimmt. Dieses Kollektiv bildete die bisher größte Bereitstellung von Serumproben für die Analyse von Brustkrebs-spezifischen Früherkennungs-Biomarkern in der Mammakarzinom-Forschung weltweit. Um die Spezifität der untersuchten Kandidatengene gezielt und effizient analysieren zu können, wurden in beiden Kollektiven hinsichtlich der Tumorfälle Alters-gepaarte Seren von gesunden Frauen und von Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust untersucht. Ein verlässlicher Früherkennungs-Biomarker diskriminiert einen möglichen Tumor nicht nur von dem gesunden Zustand, sondern auch von einer vorliegenden benignen Erkrankung, da benigne Brusttumoren ebenfalls ein aberrantes Methylierungsprofil aufzeigen können (Huang *et al.* 2010). In Angrenzung an das spezifische Methylole verschiedener Tumorentitäten (Esteller 2008) ist es zudem ratsam potentielle Biomarker ebenfalls in anderen Tumortypen zu untersuchen, um die klinische Spezifität in einem Organ-spezifischen Kontext einordnen zu können.

Bisherige Studien zeigen eine klare Assoziation der ausgewählten Kandidaten-Biomarker mit Transduktions-Prozessen des WNT-Signalwegs (*SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP5*, *DKK3* und *WIF1*) (Ai *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2008; Veeck *et al.* 2008a), in der Brustkrebs-Invasion und Metastasierung (*ITIH5*) (Veeck *et al.* 2008b) sowie der Regulation apoptotischer Prozesse und Zellzyklus-Kontrollpunkten (*RASSF1A*) (Yan *et al.* 2003). Diese Kandidatengene liegen im Mammakarzinom herunter-reguliert vor und besitzen zudem eine definierte CpG-Insel innerhalb der Promotorregion, was die zentrale Rolle dieser Gene in der Brust-Karzinogenese verdeutlicht. Der potentielle Nutzen dieser Genloci für die Blut-basierte Detektion von Brustkrebs wurde, abgesehen von *RASSF1A*, in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Die beschriebene hohe Methylierungsrate dieser Kandidatengene in Tumorgeweben von Brustkrebs-Patientinnen deutete dabei auf eine potentielle Möglichkeit der Brustkrebs-Früherkennung in cfDNA hin.

Die in dieser Arbeit in einem Testkollektiv initial durchgeführte komparative Analyse von 112 gepaarten Brustkrebs-Geweben und Brustkrebs-Seren der gleichen Patientinnen sowie die Untersuchung einer starken und epidemiologischen Kontroll-Kohorte, ermöglichte die Identifizierung eines spezifischen Biomarker-Dupletts, namentlich *ITIH5* und *DKK3*. Die putativen Tumorsuppressorgene *ITIH5* und *DKK3* zeigten eine signifikante Korrelation des Methylierungsmusters zwischen der gepaarten Tumor Gewebe-DNA und der Serum-cfDNA. Diese Konkordanz des Methylierungsprofils innerhalb der Gewebe- und Serum-DNA kennzeichnet den potentiellen Nutzen beider potentiellen Biomarker für die Blut-basierte Früherkennung von Brustkrebs. Darüber hinaus erzielte die kumulative *ITIH5-DKK3*-

Methylierung eine ausgezeichnete Spezifität innerhalb der Kontroll-Kohorte von 93% (gesund) bzw. 100% (benigne) mit einer moderaten Sensitivität von 40% in den Brustkrebs-Seren. Maßgeblich durch die Analyse einer breit aufgestellten Kontroll-Kohorte konnten die Kandidatengene *WIF*, *SFRP1* und *SFRP5* mit einer, besonders in den benignen Seren (75%-90%), hohen Rate Falsch-Positiver Kontroll-Proben dargelegt werden und von weiteren Analysen ausgeschlossen werden. Darüber hinaus überstiegen die Methylierungsfrequenzen in der cfDNA von Kolonkarzinom-Patienten zum Teil die der Mammakarzinom Proben (z.B. *SFRP1*) und fundierten die starke klinische Leistungsfähigkeit von *ITIH5* und *DKK3* mit einer guten kumulativen Spezifität von 88% in der Organ-spezifischen Abgrenzung zum Mammakarzinom.

Aufbauend auf den Erkenntnissen der ersten Teststufe konnte die Validierung der Methylierungsfrequenzen der Kandidaten-Genloci *DKK3* und *ITIH5* in einem unabhängigen Validierungskollektiv hinsichtlich der klinischen Leistungsfähigkeit tiefergehend analysiert werden. Auch auf der Basis einer quantitativen -objektiven- Methylierungsanalytik (qMSP) konnte ein Anteil Richtig-Positiv erkannter Tumoren mit der kumulativen Kombination der *ITIH5-DKK3*-Methylierung von 40% nachgewiesen werden. Die qMSP-basierte Methylierungsanalytik des Validierungskollektivs lag darin begründet, dass eine quantitative Methodik die Voraussetzung für eine klinische Anwendung darstellt, die unabhängig von der Tagesform eines Operators durchgeführt werden kann (Kagan *et al.* 2007). Zudem ist die Differenzierung zwischen einem geringen und einem hohen Methylierungslevel mit der qualitativen MSP nur unzureichend möglich, wodurch die Reproduzierbarkeit gering methylierter Proben nicht gewährleistet wird (Eads *et al.* 2000). Weiterhin bietet die qMSP-Technik die Basis für eine statistische Kalkulation mittels der für diesen Zweck geeigneten ROC- (*Receiver Operating Characteristics*) Analyse (Laird 2003), über die ein Schwellenwert zur Optimierung der klinischen Effizienz festgelegt werden kann. Die Anwendung der *ITIH5-DKK3*-Genloci als Biomarker-Duplett ohne Definierung eines Schwellenwertes in der gesamten Kontroll-Kohorte (benigne und gesund) erzielte eine Spezifität von 94%, die basierend auf einer AUC von 0,673 ($P < 0,0001$) auf eine hochsignifikante Güte des Tests hindeutete. So untermauerte der positive (prädiktive) Vorhersagewert (PPV), d.h. die Wahrscheinlichkeit der Patienten bei einem positiven Testergebnis tatsächlich an einem Tumor erkrankt zu sein, mit 85% die gute klinische Spezifität der *DKK3-ITIH5*-Methylierung. Der negative (prädiktive) Vorhersagewert (NPV), d.h. die Wahrscheinlichkeit der Patienten bei einem negativen Testergebnis nicht an einem Tumor erkrankt zu sein, fiel aufgrund der Sensitivität von 66% geringer aus. Die Definition

eines Schwellenwertes bezüglich der maximalen Präzision (Spezifität) des *DKK3-ITIH5* Biomarker-Dupletts erbrachte eine in Relation zu der Sensitivität des Tests ineffiziente Lösung. Zwar konnte die Spezifität auf 100% gesteigert werden, was allerdings in einer drastischen Abnahme der Sensitivität auf 6% mündete. Bezüglich der Mammographie mit einer Sensitivität von 70% bis 91% sowie einer Spezifität von >85% (Houssami *et al.* 2002) übersteigt das aufgezeigte putative Biomarker-Duplett mit einer Spezifität von 94% die statistisch evaluierte Effizienz der Mammographie. In Anbetracht der Tatsache, dass die Sensitivität der mammographischen Tumordetektion in Patientinnen mit einem dichten Brustgewebe drastisch abnimmt (Mandelson *et al.* 2000), könnte die kumulative hohe Spezifität der *DKK3-ITIH5*-Methylierungsrate möglicherweise eine besonders bedeutende Rolle in jungen, prämenopausalen Frauen zugetragen werden. Zudem stellt die mammographische Dichte einen Hoch-Risikofaktor für die Entstehung von Brustkrebs dar (Boyd *et al.* 2007; Byrne *et al.* 1995; McCormack & dos, I 2006), was die besondere Prägnanz einer verlässlichen Detektion von Tumoren in dichtem Brustgewebe verdeutlicht. Unter diesen Gesichtspunkten wurde die Hypothese formuliert, dass die untersuchten *DKK3*- und *ITIH5*-Genloci aufgrund der aufgezeigten hohen klinischen Spezifität möglicherweise wertvolle Biomarker für die Blut-basierte Detektion von Brustkrebs-Patientinnen dieser Risikogruppe darstellen. Dieses mögliche Potential wurde über eine ROC-Analyse in prä- und postmenopausalen Frauen verifiziert. Interessanterweise zeigte sowohl die Methylierung der Einzelgene als auch die kombinierte *DKK3-ITIH5*-Methylierung eine erhöhte Sensitivität sowie Spezifität in der prämenopausalen Subgruppe. Besonders deutlich fiel diese Diskriminierung zwischen dem prä- und postmenopausalen Status im Validierungskollektiv für das *DKK3-ITIH5* Biomarker-Duplett aus. Hier resultierte die Differenzierung der beiden Subgruppen in einer 15%igen Erhöhung der Sensitivität von 37% auf 52% in den prämenopausalen Frauen mit einer maximalen Spezifität von 100% (AUC: 0,762 (95% KI: 0,611-0,913)). Dementgegen lag die Spezifität in der postmenopausalen Subgruppe bei 92% (AUC: 0,647 (95% KI: 0,575-0,718)). Diese Ergebnisse könnten auf einen Benefiz der *DKK3-ITIH5*-Methylierung für die frühe Detektion eines Brusttumors in dieser Subgruppe hinweisen. Trotzdem sind die Daten mit Bedacht zu bewerten, da die Gruppe der prämenopausalen Frauen in dem untersuchten Test- und Validierungskollektiv nur 15% bis 20% Fälle beinhaltete. Hier sind weiterführende Studien mit einer größeren Anzahl prämenopausaler Fälle anzudenken.

Um die Rate der Richtig-Positiv detektierten Tumoren mittels der kombinierten *DKK3-ITIH5*-Methylierung in dem Validierungskollektiv zu erhöhen, erfolgte eine

Komplementierung mit dem prominenten potentiellen Biomarker *RASSF1A* zu einem *3-Gen-Panel*. Zweifelsfrei konnte die Sensitivität durch die *RASSF1A*-Methylierung von 40% auf 67% gesteigert werden. Dementgegen zeigte sich jedoch die Spezifität von *RASSF1A* in den Seren von gesunden Frauen mit 74% gering und resultierte folglich in einer Reduktion der Richtig-Negativ detektierten Fälle des *3-Gen-Panels* von 93% auf 69%. Die Zusammenfassung der Proben von gesunden Frauen und von Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust zu einer größeren Kontroll-Kohorte steigerte die Spezifität nur geringfügig auf 72%. *RASSF1A* wurde bereits in zahlreichen Studien hinsichtlich der putativen Möglichkeit der Brustkrebs-Früherkennung in cfDNA analysiert. Innerhalb dieser Studien konnte die *RASSF1A* cfDNA-Methylierung mit Frequenzen von 32% bis 75% gezeigt werden (Donninger *et al.* 2007). Im Einklang mit diesen Daten forcierte sich in dieser Arbeit eine *RASSF1A*-Methylierungsfrequenz von 46% in den analysierten Brustkrebs-Seren des Validierungskollektivs. Angesicht der reproduzierbaren Methylierungsfrequenz stellte der putative Biomarker eine interne Qualitätskontrolle der isolierten und Bisulfit-konvertierten cfDNA des Validierungskollektivs dar. Brooks *et al.* untersuchten die *RASSF1A* Promotor-Methylierung in 50 Seren von Brustkrebs-Patientinnen sowie 100 Seren von gesunden und 50 Seren von Frauen mit einer benignen Erkrankung (Brooks *et al.* 2010). Die in dieser Studie erzielte Sensitivität von *RASSF1A* lag, verglichen mit dieser Arbeit, mit 22% geringer vor, während die Spezifität jedoch minimal höher war. Tatsächlich lag die Spezifität von *RASSF1A* in dieser Arbeit, in Abgrenzung zu anderen Studien, geringer vor (Dulaimi *et al.* 2004; Jing *et al.* 2010). Dies könnte in der größeren Kontroll-Kohorte begründet sein, die bezüglich des Alters auf die Tumor-Seren abgestimmt wurde und in bisherigen Studien nicht in dieser Weise durchgeführt werden konnte. Die anschließende ROC-Analyse zeigte eine geringfügige Erhöhung der AUC auf 0,712 (95% KI: 0,653-0,770) mit dem *3-Gen-Panel*, was einer 71%igen Trennschärfe zwischen den Tumorfällen und der Kontroll-Kohorte (gesund und benigne) entspricht.

Die Methylierung kann sowohl mit benignen Veränderungen des Brustgewebes (Huang *et al.* 2010) als auch mit altersassoziierten Prozessen korrelieren (Heyn *et al.* 2012), wodurch die Wahrscheinlichkeit eines Spezifitätsverlusts mit zunehmender Gen-Anzahl steigt. Diesbezüglich übertrafen die potentiellen Biomarker *DKK3* und *ITIH5* mit einer nahezu maximalen Präzision die *RASSF1A*-Spezifität (85%) in der Kontroll-Kohorte (gesund und benigne). Zudem belegte die statistische Analyse beider Kollektive keine vorliegende altersassoziierte Methylierung der drei putativen Biomarker. Neben diesen Gesichtspunkten liegt eine besondere Schwierigkeit in der Organ-spezifischen Abgrenzung zu anderen

Tumorentitäten, da methylierte Genloci zentraler Tumorsuppressorgene, begründet durch die Existenz eines DNA-Methyloms, in verschiedenen Karzinogenesen involviert sind (Esteller 2008). In diesem Kontext wies besonders *RASSF1A* mit einer Falsch-Positiven Rate von 42% einen extrem hohen Spezifitätsverlust gegenüber dem Kolonkarzinom auf. In der Organ-spezifischen Kontroll-Kohorte der Kolonkarzinome war ebenfalls ein Verlust der *DKK3-ITIH5* Spezifität im Validierungskollektiv gegenüber dem Testkollektiv zu vermerken. Dennoch lag die Spezifität mit 77% (*DKK3*) und 71% (*ITIH5*) deutlich über der Spezifität von *RASSF1A*.

Die potentiellen Brustkrebs Früherkennungs-Biomarker *DKK3* und *ITIH5* sind gegenüber dem vielfach beschriebenen potentiellen Biomarker *RASSF1A* im Test- sowie im Validierungskollektiv in der Kontroll-Kohorte (gesund und benigne) wesentlich Brustkrebs-spezifischer (94% bis 99%), jedoch geringer in ihrer Sensitivität für die Detektion methylierter cfDNA. Besonders die *DKK3*-Methylierung könnte die Möglichkeit bieten kleinere Tumoren (pT1-2) zu detektieren, dessen Validität auch in Kombination mit der *ITIH5*-Methylierung zu beobachten ist. Eine ROC-Analyse der cfDNA-Methylierung in der Gruppe der pT1-2 Tumoren erhöhte die Sensitivität der *DKK3-ITIH5* Genkombination auf 43% (AUC: 0,688 (95% KI: 0,624-0,752)), was einen potentiellen Benefit der *DKK3-ITIH5*-Methylierung für die Früherkennung von Brustkrebs darstellt. Allerdings wies das Validierungskollektiv nur 9% pT3-4 Tumoren auf, von denen keiner eine *DKK3*-bzw. *ITIH5* Methylierung zeigte. Dies verdeutlicht, dass die Detektion der Methylierung in der cfDNA auch tatsächlich in der wichtigen Subgruppe der kleinen Tumoren Bestand hat.

Schlussfolgernd ist es in diesem umfangreich aufgebauten Validierungsmodell gelungen, die putativen DNA-Methylierungsbiomarker *DKK3* und *ITIH5* zu validieren, die in einer kombinierten Anwendung ein großes Potential aufweisen, Mammakarzinome mit einer hohen Spezifität in einer frühen Phase der Tumorprogression zu detektieren. Die *DKK3-ITIH5*-Methylierungsachse erbrachte ein hochsignifikant ($P < 0,0001$) gesteigertes Methylierungslevel in Serum-cfDNA von Brustkrebs-Patientinnen, verglichen mit dem Methylierungsstatus in der cfDNA von sowohl Alters-korrelierten gesunden Frauen als auch Frauen mit einer benignen Erkrankung der Brust. Diese hochsignifikante Differenzierung konnte in der Organ-spezifischen Abgrenzung zum Kolonkarzinom nicht erzielt werden. Trotz der ebenfalls evidenten Diskriminierung zwischen Brustkrebs und dem gesunden Zustand der Frau ist *RASSF1A*, der geringen Spezifität zufolge, kein idealer potentieller

Biomarker für die Früherkennung von Brustkrebs in der cfDNA. Basierend auf diesen wertvollen Daten kann gefolgert werden, dass die kumulative *DKK3-ITIH5* synergistisch mit der Mammographie einen klinisch wertvollen Beitrag zur Brustkrebs-Früherkennung, insbesondere für prämenopausale Patientinnen, leisten könnte. Der Anwendung dieser Analytik stehen jedoch noch die Identifizierung und Validierung weiterer potentieller Biomarker, welche die Sensitivität und Spezifität weiter erhöhen können, bevor.

4.2 DAS BIOLOGISCHE WIRKUNGSSPEKTRUM VON ITIH5 IM HUMANEM MAMMAKARZINOM

Aufgrund der Tatsache, dass die DNA-Hypermethylierung innerhalb des *ITIH5*-Promotorbereiches erfolgte, dessen Expressionsverlust mit einer klinischen Relevanz bezüglich eines verkürzten Rezidiv-freien und Gesamtüberleben identifiziert werden konnte (Veeck *et al.* 2008b), lag die Vermutung einer suppressiven Wirkung innerhalb Brustkrebs-relevanter Metastasierungsprozesse nahe. Zudem wurde bereits für die weiteren Moleküle der ITIH-Familie ein durch den Verlust der ITIH-Wirkung tumorprogressiver Einfluss gezeigt (Paris *et al.* 2002; Zhuo *et al.* 2004), wodurch die Hypothese der möglichen Metastasierungssuppressiven Funktion von ITIH5 untermauert wird. Wenn auch die biologische Relevanz von ITIH5 für das Mammakarzinom bereits dargelegt werden konnte (Himmelfarb *et al.* 2004; Veeck *et al.* 2008b), ist das zugrunde liegende molekular-biologische Wirkungsspektrum nahezu unbekannt. In Anbetracht der möglichen Barriere-Funktion der ITIH-Moleküle ist die Aufklärung assoziierter Signaltransduktions-Prozesse im Mammakarzinom klinisch besonders bedeutend, da trotz deutlicher therapeutischer Fortschritte die 5-Jahres-Überlebenschance auf 20% sinkt (Etzioni *et al.* 2003), wenn der Tumor bereits metastasiert hat und damit eine hohe Sterblichkeitsrate bedingt. Diesbezüglich ist die individualisierte, zuverlässige Abschätzung des progressiven Potentials eines Mammakarzinoms zu einem frühen Zeitpunkt der Karzinogenese von zentraler Notwendigkeit, um letztendlich prognostische und prädiktive Biomarker im Sinne einer gezielten Krebstherapie (engl. *targeted therapy*) zu entwickeln.

Einen zentralen Hinweis, wie die tumorsuppressive Wirkung von ITIH5 möglicherweise molekular umgesetzt wird, folgt aus der Interaktion der ITIH-Proteinfamilie mit der Hyaluronsäure (HA) als Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix (ECM). Diese Interaktion resultiert in einem stabilisierenden Geflecht der ECM (Zhuo *et al.* 2004). Die ECM ist eine massive Barriere für maligne Zellen und wird im Verlauf der malignen Progression von Karzinomzellen invadiert und abgebaut (Wagener & Müller 2010). Unter diesem Gesichtspunkt erfährt die strukturelle Stabilisierung des komplexen Netzwerks der

ECM eine Assoziation mit der reprimierenden Eigenschaft der malignen Entartung von Krebszellen. Die Arbeiten von Mina Bissell geben einen klaren Hinweis auf den bedeutenden Einfluss der ECM innerhalb der Tumorgenese. Die Interaktion von Krebszellen mit der ECM sowie nicht-zellulären Komponenten der Mikroumgebung reguliert in diesem Kontext die Gewebestruktur und -funktion, resultierend in der Progression und Invasion von Tumorzellen (Bissell & Radisky 2001; Bissell *et al.* 2002).

Der mögliche Einfluss von ITIH5 auf die Zusammensetzung der ECM, aber auch weiterer zentraler Wirkungsspektren der ITIH5-vermittelten Tumorsuppression galt es in dieser Studie nachzugehen. Ein cDNA-basierter *Microarray* sollte differenziell exprimierte ITIH5-assoziierte Zielgene aufzeigen, die erstmalig Rückschlüsse auf die molekulare und biologische Wirkung des putativen Tumorsuppressorgens zulassen. Grundlage für diese Analyse bildeten zwei *in vitro* Tumormodelle, die nach der forcierten ITIH5-Reexpression Tumor-supprimierende Eigenschaften aufwiesen. So wurde in dieser Arbeit die humane Brustkrebszelllinie BT20 als Rezipient für die stabile Transfektion mit dem ITIH5-Vektor genutzt. Diese Mammakarzinom-Zelllinie bietet eine optimale Voraussetzung für die Transfektionsexperimente. In Versuchen von Veeck *et al.* konnte bereits gezeigt werden, dass in BT20-Zellen der *ITIH5*-Promotor über die DNA-Methylierung transkriptionell stillgelegt ist (Veeck *et al.* 2008b), eine Grundvoraussetzung für die ITIH5-Reexpression in diesem Modell. Ursprünglich wurde die Tumorzelllinie im Jahr 1958 von E.Y. Lasfargues und L. Ozzello isoliert und in Kultur gebracht (Lasfargues & Ozzello 1958). Histologisch entspricht diese Zelllinie einem Adenokarzinom der zweiten Tumor-Differenzierungsstufe und ist molekular-genetisch der Subgruppe des *triple*-negativen Mammakarzinoms (*basal-like*) zuzuordnen. Der basale Subtyp des Mammakarzinoms kennzeichnet sich aus durch das Fehlen des Östrogen-, Progesteron- und des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (Her-2) und ist mit einem schlechten prognostischen Verlauf der Erkrankung assoziiert (Perou *et al.* 2000). Darüber hinaus besitzen die BT20-Zellen die Fähigkeit *in vivo* in Xenograft Maus-Modellen Tumoren auszubilden (Dalmizrak *et al.* 2007) und stellen somit ein interessantes Modell für die funktionelle ITIH5-Untersuchung dar. Im Anschluss der Darlegung einer forcierten Reexpression des ITIH5-Moleküls auf RNA- sowie auf Proteinebene konnte die suppressive Eigenschaft von ITIH5 in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie experimentell verifiziert werden.

Ein zentrales und frühes Ereignis in der Tumorgenese ist der Verlust der Zellzykluskontrolle, welches oftmals zu einer gesteigerten Proliferation führt (Hanahan & Weinberg 2000). Diese fundamentale Eigenschaft von Tumorzellen sollte zur ersten

Einschätzung der ITIH5-Wirkung im BT20-Tumormodell analysiert werden. Dabei wiesen die ITIH5-exprimierenden BT20-Zellen eine um 35% geringere Proliferation gegenüber den ITIH5-defizienten Zellen auf. Unter der Hypothese, dass ITIH5 insbesondere einen stabilisierenden Einfluss auf die Struktur der ECM ausübt, wurde die Interaktion der Zellen untereinander und zu der ECM (Hanahan & Weinberg 2000) über das Vermögen der Koloniebildung und der Adhäsionsfähigkeit, begutachtet. In Konkordanz mit der ITIH5-vermittelten Proliferationsverminderung, war die Fähigkeit der Koloniebildung ebenfalls um 24% reduziert. Zugleich erzielte die forcierte ITIH5-Expression in den BT20-Tumorzellen eine signifikante gesteigerte Zell-Matrix-Adhäsion auf Matrigel sowie Hyaluronsäure (HA) beschichteten Zellkulturschalen. Auf HA-beschichteten Zellkulturschalen zeigten die ITIH5-Klone eine 5%ige Adhäsionssteigerung, was die postulierte Interaktion von ITIH5 mit HA untermauert. Eine im Median um 59% gesteigerte Zell-Matrix-Adhäsion der ITIH5-Klone auf Matrigel verdeutlicht, dass hier weitere Rezeptoren betroffen sind, die möglicherweise mit ITIH5 interagieren. Das Matrigel kennzeichnet sich durch einen hohen Anteil extrazellulärer Matrixproteine und simuliert die natürliche zelluläre Basalmembran mit Komponenten wie Laminin und Kollagen IV (Kleinman & Martin 2005). Die Basalmembran ist eine spezialisierte Schicht der ECM, die epitheliale Gewebe umgibt und somit bezüglich der Stabilisierung und Signaltransduktion des Zellverbandes eine fundamentale Rolle einnimmt (Timpl & Dziadek 1986). In der Tumorgenese erfolgt die proteolytische Degradation der Tumorzellen-basierten Basalmembran resultierend in einer erhöhten Invasivität der Zellen (Barsky *et al.* 1983). Bisherige Studien verdeutlichen vor allem die Interaktion verwandter Moleküle der ITIH-Familie mit der HA und einer damit assoziierten Adhäsionssteigerung in verschiedenen Tumorentitäten (Garantziotis *et al.* 2008; Paris *et al.* 2002; Werbowetski-Ogilvie *et al.* 2006). Entsprechend einer neueren Studie müssen neben der HA auch weitere ECM-spezifische Interaktionspartner der schweren Kette, wie das Vitronektin, angedacht werden, die einen Einfluss auf die Adhäsion der BT20-Zellen auf Matrigel erklären könnten (Adair *et al.* 2009). Von Tumor-biologischer Signifikanz könnte dabei die vWA- (von Willebrand A) Domäne der ITIHs sein, die in Zelladhäsions- und ECM-Molekülen vielfach vorzufinden ist (Tuckwell 1999). So besitzen neben ITIH5 zahlreiche Integrine und sezernierte ECM-Proteine wie Kollagen IV diese charakteristische Domäne, welche eine Interaktion mit Laminin oder diversen Kollagen-Molekülen fördert (Colombatti & Bonaldo 1991). Obgleich ein entsprechender Interaktionspartner der ITIH5 vWA-Domäne bis heute nicht identifiziert wurde, so geben die Ergebnisse dieser Studie einen Hinweis, dass

möglicherweise Laminin, als Hauptbestandteil des Matrigels, einen kausalen Einfluss auf die starke Adhäsion der BT20-Zellen über die spezifische vWA-Domäne hat.

Der Mechanismus der erhöhten HA-assoziierten Adhäsionsfähigkeit der ITIH-Moleküle konnte bis heute noch nicht eindeutig gezeigt werden, jedoch gibt es Hinweise, dass die Esterbindung zwischen der HA und den ITIHs die CD44-HA-Interaktion modifiziert und auf diese Weise die Affinität der Zellen verstärkt (Ruffell & Johnson 2008). Eine Hyaluronsäure-basierte Korrelation mit der Invasivität der CD44-positiven hoch-invasiven Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 konnte bereits dargelegt werden (Culty *et al.* 1994). In diesem Kontext konnte weiterhin gezeigt werden, dass ITIH5-positive MDA-MB-231-Tumorzellen eine um 37% erhöhte Adhäsion auf Hyaluronsäure beschichteten Zellkulturschalen aufwiesen (Rose 2013). Generell zeigte sich die Reduktion proliferativer und migratorischer Prozesse innerhalb der ITIH5-positiven MDA-MB-231-Zellen deutlich ausgeprägter (Rose 2013) im Vergleich zu den ITIH5-positiven BT20-Zellen. Aufgrund der molekularen Heterogenität wurden sowohl das MDA-MB-231 als auch das BT20-Tumormodell, welches spekulativ über eine mögliche Modifikation Basalmembran-assoziiierter Komponenten die aufgezeigte Proliferations- und Adhäsionsverminderung erzielte, für die weitere funktionelle Einschätzung von ITIH5 in die *Microarray* Analysen mit einbezogen.

Anhand der *Microarray* Analyse konnte die forcierte ITIH5-Reexpression in beiden Tumormodellen nochmals anschaulich dargelegt werden. So zeigte das BT20-Tumormodell eine hochsignifikante ($P < 0,0001$) differenzielle ITIH5-Expression mit einem *Fold Change* von 11,45 im Vergleich zu den ITIH5-defizienten Zellen. Ebenso war die Expression in dem MDA-MB-231-Tumormodell mit einem *Fold Change* von 15,79 hochsignifikant ($P < 0,0001$) differenziell zu den Leerklonen. Die statistische Auswertung der erzeugten *Microarray* Daten erfolgte über das Programm *BRB-ArrayTools* Version 4.3.1 (Simon *et al.* 2007) und ermöglichte eine umfangreiche Zuordnung und Darstellung der Ergebnisse. Kandidatengene, die auf einem signifikanten Niveau ($P < 0,05$) min. 1,8-fach differenziell zwischen den ITIH5- und Leerklonen exprimiert vorlagen, wurden über eine Gen-Ontologie (engl. *Gene Ontology*, GO) Datenbank (Harris *et al.* 2004) hinsichtlich verschiedener Domänen der molekularen und zellulären Biologie klassifiziert. Interessanterweise erbrachte die GO-Analyse eine Zuordnung der 85 Kandidatengene des BT20-Tumormodells in den GO-Term „Laminin-Komplex“ sowie „Basallamina“. In beiden zellulären Komponenten konnten jeweils 9% der Gene eingeordnet werden, obwohl lediglich 2% erwartet wurden. Damit lagen diese beiden Gruppen 4-fach überrepräsentiert in dem BT20-Tumormodell vor. Diese Kategorisierung unterstützt die

Hypothese, dass die ITIH5-Expression in den BT20-Zellen Einfluss auf die Zusammensetzung der Basalmembran ausübt und so möglicherweise die aufgezeigte evidente Adhäsionssteigerung der ITIH5-positiven Zellen auf Matrigel beschichteten Zellkulturflaschen bedingt. Weiterhin, in Einklang mit aktuellen Studien (Anveden *et al.* 2012; Dahlman *et al.* 2012), konnte in beiden Tumormodellen eine Zuordnung zum Lipid-Metabolismus aufgestellt werden, wobei ITIH5 die Rolle als mögliches Adipokin zugetragen werden könnte. Die von Fettzellen sekretierten Adipokine gehören zur Molekülgruppe der Cytokine und nehmen bezüglich der Entstehung von Brustkrebs sowohl progressive als auch inhibitorische Eigenschaften ein (Vona-Davis & Rose 2007). Dagegen konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Assoziation mit neurobiologischen Prozessen, wie etwa der Gliogenese oder allgemeiner bezüglich der Membran-Depolarisierung in der Regulation eines Aktionspotentials dargelegt werden.

Gegenüber dieser ersten *in vitro* Einordnung einer möglichen molekular-biologischen ITIH5-Wirkung, konnte bezüglich des Genexpressionsmusters der BT20-Zellen ein klarer klinischer Bezug aufgestellt werden. In einer *in silico* Analyse mit 1.881 annotierten Brustkrebs-Fällen korrelierte eine hohe Expression von insgesamt 61 in der Datenbank dotierten ITIH5-koexprimierten Genen (61-Gen-Signatur) hochsignifikant mit einem besseren Rezidiv-freien und Gesamtüberleben der Patientinnen. Genau diese mögliche klinische Assoziation ist fundamental für die Etablierung prognostisch relevanter Biomarker im Sinne einer gerichteten Therapie für Mammakarzinom-Patientinnen. Eine Präzisierung der prognostischen Zuordnung bezüglich der Rezidiv- und Metastasenentwicklung versprechen kommerziell verfügbare Genexpressionssignaturen, namentlich Oncotype DX[®] Test, EndoPredict[®], PAM50[®] und MammaPrint[®]. Diese Signaturen messen vor allem Östrogenrezeptor-regulierte und proliferationsassoziierte Gene und besitzen somit die stärkste prognostische Aussagekraft bei Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen (Untch *et al.* 2013). Dabei sind bestehende prognostische Gensignaturen für das Mammakarzinom optimal für die Einschätzung der Rezidiventwicklung innerhalb eines 5-Jahres-Überlebenszeitraums, jedoch nicht darüber hinaus (Mittempergher *et al.* 2013). Bemerkenswerterweise beruhen die vorliegenden Daten auf einem 10-Jahres-Überlebenszeitraum. Somit könnte die ITIH5-spezifische 61-Gen-Signatur einen wichtigen klinischen Beitrag zur Prognose rezidivierender und metastasierender Mammakarzinome über einen Zeitraum von 10 Jahren leisten. Dabei ist diese prognostische unabhängige Eignung der 61-Gen-Signatur vor allem in der Subgruppe der Östrogenrezeptor-positiven Brusttumoren gegeben. Frauen mit Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen sind für eine adjuvante Therapie mit selektiven

Östrogenrezeptormodulatoren (z.B. Tamoxifen) zugänglich und stellen eine prognostisch wichtige Subgruppe dar. So könnte spekulativ ein anhand der 61-Gen-Signatur gezeigtes niedriges Risiko für ein Fortschreiten der Erkrankung bedeuten, dass die Patientinnen mit einer alleinigen antihormonellen Therapie ausreichend behandelt sind und keine unnötige Chemotherapie erhalten. Jedoch sind bezüglich dieser Thematik weitere umfangreiche Analysen, die diesen interessanten Einfluss verifizieren können, notwendig.

In Konkordanz mit dem BT20-Tumormodell erwiesen sich auch die ITIH5-koexprimierten Zielgene des MDA-MB-231-Tumormodells klinisch möglicherweise prognostisch relevant durch eine mittels der GOBO-Datenbank dargelegte erhöhte Rezidiv- und Fernmetastasen-freie Überlebensrate bei einer hohen Expression des *Genclusters*. In diesem Kontext fiel zudem in beiden Tumormodellen eine evidente Assoziation der Zielgene mit dem „Extrazellulären Raum“ und bezüglich des MDA-MB-231-Tumormodells insbesondere mit der „Extrazellulären Matrix“ auf, der zentralen Barriere maligner Zellen (Wagener & Müller 2010), die in der Metastasierung von Tumoren eine dominante Rolle einnimmt. Besonders relevant erwies sich hier die phänotypische Veränderung der MDA-MB-231-Zellen nach der ITIH5-Reexpression. Charakteristisch für die MDA-MB-231-Wildtyp-Zellen ist ein mesenchymales, ungeordnetes Wachstum, welches in Abhängigkeit der ITIH5-Expression in einem epithelialen Wachstum mündete, einhergehend mit der Reexpression desmosomaler Komplex-Komponenten sowie einer Re-Organisation des Aktin-Zytoskelettes (Rose 2013). Möglicherweise supprimiert ITIH5 spezifische Mechanismen mesenchymaler migratorischer Prozesse, die ein fundamentales Kennzeichen invasiver Krebszellen darstellen (Sahai 2005). Der Prozess, den die ITIH5-positiven MDA-MB-231 möglicherweise durchlaufen, wird auch als die Mesenchymale-Epitheliale-Transition (MET) bezeichnet, dessen gegenläufige Veränderung die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) darstellt (Thiery 2002). Die EMT ist ein Prozess, in dessen Verlauf epitheliale Zellschichten ihre Polarität und Zell-Zell-Kontakte verlieren und die Zellen eine dramatische Remodelierung des Zytoskelettes durchlaufen (Thiery 2002). In Konkordanz mit einem Verlust epithelialer Zell-Adhäsions sowie Zytoskelettaler Komponenten akquirieren die EMT-Zellen die Expression mesenchymaler Marker und manifestieren einen migratorischen Phänotyp. Die EMT wurde als ein Merkmal der Embryogenese in den frühen 1980er Jahren beobachtet (Thiery 2002) und wurde recht schnell als relevanter Prozess in der Karzinogenese von Tumoren vermutet, wobei bis heute die Relevanz der EMT kontrovers diskutiert wird (Kang & Massague 2004; Moreno-Bueno *et al.* 2008).

Die strukturellen und zellulären Veränderungen metastatischer Zellen im Verlauf der EMT sind in einem anderen Gewebe mit einem differenziellen biologischen Kontext reversibel (Xue *et al.* 2003; Yang & Weinberg 2008). Die Hypothese, dass epigenetische Modifikationen diese bidirektionale Transition (EMT und MET) vermitteln, erhebt die Möglichkeit einer „epigenetischen EMT“ in Kontrast zu der „genetischen EMT“, dessen präzise regulatorische Rolle in der heutigen Forschung vermehrt Aufmerksamkeit gewinnt. Einige Studien geben bereits Hinweise darauf, dass die phänotypische Veränderung von Zellen im Prozess der EMT in einer *de novo* DNA-Methylierung epithelialer Marker (z.B. E-Cadherin) mündet, gefolgt von der strukturellen Veränderung der Zellen (Dumont *et al.* 2008; Lombaerts *et al.* 2006). Unter diesem Gesichtspunkt scheint die Demethylierung Tumorgenese-relevanter Gene (z.B. *NDRG2* und *EHD3*) in den MDA-MB-231-ITIH5-positiven Zellen von besonderer Bedeutung zu sein und zeigt einen Mechanismus wie ITIH5 möglicherweise Einfluss auf die Expression der ko-regulierten Gene nimmt. So konnte in dieser Studie erstmalig gezeigt werden, dass durch die Reexpression eines putativen Metastasierungssuppressorgen, nach der Hypothese einer „epigenetischen EMT“, zentrale Tumorsuppressorgene reexprimiert werden. Demethylierungsversuche mit den ITIH5-defizienten MDA-MB-231-Zellen resultierten in einer starken Reexpression Karzinogenese-relevanter Tumorsuppressorgene (z.B. *NDRG2*), was die tatsächliche epigenetisch-bedingte transkriptionelle Stilllegung dieser Gene impliziert. Yang *et al.* verdeutlichten in ihrer Studie den Einfluss der komplexen epigenetischen Modifikationen innerhalb der bidirektionalen Transition der EMT und MET (Yang *et al.* 2009). Sie zeigten, dass die Expression der Moleküle $\beta 4$ Integrin und E-Cadherin während der EMT der Brustdrüsenzellen, induziert durch TGF- β (*transforming growth factor beta*), verloren geht, koinzident mit einer *de novo* DNA-Hypermethylierung, einer Verminderung der aktiven Histon-Modifikationen H3K9Ac und H3K4me3 sowie einem Anstieg der repressiven Histon-Modifikation H3K27me3. Weiterhin konnten sie darlegen, dass durch den TGF- β Entzug die MET eintritt, basierend auf einer Reexpression von $\beta 4$ Integrin und E-Cadherin. Dennoch lagen die Promotoren dieser Gene weiterhin hypermethyliert vor, während die H3K9Ac und H3K4me3 wiederhergestellt und die H3K27me3 reduziert wurde. Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass vor allem die reversiblen Veränderungen der Histon-Modifikationen eine zentrale Rolle in der Regulation dieser Moleküle einnimmt. Eine aktuelle Studie verdeutlicht ebenfalls die komplexen Histon-Modifikationen im Verlauf der EMT gesteuert durch den Transkriptionsfaktor Snail (Lin *et al.* 2013). In diesem Kontext sind auch die Arbeiten von Mina Bissell zur ECM und deren zelluläre Eigenschaften in dem komplexen Mikromilieu der

Zelle von zentralem Interesse. Sie konnte zeigen, dass die ECM-Zusammensetzung einen hochgradigen Einfluss auf die Zell- und Chromatinstruktur ausübt (Le *et al.* 2007) und dass eine veränderte Zellmorphologie zu einer globalen Histon-Deacetylierung und einer Chromatin-Kondensation führen können, in Folge dessen eine globale Reduktion der Genexpression auftritt. Basierend auf ihren Daten sowie dem experimentellen und theoretischen Hinweis der spezifischen Rolle des Aktin-Zytoskelettes in der physikalischen Verbindung der ECM-vermittelten Zelladhäsion mit dem Zellkern (Maniotis *et al.* 1997) sowie integrierende Veränderungen der Zell- und Kernmorphologie (Guilak 1995; Jean *et al.* 2004), spekulieren die Forscher, dass die Zellmorphologie die Histon-Acetylierung über eine mechanische Transmission der zytoskelettalen Spannung auf den Zellkern reguliert. Möglicherweise erreicht ITIH5 die Reexpression zentraler Tumorsuppressorgene durch eine drastische Umstrukturierung der Zellmorphologie, die in Anlehnung an die Literatur zu einer Modifikation des komplexen epigenetischen Netzwerkes in der Zelle führt.

Der Auslöser der zellmorphologischen Veränderungen könnte in der Regulation ECM-basierter Moleküle liegen. Bezüglich der bekannten Rolle der ECM/Stroma Interaktion in der Invasion und Metastasierung humaner Tumoren (Bissell *et al.* 2005; Bissell *et al.* 2002), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ITIH5-Reexpression die basale Expression ECM-basierter Signalmoleküle beeinflusst. Diese aufgezeigten Expressionsänderungen erlauben die Formulierung vier hypothetischer Ansätze einer möglichen ITIH5-abhängigen Signaltransduktionskaskade ausgehend von der ECM:

1. ECM-Rezeptor-Interaktion:

Eine zentrale Verbindung zwischen der ECM und den intrazellulären Prozessen bildet möglicherweise der TGF- β Ko-Rezeptor Endoglin, der unter dem Einfluss von ITIH5 in den MDA-MB-231-Zellen reexprimiert wird. So konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust der Endoglin-Expression *in vitro* und *in vivo* die Remodelierung des Aktin-Zytoskelettes beeinflusst und die Zellmigration und -invasion im Mammakarzinom fördert (Henry *et al.* 2011). Somit könnte möglicherweise Endoglin auch im ITIH5-Modell eine ECM-vermittelte Signaltransduktion fördern und die beschriebenen zytoskelettalen- und migratorischen Veränderungen bedingen.

2. Src/FAK-Signaltransduktion:

Ausgehend von dem Endoglin-Rezeptor könnte die weitere Signaltransduktion über die nicht-Rezeptor ständige Fokale Adhäsions Kinase (FAK) erfolgen, deren basale

Expression in den ITIH5-Klonen gesteigert vorliegt. Die Verbindung von Endoglin mit FAK beruht auf der Assoziation der zytoplasmatischen Endoglin-Domäne mit zytoskelettalen Molekülen wie Zyxin und Paxillin (Conley *et al.* 2004; Sanz-Rodriguez *et al.* 2004). FAK ist eine zytoplasmatische nicht-Rezeptor Tyrosin Kinase, die wesentlich für die Signalübertragung zwischen den fokalen Adhäsionskomplexen und der ECM (engl. *outside-in-signaling*) verantwortlich ist (Burrige *et al.* 1988) und damit eine zentrale Rolle in der Tumordinvasion und -migration spielt. Trotz der unter dem Einfluss von ITIH5 erhöhten basalen FAK-Expression verbleibt die phosphorylierte, aktive Form (pFAK) in den ITIH5- und Leerklonen auf einem nahezu identischen Niveau d.h. ITIH5 beeinflusst möglicherweise die Autophosphorylierung von FAK negativ. FAK agiert in einem komplexen zellulären Netzwerk mit Src, einer weiteren zytoplasmatischen nicht-Rezeptor Tyrosin Kinase. Die erhöhte Expression beider Kinasen wurde in zahlreichen Tumorentitäten beschrieben und ist häufig mit einem schlechten klinischen Verlauf der Erkrankung assoziiert (Cance *et al.* 2000; Frame 2002; Summy & Gallick 2003), wengleich der Fokalen Adhäsions Kinase auch eine tumorsuppressive Rolle zugeordnet wird (Madan *et al.* 2006). Interessanterweise weist die Src-Kinase durch die ITIH5-Reexpression Degradationserscheinungen auf, wodurch diese möglicherweise nicht mehr in der Lage ist mit dem autophosphorylierten Y397-Aminosäurerest der fokalen Adhäsions Kinase zu interagieren, resultierend in einem spekulativen Abbruch der Src/FAK-vermittelten Signaltransduktionskaskade.

3. Differenzielle Expression von Caveolin-1:

Untermauert wird die Hypothese der Abrogation der Src/FAK-Signalkaskade durch die differenzielle Expression von Caveolin-1 in Abhängigkeit von ITIH5. Caveolin-1 ist der Hauptbestandteil der Caveolen, charakteristische Einstülpungen der Plasmamembran, die in zahlreichen zellulären Prozessen wie der Endozytose, der Signaltransduktion und der Tumorgenese des Mammakarzinoms eine evidente Rolle spielen (Aoki *et al.* 2011; Patani *et al.* 2012). Caveolin-1, welches in den ITIH5-Klonen eine differenziell erhöhte Expression zeigt, wurde bereits eine tumorsuppressive Funktion im Mammakarzinom zugesprochen (Du *et al.* 2012; Wu *et al.* 2008). Die suppressive Funktion von Caveolin-1 wird maßgeblich über eine oftmals beschriebene negative Regulation der Src-Kinase vermutet (Grande-Garcia *et al.* 2007; Miotti *et al.* 2005; Place *et al.* 2011; Trimmer *et al.* 2010). So zeigten Place *et al.* 2011, dass Caveolin-1 die Inhibition von c-Src über die C-terminale Src Kinase (Csk) koordiniert. Csk inhibiert c-Src durch Phosphorylierung des

C-terminalen Tyrosins. Darüber hinaus konnte ebenfalls eine direkte Interaktion von Caveolin-1 mit c-Src gezeigt werden (Li *et al.* 1996). Basierend auf einer „Src-Interaktions-Domäne“ kommt es zur Suppression der Autoaktivierung und damit der Kinase-Aktivität von c-Src (Li *et al.* 1996). Die in den ITIH5-Klonen beobachtete erhöhte Expression von Caveolin-1 bei gleichzeitiger Degradationerscheinung von c-Src impliziert einen negativen Regulations-Mechanismus über Caveolin-1, der jedoch bezüglich einer direkten oder indirekten Assoziation in Folgestudien verifiziert werden muss.

4. Verlust der STAT1-Phosphorylierung:

Der in den ITIH5-positiven MDA-MB-231-Zellen aufgezeigte Verlust der STAT1-Phosphorylierung deutet ebenfalls auf eine Modulation der c-Src/FAK Signalkaskade hin. STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) bildet als Transkriptionsfaktor ein intermediäres Zielmolekül des c-Src/FAK-Signalwegs. Obgleich bis heute hauptsächlich die Aktivierung von STAT1 über die Janus Kinasen (JAK) erforscht wurde, geben mehrere Studien Hinweise bezüglich einer c-Src/FAK-abhängigen Aktivierung von STAT1 (Bromberg & Darnell, Jr. 2000; Xie *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2010). Eine aktuelle Studie zeigt, dass STAT1 in der Lage ist mit Cyclin D1 direkt zu interagieren. Cyclin D1, ein gut charakterisierter Zellzyklus Regulator mit onkogenem Potential, ist in den ITIH5-positiven Zellen moderat herunter-reguliert. Dies impliziert eine mögliche Folge der reduzierten STAT1-Phosphorylierung und unterstützt die supprimierende Wirkung von ITIH5 sowie die mögliche Deregulation der c-Src/FAK Signalkaskade.

Basierend auf diesen Thesen ist in Abbildung 4-1 die hypothetische mechanistische Wirkung von ITIH5 in der Verbindung zwischen den fokalen Adhäsionskomplexen und der extrazellulären Matrix dargestellt, die möglicherweise synergistisch mit der Demethylierung und Reexpression zentraler Tumorsuppressorgene einhergeht.

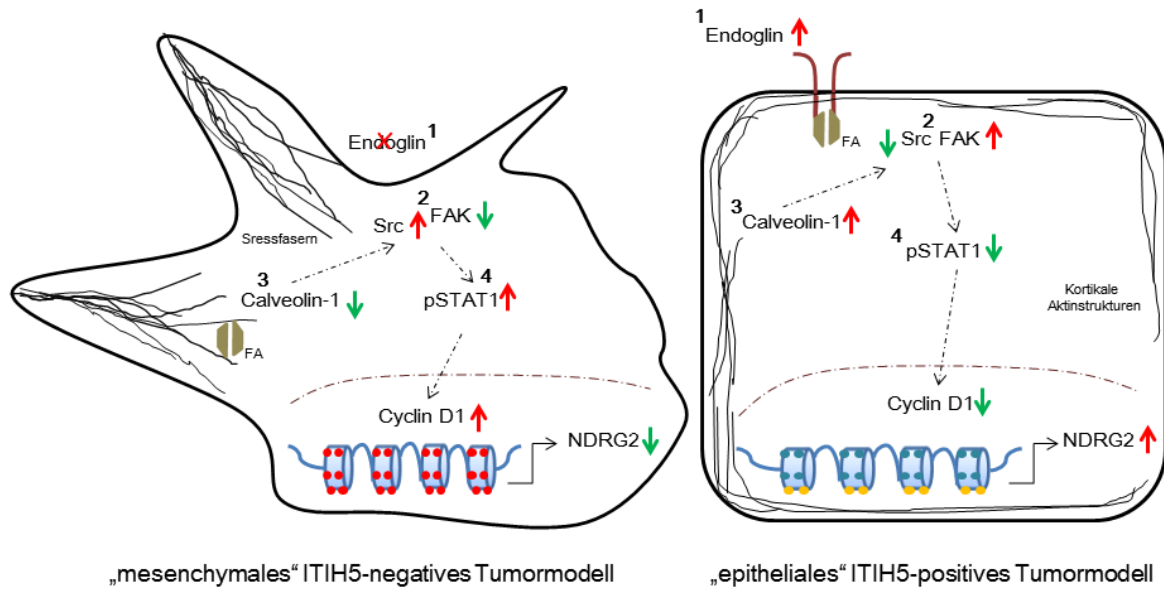


Abbildung 4-1: Das hypothetische Modell des mechanistischen Wirkungsspektrums von ITIH5 in der Verbindung zwischen den fokalen Adhäsionskomplexen und der extrazellulären Matrix.

Die Gen-Ontologie Analyse der *Microarray* dargelegten ITIH5-assoziierten Zielgene des MDA-MB-231-Tumormodells ermöglichten die Einordnung des ITIH5-Moleküls in einen Signalweg-basierten Kontext. Die ITIH5-assoziierte Reexpression von Endoglin (1) könnte die Signaltransduktionskaskade auslösen und letztendlich zu der veränderten Zellmorphologie der ITIH5-positiven MDA-MB-231-Zellen führen. Dabei verläuft die ITIH5-gesteuerte Signaltransduktion intrazellulär möglicherweise über die Src /FAK-Signalkaskade (2), wobei regulatorische Moleküle wie Caveolin-1 (3) und das *downstream* gelegene STAT1 (4) eine essenzielle Rolle spielen könnten. Die strukturellen Veränderungen der Zellen könnte der zentrale Auslöser der Demethylierung zentraler Tumorsuppressorgene (z.B. *NDRG2*) darstellen, welche die tumorsuppressive Rolle von ITIH5 wiederum unterstützen. Rote Pfeile kennzeichnen herauf-regulierte Moleküle; grüne Pfeile herunter-regulierte Moleküle. Schwarz gestrichelte Pfeile geben eine mögliche Interaktion der Moleküle an; Gelbe und blaue Markierungen an der DNA verdeutlichen aktive Transkriptionsmarkierungen (z.B. H3K4m2, H3K4m3), rote Markierungen stehen für repressive Transkriptionsmarkierungen (z.B. H3K27m3); FA: Fokale Adhäsionskomplexe. Zahlen zeigen die Zuordnung zu den aufgestellten Thesen.

Schlussfolgernd ist es in dieser Studie gelungen, das putative Metastasierungssuppressorgen *ITIH5* in der Brustkrebszelllinie BT20 zu reexprimieren sowie dessen tumorsuppressive Eigenschaft auf die Proliferation und Adhäsion der Brustkrebszellen erfolgreich darzustellen. In der funktionellen Ergänzung mit dem ITIH5-basierten MDA-MB-231-Brustkrebs-Tumormodell, dessen suppressive Eigenschaften deutlich stärker ausgeprägt vorlagen, ermöglichte eine DNA-*Microarray* Expressionsanalyse ausgewählter Zellklone eine erstmalige molekular-biologische Einordnung des Wirkungsspektrums von ITIH5. Basierend auf einer umfangreichen Gen-Ontologie Annotation ITIH5-assoziiierter Zielgene war es möglich, dieses interessante Molekül neurobiologischen sowie Lipidstoffwechsel-assoziierten Prozessen zuzuordnen. Obgleich eine Assoziation von ITIH5 zum Fettstoffwechsel bereits bekannt ist, eröffnet die Zuordnung zu den komplexen Prozessen der Neurobiologie ein völlig

neues, hoch interessantes Spektrum der ITIH5-Wirkung. Die angestrebte Darlegung Karzinogenese-relevanter Signalwege erbrachte eine evidente Assoziation ITIH5-regulierter Zielgene mit dem strukturellen Aufbau und definierter Signaltransduktionsprozesse der ECM. Während ITIH5 in dem molekularen Hintergrund der BT20-Zellen möglicherweise eine Interaktion mit dem Laminin eingeht, gegebenenfalls resultierend in einer erhöhten Adhäsionsfähigkeit, erfährt das MDA-MB-231-Tumormodell eine ITIH5-bedingte Umstrukturierung der ECM. Die morphologischen Veränderungen der MDA-MB-231-Zellen münden in einer nahezu vollständigen Demethylierung und Reexpression Tumorgenese-relevanter Tumorsuppressorgene wie z.B. *NDRG2* und *EHD3*. Wenn auch Veränderungen des hochkomplexen epigenetischen Netzwerks in den bidirektionalen Prozessen der EMT und MET bekannt sind, so beschreibt diese Studie erstmalig eine transkriptionelle Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen vermittelt durch ein putatives ECM-assoziiertes Metastasierungssuppressorgen. Der molekulare Mechanismus dieser Demethylierung bleibt hingegen spekulativ, wobei insbesondere eine Veränderung der H3K9Ac und H3K27me3 Histon-Modifikation in einem Zusammenspiel mit der DNA-Methylierung angenommen werden könnte. Zudem kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die dargestellte Reorganisation des Zytoskelettes zu einer direkten physikalischen ECM-vermittelten Veränderung der Kernmorphologie führt, die wiederum Veränderungen der Histon-Modifikationen bewirkt. Der Auslöser der zentralen Umstrukturierung der ECM, in dem Kontext der epithelialen Interaktion der ECM und dem Stroma, könnte dem TGF- β Ko-Rezeptor Endoglin und der nicht-Rezeptor Tyrosin Kinase Signalkaskade zugetragen werden. Die mögliche Caveolin-1 bedingte Degradierung der Src-Kinase resultiert in einer Dephosphorylierung *downstream* vorliegender Moleküle wie z.B. STAT1. So wurde die phänotypischen Umstrukturierung der Zellmorphologie ITIH5-positiver Zellen erstmalig auf mechanistischer Ebene beschrieben, indessen ITIH5 als möglicher ECM-basierter Modulator komplexer epigenetischer- sowie zytoskelettaler Signalprozesse, die auf der einzigartigen Interaktion der ECM und deren Mikroumgebung beruhen, agieren könnte.

4.3 DAS TUMORSUPPRESSORGEN *NDRG2* ALS POTENTIELLES *ITH5 TARGET*

Die funktionelle Auswirkung der durch die Reexpression von ITIH5 hervorgerufenen Demethylierung, welche mutmaßlich durch die zentrale phänotypische Umstrukturierung der ECM und des Aktin-Zytoskelettes (Rose 2013) gesteuert wird, sollte basierend auf der Reexpression des putativen Tumorsuppressorgens *NDRG2* näher dargelegt werden. Eine *NDRG2*-Assoziation konnte bis heute in einer Vielzahl Tumorgenese-relevanter Signalwege aufgezeigt werden. So wurde eine erhöhte Expression des Moleküls mit einer negativen

Regulation des aktiven, onkogenen TGF- β Liganden (Oh *et al.* 2012) und einer verminderten CD24-Expression (Zheng *et al.* 2010) gezeigt, beides in Konkordanz mit einer tumorsupprimierenden Wirkung im Mammakarzinom. Daneben besteht der klare Hinweis, dass der *NDRG2*-Promotor in zahlreichen Tumorentitäten, wie auch dem Mammakarzinom, über die DNA-Methylierung transkriptionell stillgelegt wird (Jeschke *et al.* 2012; Lorentzen *et al.* 2011).

Um die Reexpression des *NDRG2*-Promotors näher charakterisieren zu können, wurde das aberrante Methylierungsprofil der ITIH5- und Leerklone zunächst auf quantitativer Ebene bestätigt. Die quantitative Pyrosequenzierungsanalytik untermauerte die qualitative Beobachtung spezifischer *NDRG2*-Genloci. Ebenfalls belegte die chemische DAC/TSA-vermittelte Reexpression des *NDRG2*-Promotors in den MDA-MB-231-Leerklonen, dass die DNA-Methylierung tatsächlich einen evidenten Einfluss auf die Expression des *NDRG2*-Promotors einnimmt. Unter der Hypothese, dass die ITIH5-Expression zu einer indirekten, über eine veränderte Zellmorphologie-gesteuerten Demethylierung und Reexpression des *NDRG2*-Promotors führt, wurde die *NDRG2*-ITIH5-Expression im Mammakarzinom auf RNA- und Proteinebene korreliert. Tatsächlich konnte auf RNA-Ebene anhand zweier unterschiedlicher Korrelationsmodelle eine moderate positive Korrelation zwischen der ITIH5- und *NDRG2*-Expression aufgezeigt werden, die zudem Signifikanz besaß. Auf Proteinebene ließ sich diese positive signifikante Korrelation verifizieren. Von klinischer Signifikanz verdeutlichte die *in silico* Analyse der *NDRG2*-ITIH5-Expressionsachse ein erhöhtes Rezidiv- und Fernmetastasen-freies Überleben bei einer hohen *NDRG2*-ITIH5 Expression. Verstärkt wurde dieser Effekt insbesondere in der Subgruppe der ER-positiven Mammakarzinome, was eine klinisch-prognostische Relevanz dieses Gen-Dupletts impliziert und eine physiologische Relevanz dieser Expressionsachse untermauert.

Ein möglicher *NDRG2*-basierter Einfluss auf die Zellproliferation- und Migration der ITIH5-Klone sollte mittels eines *knock-down* Experiments aufgezeigt werden. Ein kausaler Einfluss des *NDRG2*-Verlusts konnte für den *NDRG2*-defizienten ITIH5-Klon#4 dargelegt werden, der eine erhöhte Zellmigration gegenüber dem *NDRG2*-positiven ITIH5-Klon #4 zeigte. Der fehlende Einfluss des *NDRG2*-Verlusts auf die Migration in dem ITIH5-Klon #7 bzw. beider Klone hinsichtlich proliferativer Eigenschaften impliziert das *NDRG2* vermutlich kein zentrales Target der ITIH5-vermittelten suppressiven Wirkung darstellt. Dennoch sind hier weitere Experimente in komplexeren 3D-Systemen sinnvoll. Vielmehr könnte die Reexpression indirekt über die ITIH5-basierte morphologische Veränderung der ECM und

des Aktinzytosklettes und einer daraus resultierenden möglichen Histon-Modifikation erfolgen.

Schlussfolgernd konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Reexpression eines putativen Metastasierungssuppressorgens in einer Demethylierung zentraler Tumorsuppressorgene resultiert. Die tiefere Charakterisierung des Tumorsuppressorgens *NDRG2*, welches in den ITIH5-positiven Zellen eine umfangreiche Demethylierung erfährt, belegte eine klare positive Korrelation der *NDRG2*-ITIH5-Expression auf RNA- und Proteinebene in Mammakarzinomgeweben. Diese Expressionsachse war von klinischer Relevanz wie statistische Analysen aufzeigten. Die Demethylierung könnte auf einem indirekten Effekt der zellmorphologischen Veränderung der MDA-MB-231-Zellen basieren und direkten Einfluss auf die reduzierte proliferative und migratorische Fähigkeit der ITIH5-positiven MDA-MB-231-Zellen besitzen. Anzunehmen ist jedoch, dass die Reexpression weiterer Tumorgenese-relevanter Tumorsuppressorgene für die Gesamtheit der durch ITIH5 suppressiven Wirkungen notwendig ist und stattfindet. Diese Gene sowie die spezifische Histon-Modifikation gilt es in Folgestudien zu untersuchen, um ITIH5 als potentiell klinisches Target zu verifizieren.

5. LITERATUR

Aapola, U., Kawasaki, K., Scott, H. S., Ollila, J., Vihinen, M., Heino, M., Shintani, A., Kawasaki, K., Minoshima, S., Krohn, K., Antonarakis, S. E., Shimizu, N., Kudoh, J., and Peterson, P. (2000). Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics* **65**, 293-8.

Adair, J. E., Stober, V., Sobhany, M., Zhuo, L., Roberts, J. D., Negishi, M., Kimata, K., and Garantzotis, S. (2009). Inter-alpha-trypsin inhibitor promotes bronchial epithelial repair after injury through vitronectin binding. *J. Biol. Chem.* **284**, 16922-30.

Ai, L., Tao, Q., Zhong, S., Fields, C. R., Kim, W. J., Lee, M. W., Cui, Y., Brown, K. D., and Robertson, K. D. (2006). Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis* **27**, 1341-8.

Andrulis, I. L., Bull, S. B., Blackstein, M. E., Sutherland, D., Mak, C., Sidlofsky, S., Pritzker, K. P., Hartwick, R. W., Hanna, W., Lickley, L., Wilkinson, R., Qizilbash, A., Ambus, U., Lipa, M., Weizel, H., Katz, A., Baida, M., Mariz, S., Stoik, G., Dacamara, P., Strongitharm, D., Geddie, W., and McCready, D. (1998). neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **16**, 1340-9.

Antequera, F., and Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 11995-9.

Antoniotti, S., Taverna, D., Maggiora, P., Sapei, M. L., Hynes, N. E., and De, B. M. (1994). Oestrogen and epidermal growth factor down-regulate erbB-2 oncogene protein expression in breast cancer cells by different mechanisms. *Br. J. Cancer* **70**, 1095-101.

Anveden, A., Sjöholm, K., Jacobson, P., Palsdottir, V., Walley, A. J., Froguel, P., Al-Daghri, N., McTernan, P. G., Mejhert, N., Arner, P., Sjöström, L., Carlsson, L. M., and Svensson, P. A. (2012). ITIH-5 expression in human adipose tissue is increased in obesity. *Obesity. (Silver. Spring)* **20**, 708-14.

Aoki, M. N., Amarante, M. K., Oda, J. M., and Watanabe, M. A. (2011). Caveolin involvement and modulation in breast cancer. *Mini. Rev. Med. Chem.* **11**, 1143-52.

Armstrong, K., Moye, E., Williams, S., Berlin, J. A., and Reynolds, E. E. (2007). Screening mammography in women 40 to 49 years of age: a systematic review for the American College of Physicians. *Ann. Intern. Med.* **146**, 516-26.

Bafico, A., Gazit, A., Pramila, T., Finch, P. W., Yaniv, A., and Aaronson, S. A. (1999). Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 16180-7.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T. Y., Schones, D. E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-37.

Barsky, S. H., Siegal, G. P., Jannotta, F., and Liotta, L. A. (1983). Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* **49**, 140-7.

Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **2 Suppl 1**, S4-11.

- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638-42.
- Berg, W. A. (2009). Tailored supplemental screening for breast cancer: what now and what next? *AJR Am. J. Roentgenol.* **192**, 390-9.
- Bergman, Y., and Mostoslavsky, R. (1998). DNA demethylation: turning genes on. *Biol. Chem.* **379**, 401-7.
- Berns, E. M., Foekens, J. A., van Putten, W. L., van Staveren, I. L., Portengen, H., de Koning, W. C., and Klijn, J. G. (1992a). Prognostic factors in human primary breast cancer: comparison of c-myc and HER2/neu amplification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 13-9.
- Berns, E. M., Klijn, J. G., van Staveren, I. L., Portengen, H., Noordegraaf, E., and Foekens, J. A. (1992b). Prevalence of amplification of the oncogenes c-myc, HER2/neu, and int-2 in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors. *Eur. J. Cancer* **28**, 697-700.
- Bernstein, B. E., Meissner, A., and Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* **128**, 669-81.
- Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework (2001). *Clin. Pharmacol. Ther.* **69**, 89-95.
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.
- Birgisdottir, V., Stefansson, O. A., Bodvarsdottir, S. K., Hilmarsdottir, H., Jonasson, J. G., and Eyfjord, J. E. (2006). Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **8**, R38.
- Bissell, M. J., Kenny, P. A., and Radisky, D. C. (2005). Microenvironmental regulators of tissue structure and function also regulate tumor induction and progression: the role of extracellular matrix and its degrading enzymes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **70**, 343-56.
- Bissell, M. J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 46-54.
- Bissell, M. J., Radisky, D. C., Rizki, A., Weaver, V. M., and Petersen, O. W. (2002a). The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation* **70**, 537-46.
- Bleyer, A., and Welch, H. G. (2012). Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1998-2005.
- Bombonati, A., and Sgroi, D. C. (2011). The molecular pathology of breast cancer progression. *J. Pathol.* **223**, 307-17.
- Borg, A., Baldetorp, B., Ferno, M., Olsson, H., and Sigurdsson, H. (1992). c-myc amplification is an independent prognostic factor in postmenopausal breast cancer. *Int. J. Cancer* **51**, 687-91.
- Boyd, N. F., Guo, H., Martin, L. J., Sun, L., Stone, J., Fishell, E., Jong, R. A., Hislop, G., Chiarelli, A., Minkin, S., and Yaffe, M. J. (2007). Mammographic density and the risk and detection of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **356**, 227-36.
- Brenner, C., and Fuks, F. (2006). DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **301**, 45-66.

- Bromberg, J., and Darnell, J. E., Jr. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* **19**, 2468-73.
- Brooks, J. D., Cairns, P., Shore, R. E., Klein, C. B., Wirgin, I., Afanasyeva, Y., and Zeleniuch-Jacquotte, A. (2010). DNA methylation in pre-diagnostic serum samples of breast cancer cases: results of a nested case-control study. *Cancer Epidemiol.* **34**, 717-23.
- Brouckaert, O., Laenen, A., Vanderhaegen, J., Wildiers, H., Leunen, K., Amant, F., Berteloot, P., Smeets, A., Paridaens, R., Christiaens, M. R., Floris, G., Moerman, P., Van, L. E., Peeters, S., Weltens, C., Vergote, I., and Neven, P. (2012). Applying the 2011 St Gallen panel of prognostic markers on a large single hospital cohort of consecutively treated primary operable breast cancers. *Ann. Oncol.* **23**, 2578-84.
- Buerger, H., Mommers, E. C., Littmann, R., Simon, R., Diallo, R., Poremba, C., Dockhorn-Dworniczak, B., van Diest, P. J., and Boecker, W. (2001). Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. *J. Pathol.* **194**, 165-70.
- Buerger, H., Simon, R., Schafer, K. L., Diallo, R., Littmann, R., Poremba, C., van Diest, P. J., Dockhorn-Dworniczak, B., and Bocker, W. (2000). Genetic relation of lobular carcinoma in situ, ductal carcinoma in situ, and associated invasive carcinoma of the breast. *Mol. Pathol.* **53**, 118-21.
- Burchfield, J. G., Lennard, A. J., Narasimhan, S., Hughes, W. E., Wasinger, V. C., Corthals, G. L., Okuda, T., Kondoh, H., Biden, T. J., and Schmitz-Peiffer, C. (2004). Akt mediates insulin-stimulated phosphorylation of Ndr2: evidence for cross-talk with protein kinase C theta. *J. Biol. Chem.* **279**, 18623-32.
- Burrige, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 487-525.
- Byrne, C., Schairer, C., Wolfe, J., Parekh, N., Salane, M., Brinton, L. A., Hoover, R., and Haile, R. (1995). Mammographic features and breast cancer risk: effects with time, age, and menopause status. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 1622-9.
- Cadigan, K. M., and Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* **11**, 3286-305.
- Campanero, M. R., Armstrong, M. I., and Flemington, E. K. (2000). CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6481-6.
- Cance, W. G., Harris, J. E., Iacocca, M. V., Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S., and Xu, L. (2000). Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res.* **6**, 2417-23.
- Cerutti, H., and Casas-Mollano, J. A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.* **50**, 81-99.
- Chang, X., Li, Z., Ma, J., Deng, P., Zhang, S., Zhi, Y., Chen, J., and Dai, D. (2013). DNA Methylation of NDRG2 in Gastric Cancer and Its Clinical Significance. *Dig. Dis. Sci.* **58**, 715-23.
- Chedin, F., Lieber, M. R., and Hsieh, C. L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 16916-21.

- Chen, W. Q., Hoeger, H., Diao, W. F., Pollak, A., and Lubec, G. (2007). Mass spectrometrical characterization of NDRG2 protein (N-myc-downstream regulated gene 2) and description of two novel phosphorylation sites. *Neurochem. Res.* **32**, 1969-77.
- Cho, Y. H., Shen, J., Gammon, M. D., Zhang, Y. J., Wang, Q., Gonzalez, K., Xu, X., Bradshaw, P. T., Teitelbaum, S. L., Garbowski, G., Hibshoosh, H., Neugut, A. I., Chen, J., and Santella, R. M. (2012). Prognostic significance of gene-specific promoter hypermethylation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **131**, 197-205.
- Choi, S. C., Kim, K. D., Kim, J. T., Kim, J. W., Yoon, D. Y., Choe, Y. K., Chang, Y. S., Paik, S. G., and Lim, J. S. (2003). Expression and regulation of NDRG2 (N-myc downstream regulated gene 2) during the differentiation of dendritic cells. *FEBS Lett.* **553**, 413-8.
- Choi, S. C., Yoon, S. R., Park, Y. P., Song, E. Y., Kim, J. W., Kim, W. H., Yang, Y., Lim, J. S., and Lee, H. G. (2007). Expression of NDRG2 is related to tumor progression and survival of gastric cancer patients through Fas-mediated cell death. *Exp. Mol. Med.* **39**, 705-14.
- Chong, P. K., Lee, H., Zhou, J., Liu, S. C., Loh, M. C., Wang, T. T., Chan, S. P., Smoot, D. T., Ashktorab, H., So, J. B., Lim, K. H., Yeoh, K. G., and Lim, Y. P. (2010). ITIH3 is a potential biomarker for early detection of gastric cancer. *J. Proteome. Res.* **9**, 3671-9.
- Chow, J. C., Yen, Z., Ziesche, S. M., and Brown, C. J. (2005). Silencing of the mammalian X chromosome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **6**, 69-92.
- Colella, S., Shen, L., Baggerly, K. A., Issa, J. P., and Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* **35**, 146-50.
- Colombatti, A., and Bonaldo, P. (1991). The superfamily of proteins with von Willebrand factor type A-like domains: one theme common to components of extracellular matrix, hemostasis, cellular adhesion, and defense mechanisms. *Blood* **77**, 2305-15.
- Conley, B. A., Koleva, R., Smith, J. D., Kacer, D., Zhang, D., Bernabeu, C., and Vary, C. P. (2004). Endoglin controls cell migration and composition of focal adhesions: function of the cytosolic domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 27440-9.
- Constantinides, P. G., Jones, P. A., and Gevers, W. (1977). Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* **267**, 364-6.
- Cosgrove, M. S., Boeke, J. D., and Wolberger, C. (2004). Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 1037-43.
- Costello, J. F., Fruhwald, M. C., Smiraglia, D. J., Rush, L. J., Robertson, G. P., Gao, X., Wright, F. A., Feramisco, J. D., Peltomaki, P., Lang, J. C., Schuller, D. E., Yu, L., Bloomfield, C. D., Caligiuri, M. A., Yates, A., Nishikawa, R., Su, H. H., Petrelli, N. J., Zhang, X., O'Dorisio, M. S., Held, W. A., Cavenee, W. K., and Plass, C. (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* **24**, 132-8.
- Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F. M., Hutcheon, D. F., Kafonek, D. R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X., Powe, N. R., and Feinberg, A. P. (2003). Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* **299**, 1753-5.
- Culty, M., Shizari, M., Thompson, E.W., and Underhill C.B. (1994). Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *J Cell Physiol* **160**, 275-86.

- Dahl, E., Kristiansen, G., Gottlob, K., Klaman, I., Ebner, E., Hinzmann, B., Hermann, K., Pilarsky, C., Durst, M., Klinkhammer-Schalke, M., Blaszyk, H., Knuechel, R., Hartmann, A., Rosenthal, A., and Wild, P. J. (2006). Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 3950-60.
- Dahlman, I., Elsen, M., Tennagels, N., Korn, M., Brockmann, B., Sell, H., Eckel, J., and Arner, P. (2012). Functional annotation of the human fat cell secretome. *Arch. Physiol Biochem.* **118**, 84-91.
- Dalmizrak, O., Wu, A., Chen, J., Sun, H., Utama, F. E., Zambelli, D., Tran, T. H., Rui, H., and Baserga, R. (2007). Insulin receptor substrate-1 regulates the transformed phenotype of BT-20 human mammary cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 2124-30.
- Das, P. M., and Singal, R. (2004). DNA methylation and cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4632-42.
- de la Motte, C. A., Hascall, V. C., Drazba, J., Bandyopadhyay, S. K., and Strong, S. A. (2003). Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am. J. Pathol.* **163**, 121-33.
- Deng, Y., Yao, L., Chau, L., Ng, S. S., Peng, Y., Liu, X., Au, W. S., Wang, J., Li, F., Ji, S., Han, H., Nie, X., Li, Q., Kung, H. F., Leung, S. Y., and Lin, M. C. (2003). N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) inhibits glioblastoma cell proliferation. *Int. J. Cancer* **106**, 342-7.
- Diekmann, S., and Diekmann, F. (2008). [Mammography screening in Germany]. *Radiologe* **48**, 17-25.
- Dong, A., Yoder, J. A., Zhang, X., Zhou, L., Bestor, T. H., and Cheng, X. (2001). Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res.* **29**, 439-48.
- Donninger, H., Vos, M. D., and Clark, G. J. (2007). The RASSF1A tumor suppressor. *J. Cell Sci.* **120**, 3163-72.
- Du, X., Qian, X., Papageorge, A., Schetter, A. J., Vass, W. C., Liu, X., Braverman, R., Robles, A. I., and Lowy, D. R. (2012). Functional interaction of tumor suppressor DLC1 and caveolin-1 in cancer cells. *Cancer Res.* **72**, 4405-16.
- Dulaimi, E., Hillinck, J., Ibanez, d. C., I, Al-Saleem, T., and Cairns, P. (2004). Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6189-93.
- Dumont, N., Wilson, M. B., Crawford, Y. G., Reynolds, P. A., Sigaroudinia, M., and Tlsty, T. D. (2008). Sustained induction of epithelial to mesenchymal transition activates DNA methylation of genes silenced in basal-like breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 14867-72.
- Duncan, B. K., and Miller, J. H. (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* **287**, 560-1.
- Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V., and Laird, P. W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res.* **28**, E32.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* **300**, 455.

- Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161-74.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457-63.
- Ehrlich, M. (2003). Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J. Cell Biochem.* **88**, 899-910.
- Elston, E. W., and Ellis, I. O. (1993). Method for grading breast cancer. *J. Clin. Pathol.* **46**, 189-90.
- Elstrodt, F., Hollestelle, A., Nagel, J. H., Gorin, M., Wasielewski, M., van den Ouweland, A., Merajver, S. D., Ethier, S. P., and Schutte, M. (2006). BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res.* **66**, 41-5.
- Enghild, J. J., Salvesen, G., Hefta, S. A., Thogersen, I. B., Rutherford, S., and Pizzo, S. V. (1991). Chondroitin 4-sulfate covalently cross-links the chains of the human blood protein pre-alpha-inhibitor. *J. Biol. Chem.* **266**, 747-51.
- England, R., and Pettersson, M. (2005). Pyro Q-CpGTM: quantitative analysis of methylation in multiple CpG sites by Pyrosequencing[®]. *Nature Methods*.**10**,1038.
- Escot, C., Theillet, C., Lidereau, R., Spyrtos, F., Champeme, M. H., Gest, J., and Callahan, R. (1986). Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **83**, 4834-8.
- Esteller, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum. Mol. Genet.* **16 Spec No 1**, R50-R59.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* **358**, 1148-59.
- Esteller, M., and Almouzni, G. (2005). How epigenetics integrates nuclear functions. Workshop on epigenetics and chromatin: transcriptional regulation and beyond. *EMBO Rep.* **6**, 624-8.
- Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* **61**, 3225-9.
- Esteller, M., Fraga, M. F., Paz, M. F., Campo, E., Colomer, D., Novo, F. J., Calasanz, M. J., Galm, O., Guo, M., Benitez, J., and Herman, J. G. (2002). Cancer epigenetics and methylation. *Science* **297**, 1807-8.
- Esteller, M., and Herman, J. G. (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.* **196**, 1-7.
- Etzioni, R., Urban, N., Ramsey, S., McIntosh, M., Schwartz, S., Reid, B., Radich, J., Anderson, G., and Hartwell, L. (2003). The case for early detection. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 243-52.
- Euhus, D. M., Bu, D., Milchgrub, S., Xie, X. J., Bian, A., Leitch, A. M., and Lewis, C. M. (2008). DNA methylation in benign breast epithelium in relation to age and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 1051-9.
- Feil, R., and Khosla, S. (1999). Genomic imprinting in mammals: an interplay between chromatin and DNA methylation? *Trends Genet.* **15**, 431-5.

- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* **301**, 89-92.
- Feng, L., Xie, Y., Zhang, H., and Wu, Y. (2011). Down-regulation of NDRG2 gene expression in human colorectal cancer involves promoter methylation and microRNA-650. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **406**, 534-8.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Fleischhacker, M., and Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 181-232.
- Fonseca, R., Hartmann, L. C., Petersen, I. A., Donohue, J. H., Crotty, T. B., and Gisvold, J. J. (1997). Ductal carcinoma in situ of the breast. *Ann. Intern. Med.* **127**, 1013-22.
- Foulkes, W. D., Smith, I. E., and Reis-Filho, J. S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1938-48.
- Fraga, M. F., Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., Mao, J. H., Balmain, A., Cano, A., and Esteller, M. (2004). A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res.* **64**, 5527-34.
- Frame, M. C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta* **1602**, 114-30.
- Friedenson, B. (2005). BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. *MedGenMed.* **7**, 60.
- Friend, S. H., Horowitz, J. M., Gerber, M. R., Wang, X. F., Bogenmann, E., Li, F. P., and Weinberg, R. A. (1987). Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 9059-63.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., and Paul, C. L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 1827-31.
- Gal, S., Fidler, C., Lo, Y. M., Taylor, M., Han, C., Moore, J., Harris, A. L., and Wainscoat, J. S. (2004). Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *Br. J. Cancer* **90**, 1211-5.
- Galm, O., and Herman, J. G. (2005). Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods Mol. Med.* **113**, 279-91.
- Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.* **277**, 25748-55.
- Gao, L., Wu, G. J., Liu, X. W., Zhang, R., Yu, L., Zhang, G., Liu, F., Yu, C. G., Yuan, J. L., Wang, H., and Yao, L. B. (2011). Suppression of invasion and metastasis of prostate cancer cells by overexpression of NDRG2 gene. *Cancer Lett.* **310**, 94-100.
- Garantziotis, S., Zudaire, E., Trempus, C. S., Hollingsworth, J. W., Jiang, D., Lancaster, L. H., Richardson, E., Zhuo, L., Cuttitta, F., Brown, K. K., Noble, P. W., Kimata, K., and Schwartz, D. A.

- (2008). Serum inter-alpha-trypsin inhibitor and matrix hyaluronan promote angiogenesis in fibrotic lung injury. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **178**, 939-47.
- Geller, M. L., and Chlebowski, R. T. (2003). HT and breast cancer risk. *Fertil. Steril.* **80 Suppl 4**, 5-9.
- GEKID, *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.* (2007/2008). Krebs in Deutschland. 8. Ausgabe.
- Gion, M., Mione, R., Leon, A. E., and Dittadi, R. (1999). Comparison of the diagnostic accuracy of CA27.29 and CA15.3 in primary breast cancer. *Clin. Chem.* **45**, 630-7.
- Grande-Garcia, A., Echarri, A., de, R. J., Alderson, N. B., Waterman-Storer, C. M., Valdivielso, J. M., and del Pozo, M. A. (2007). Caveolin-1 regulates cell polarization and directional migration through Src kinase and Rho GTPases. *J. Cell Biol.* **177**, 683-94.
- Guilak, F. (1995). Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J. Biomech.* **28**, 1529-41.
- Guo, Y., Ma, J., Wu, L., Wang, Q., Li, X., Li, X., Zhang, Y., Zhang, J., Yao, L., Zhang, J., and Liu, W. (2013). Hyperthermia-induced NDRG2 upregulation inhibits the invasion of human hepatocellular carcinoma via suppressing ERK1/2 signaling pathway. *PLoS. One.* **8**, e61079.
- Habas, R., and Dawid, I. B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J. Biol.* **4**, 2.
- Hamm, A., Veeck, J., Bektas, N., Wild, P. J., Hartmann, A., Heindrichs, U., Kristiansen, G., Werbowetski-Ogilvie, T., Del, M. R., Knuechel, R., and Dahl, E. (2008). Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis. *BMC. Cancer* **8**, 25.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-74.
- Harness, J. K., Vetter, T. S., and Salibian, A. H. (2011). Areola and nipple-areola-sparing mastectomy for breast cancer treatment and risk reduction: report of an initial experience in a community hospital setting. *Ann. Surg. Oncol.* **18**, 917-22.
- Harris, M. A., Clark, J., Ireland, A., Lomax, J., Ashburner, M., Foulger, R., Eilbeck, K., Lewis, S., Marshall, B., Mungall, C., Richter, J., Rubin, G. M., Blake, J. A., Bult, C., Dolan, M., Drabkin, H., Eppig, J. T., Hill, D. P., Ni, L., Ringwald, M., Balakrishnan, R., Cherry, J. M., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hong, E. L., Nash, R. S., Sethuraman, A., Theesfeld, C. L., Botstein, D., Dolinski, K., Feierbach, B., Berardini, T., Mundodi, S., Rhee, S. Y., Apweiler, R., Barrell, D., Camon, E., Dimmer, E., Lee, V., Chisholm, R., Gaudet, P., Kibbe, W., Kishore, R., Schwarz, E. M., Sternberg, P., Gwinn, M., Hannick, L., Wortman, J., Berriman, M., Wood, V., de la Cruz, N., Tonellato, P., Jaiswal, P., Seigfried, T., and White, R. (2004). The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* **32**, D258-D261.
- Hayatsu, H. (2008). Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis--a personal account. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **84**, 321-30.
- Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.* **18**, 6538-47.

- Henry, L. A., Johnson, D. A., Sarrio, D., Lee, S., Quinlan, P. R., Crook, T., Thompson, A. M., Reis-Filho, J. S., and Isacke, C. M. (2011). Endoglin expression in breast tumor cells suppresses invasion and metastasis and correlates with improved clinical outcome. *Oncogene* **30**, 1046-58.
- Herman, J. G. (2004). Circulating methylated DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1022**, 33-9.
- Herman, J. G., and Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042-54.
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myohanen, S., Nelkin, B. D., and Baylin, S. B. (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 9821-6.
- Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J. V., Setien, F., Carmona, F. J., Puca, A. A., Sayols, S., Pujana, M. A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A. F., Fraga, M. F., Heath, S. C., Valencia, A., Gut, I. G., Wang, J., and Esteller, M. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**, 10522-7.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y.)* **10**, 413-7.
- Hill, V. K., Ricketts, C., Bieche, I., Vacher, S., Gentle, D., Lewis, C., Maher, E. R., and Latif, F. (2011). Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. *Cancer Res.* **71**, 2988-99.
- Himmelfarb, M., Klopocki, E., Grube, S., Staub, E., Klamann, I., Hinzmänn, B., Kristiansen, G., Rosenthal, A., Durst, M., and Dahl, E. (2004). ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Lett.* **204**, 69-77.
- Hirata, K., Masuda, K., Morikawa, W., He, J. W., Kuraoka, A., Kuwano, M., and Kawabuchi, M. (2004). N-myc downstream-regulated gene 1 expression in injured sciatic nerves. *Glia* **47**, 325-34.
- Holliday, R. (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* **238**, 163-70.
- Holm, K., Hegardt, C., Staaf, J., Vallon-Christersson, J., Jonsson, G., Olsson, H., Borg, A., and Ringner, M. (2010). Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast Cancer Res.* **12**, R36.
- Hooley, R. J., Andrejeva, L., and Scoult, L. M. (2011). Breast cancer screening and problem solving using mammography, ultrasound, and magnetic resonance imaging. *Ultrasound Q.* **27**, 23-47.
- Hoque, M. O., Feng, Q., Toure, P., Dem, A., Critchlow, C. W., Hawes, S. E., Wood, T., Jeronimo, C., Rosenbaum, E., Stern, J., Yu, M., Trink, B., Kiviat, N. B., and Sidransky, D. (2006). Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4262-9.
- Houssami, N., Ciatto, S., Irwig, L., Simpson, J. M., and Macaskill, P. (2002). The comparative sensitivity of mammography and ultrasound in women with breast symptoms: an age-specific analysis. *Breast* **11**, 125-30.
- Hu, X. L., Liu, X. P., Lin, S. X., Deng, Y. C., Liu, N., Li, X., and Yao, L. B. (2004). NDRG2 expression and mutation in human liver and pancreatic cancers. *World J. Gastroenterol.* **10**, 3518-21.

- Hu, Z., Fan, C., Oh, D. S., Marron, J. S., He, X., Qaqish, B. F., Livasy, C., Carey, L. A., Reynolds, E., Dressler, L., Nobel, A., Parker, J., Ewend, M. G., Sawyer, L. R., Wu, J., Liu, Y., Nanda, R., Tretiakova, M., Ruiz, O. A., Dreher, D., Palazzo, J. P., Perreard, L., Nelson, E., Mone, M., Hansen, H., Mullins, M., Quackenbush, J. F., Ellis, M. J., Olopade, O. I., Bernard, P. S., and Perou, C. M. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* **7**, 96.
- Huang, K. T., Dobrovic, A., Yan, M., Karim, R. Z., Lee, C. S., Lakhani, S. R., and Fox, S. B. (2010). DNA methylation profiling of phyllodes and fibroadenoma tumours of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* **124**, 555-65.
- Huang, L., Yoneda, M., and Kimata, K. (1993). A serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP) is the heavy chain of the inter alpha-trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* **268**, 26725-30.
- Hulka, B. S., and Moorman, P. G. (2008). Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* **61**, 203-13.
- Hynes, N. E., and Stern, D. F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**, 165-84.
- Iguchi-Arigo, S. M., and Schaffner, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* **3**, 612-9.
- Imhof, A., and Becker, P. B. (2001). Modifications of the histone N-terminal domains. Evidence for an "epigenetic code"? *Mol. Biotechnol.* **17**, 1-13.
- Iorns, E., Turner, N. C., Elliott, R., Syed, N., Garrone, O., Gasco, M., Tutt, A. N., Crook, T., Lord, C. J., and Ashworth, A. (2008). Identification of CDK10 as an important determinant of resistance to endocrine therapy for breast cancer. *Cancer Cell* **13**, 91-104.
- Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D., and Knippers, R. (2001). DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* **61**, 1659-65.
- Jakowlew, S. B. (2006). Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 435-57.
- Jean, R. P., Gray, D. S., Spector, A. A., and Chen, C. S. (2004). Characterization of the nuclear deformation caused by changes in endothelial cell shape. *J. Biomech. Eng* **126**, 552-8.
- Jeltsch, A. (2006). On the enzymatic properties of Dnmt1: specificity, processivity, mechanism of linear diffusion and allosteric regulation of the enzyme. *Epigenetics.* **1**, 63-6.
- Jeschke, J., Van, N. L., Glockner, S. C., Dhir, M., Calmon, M. F., Deregowski, V., Van, C. W., Vlassenbroeck, I., Koch, A., Chan, T. A., Cope, L., Hooker, C. M., Schuebel, K. E., Gabrielson, E., Winterpacht, A., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Ahuja, N. (2012). Biomarkers for detection and prognosis of breast cancer identified by a functional hypermethylation screen. *Epigenetics.* **7**, 701-9.
- Jing, F., Yuping, W., Yong, C., Jie, L., Jun, L., Xuanbing, T., and Lihua, H. (2010). CpG island methylator phenotype of multigene in serum of sporadic breast carcinoma. *Tumour. Biol.* **31**, 321-31.

- Jing, F., Zhang, J., Tao, J., Zhou, Y., Jun, L., Tang, X., Wang, Y., and Hai, H. (2007). Hypermethylation of tumor suppressor genes BRCA1, p16 and 14-3-3sigma in serum of sporadic breast cancer patients. *Onkologie*. **30**, 14-9.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 415-28.
- Jones, P. A., and Taylor, S. M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**, 85-93.
- Kagan, J., Srivastava, S., Barker, P. E., Belinsky, S. A., and Cairns, P. (2007). Towards Clinical Application of Methylated DNA Sequences as Cancer Biomarkers: A Joint NCI's EDRN and NIST Workshop on Standards, Methods, Assays, Reagents and Tools. *Cancer Res.* **67**, 4545-9.
- Kalager, M., Adami, H. O., Bretthauer, M., and Tamimi, R. M. (2012). Overdiagnosis of invasive breast cancer due to mammography screening: results from the Norwegian screening program. *Ann. Intern. Med.* **156**, 491-9.
- Kaneda, A., and Feinberg, A. P. (2005). Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res.* **65**, 11236-40.
- Kang, Y., and Massague, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**, 277-9.
- Key, J., Hodgson, S., Omar, R. Z., Jensen, T. K., Thompson, S. G., Boobis, A. R., Davies, D. S., and Elliott, P. (2006). Meta-analysis of studies of alcohol and breast cancer with consideration of the methodological issues. *Cancer Causes Control* **17**, 759-70.
- Kim, A., Kim, M. J., Yang, Y., Kim, J. W., Yeom, Y. I., and Lim, J. S. (2009a). Suppression of NF-kappaB activity by NDRG2 expression attenuates the invasive potential of highly malignant tumor cells. *Carcinogenesis* **30**, 927-36.
- Kim, J. H., Shin, M. H., Kweon, S. S., Park, M. H., Yoon, J. H., Lee, J. S., Choi, C., Fackler, M. J., and Sukumar, S. (2010). Evaluation of promoter hypermethylation detection in serum as a diagnostic tool for breast carcinoma in Korean women. *Gynecol. Oncol.* **118**, 176-81.
- Kim, T. Y., Bang, Y. J., and Robertson, K. D. (2006). Histone deacetylase inhibitors for cancer therapy. *Epigenetics*. **1**, 14-23.
- Kim, Y. J., Yoon, S. Y., Kim, J. T., Choi, S. C., Lim, J. S., Kim, J. H., Song, E. Y., Lee, H. G., Choi, I., and Kim, J. W. (2009b). NDRG2 suppresses cell proliferation through down-regulation of AP-1 activity in human colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **124**, 7-15.
- Kleinman, H. K., and Martin, G. R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 378-86.
- Kloten, V., Becker, B., Winner, K., Schrauder, M. G., Fasching, P. A., Anzeneder, T., Veeck, J., Hartmann, A., Knuchel, R., and Dahl, E. (2013). Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Res.* **15**, R4.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **68**, 820-3.

- Kobayashi, H., Suzuki, M., Hirashima, Y., and Terao, T. (2003). The protease inhibitor bikunin, a novel anti-metastatic agent. *Biol. Chem.* **384**, 749-54.
- Koblinski, J. E., Kaplan-Singer, B. R., VanOsdol, S. J., Wu, M., Engbring, J. A., Wang, S., Goldsmith, C. M., Piper, J. T., Vostal, J. G., Harms, J. F., Welch, D. R., and Kleinman, H. K. (2005). Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis. *Cancer Res.* **65**, 7370-7.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**, 693-705.
- Kristiansen, G., Winzer, K. J., Mayordomo, E., Bellach, J., Schluns, K., Denkert, C., Dahl, E., Pilarsky, C., Altevogt, P., Guski, H., and Dietel, M. (2003). CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 4906-13.
- Kumar, S., Mohan, A., and Guleria, R. (2006). Biomarkers in cancer screening, research and detection: present and future: a review. *Biomarkers* **11**, 385-405.
- Kundu, T. K., and Rao, M. R. (1999). CpG islands in chromatin organization and gene expression. *J. Biochem.* **125**, 217-22.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Laird, P. W. (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 253-66.
- Lapidus, R. G., Nass, S. J., Butash, K. A., Parl, F. F., Weitzman, S. A., Graff, J. G., Herman, J. G., and Davidson, N. E. (1998). Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res.* **58**, 2515-9.
- LASFARGUES, E. Y., and OZZELLO, L. (1958). Cultivation of human breast carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **21**, 1131-47.
- Le, B. J., Xu, R., Lee, S. Y., Nelson, C. M., Rizki, A., Alcaraz, J., and Bissell, M. J. (2007). Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **313**, 3066-75.
- Lee, D. C., Kang, Y. K., Kim, W. H., Jang, Y. J., Kim, D. J., Park, I. Y., Sohn, B. H., Sohn, H. A., Lee, H. G., Lim, J. S., Kim, J. W., Song, E. Y., Kim, D. M., Lee, M. N., Oh, G. T., Kim, S. J., Park, K. C., Yoo, H. S., Choi, J. Y., and Yeom, Y. I. (2008). Functional and clinical evidence for NDRG2 as a candidate suppressor of liver cancer metastasis. *Cancer Res.* **68**, 4210-20.
- Lehmann, U., Langer, F., Feist, H., Glockner, S., Hasemeier, B., and Kreipe, H. (2002). Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am. J. Pathol.* **160**, 605-12.
- Lehtinen, L., Vainio, P., Wikman, H., Reemts, J., Hilvo, M., Issa, R., Pollari, S., Brandt, B., Oresic, M., Pantel, K., Kallioniemi, O., and Iljin, K. (2012). 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase associates with poor prognosis in breast cancer, induces epithelial-mesenchymal transition, and promotes cell migration in cultured breast cancer cells. *J. Pathol.* **226**, 674-86.
- Leon, S. A., Shapiro, B., Sklaroff, D. M., and Yaros, M. J. (1977). Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37**, 646-50.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**, 323-31.

- Li, S., Couet, J., and Lisanti, M. P. (1996). Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 29182-90.
- Li, S. J., Wang, W. Y., Li, B., Chen, B., Zhang, B., Wang, X., Chen, C. S., Zhao, Q. C., Shi, H., and Yao, L. (2013). Expression of NDRG2 in human lung cancer and its correlation with prognosis. *Med. Oncol.* **30**, 421.
- Li, W., Chu, D., Chu, X., Meng, F., Wei, D., Li, H., and Sun, B. (2011). Decreased expression of NDRG2 is related to poor overall survival in patients with glioma. *J. Clin. Neurosci.* **18**, 1534-7.
- Lichter, P. (2008). The role of epigenetics in carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **123**, ix.
- Lin, Y., Dong, C., and Zhou, B. P. (2013). Epigenetic Regulation of EMT: The Snail Story. *Curr. Pharm. Des.*
- Liu, N., Wang, L., Liu, X., Yang, Q., Zhang, J., Zhang, W., Wu, Y., Shen, L., Zhang, Y., Yang, A., Han, H., Zhang, J., and Yao, L. (2007). Promoter methylation, mutation, and genomic deletion are involved in the decreased NDRG2 expression levels in several cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 164-9.
- Liu, S., Yang, P., Kang, H., Lu, L., Zhang, Y., Pan, J., and Rui, Y. C. (2010). NDRG2 induced by oxidized LDL in macrophages antagonizes growth factor productions via selectively inhibiting ERK activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 106-13.
- Lo, P. K., and Sukumar, S. (2008). Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics.* **9**, 1879-902.
- Lombaerts, M., van, W. T., Philippo, K., Dierssen, J. W., Zimmerman, R. M., Oosting, J., van, E. R., Eilers, P. H., van de Water, B., Cornelisse, C. J., and Cleton-Jansen, A. M. (2006). E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br. J. Cancer* **94**, 661-71.
- Lorentzen, A., Lewinsky, R. H., Bornholdt, J., Vogel, L. K., and Mitchelmore, C. (2011). Expression profile of the N-myc Downstream Regulated Gene 2 (NDRG2) in human cancers with focus on breast cancer. *BMC. Cancer* **11**, 14.
- Lorentzen, A., Vogel, L. K., Lewinsky, R. H., Saebo, M., Skjelbred, C. F., Godiksen, S., Hoff, G., Tveit, K. M., Lothe, I. M., Ikdahl, T., Kure, E. H., and Mitchelmore, C. (2007). Expression of NDRG2 is down-regulated in high-risk adenomas and colorectal carcinoma. *BMC. Cancer* **7**, 192.
- Lusis, E. A., Watson, M. A., Chicoine, M. R., Lyman, M., Roerig, P., Reifenberger, G., Gutmann, D. H., and Perry, A. (2005). Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Res.* **65**, 7121-6.
- Lüllmann-Rauch, R (2003), Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen. Thieme.
- Lux, A., Attisano, L., Marchuk, D.A. (1999). Assignment of Transforming Growth Factor β 1 and β 3 and a Third New Ligand to the Type I Receptor ALK-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 9984-9992.
- Ma, J., Jin, H., Wang, H., Yuan, J., Bao, T., Jiang, X., Zhang, W., Zhao, H., and Yao, L. (2008). Expression of NDRG2 in clear cell renal cell carcinoma. *Biol. Pharm. Bull.* **31**, 1316-20.

- Ma, J., Liu, W., Yan, X., Wang, Q., Zhao, Q., Xue, Y., Ren, H., Wu, L., Cheng, Y., Li, S., Miao, L., Yao, L., and Zhang, J. (2012). Inhibition of endothelial cell proliferation and tumor angiogenesis by up-regulating NDRG2 expression in breast cancer cells. *PLoS. One.* **7**, e32368.
- Ma, J. J., Liao, C. G., Jiang, X., Zhao, H. D., Yao, L. B., and Bao, T. Y. (2010). NDRG2 suppresses the proliferation of clear cell renal cell carcinoma cell A-498. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 103.
- Madan, R., Smolkin, M. B., Cocker, R., Fayyad, R., and Oktay, M. H. (2006). Focal adhesion proteins as markers of malignant transformation and prognostic indicators in breast carcinoma. *Hum. Pathol.* **37**, 9-15.
- Mallon, E., Osin, P., Nasiri, N., Blain, I., Howard, B., and Gusterson, B. (2000). The basic pathology of human breast cancer. *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia.* **5**, 139-63.
- Mandelson, M. T., Oestreicher, N., Porter, P. L., White, D., Finder, C. A., Taplin, S. H., and White, E. (2000). Breast density as a predictor of mammographic detection: comparison of interval- and screen-detected cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1081-7.
- Maniotis, A. J., Chen, C. S., and Ingber, D. E. (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 849-54.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J., and Hanski, C. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 1603-8.
- Mansour, E. G., Ravdin, P. M., and Dressler, L. (1994). Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer* **74**, 381-400.
- Massague, J. (2012). TGFbeta signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 616-30.
- Matsuo, K., Silke, J., Gramatikoff, K., and Schaffner, W. (1994). The CpG-specific methylase SssI has topoisomerase activity in the presence of Mg²⁺. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5354-9.
- McCormack, V. A., and dos, S. S., I (2006). Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**, 1159-69.
- McKinlay, S. M., Bifano, N. L., and McKinlay, J. B. (1985). Smoking and age at menopause in women. *Ann. Intern. Med.* **103**, 350-6.
- Merlo, L. M., Pepper, J. W., Reid, B. J., and Maley, C. C. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 924-35.
- Minucci, S., and Pelicci, P. G. (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 38-51.
- Miotti, S., Tomassetti, A., Facetti, I., Sanna, E., Berno, V., and Canevari, S. (2005). Simultaneous expression of caveolin-1 and E-cadherin in ovarian carcinoma cells stabilizes adherens junctions through inhibition of src-related kinases. *Am. J. Pathol.* **167**, 1411-27.
- Mitchelmore, C., Buchmann-Moller, S., Rask, L., West, M. J., Troncoso, J. C., and Jensen, N. A. (2004). NDRG2: a novel Alzheimer's disease associated protein. *Neurobiol. Dis.* **16**, 48-58.

- Mittempergher, L., Saghatchian, M., Wolf, D. M., Michiels, S., Canisius, S., Dessen, P., Delaloge, S., Lazar, V., Benz, S. C., Tursz, T., Bernards, R., and Van't Veer, L. J. (2013). A gene signature for late distant metastasis in breast cancer identifies a potential mechanism of late recurrences. *Mol. Oncol.*
- Momparler, R. L., and Bovenzi, V. (2000). DNA methylation and cancer. *J. Cell Physiol* **183**, 145-54.
- Mordalska, A., Latek, J., Ferenc, T., Pomorski, L., Galecka, E., Zygmunt, A., and Lewinski, A. (2010). Evaluation of NDRG2 gene expression in primary papillary thyroid carcinoma and in metastases of this neoplasm to regional lymph nodes. *Thyroid Res.* **3**, 6.
- Moreno-Bueno, G., Portillo, F., and Cano, A. (2008). Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* **27**, 6958-69.
- Morrison, T. B., Weis, J. J., and Wittwer, C. T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**, 954-8, 960, 962.
- Mostoslavsky, R., and Bergman, Y. (1997). DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system. *Biochim. Biophys. Acta* **1333**, F29-F50.
- Mukhtar, T. K., Yeates, D. R., and Goldacre, M. J. (2013). Breast cancer mortality trends in England and the assessment of the effectiveness of mammography screening: population-based study. *J. R. Soc. Med.* **106**, 234-42.
- Muller, H. M., Widschwendter, A., Fiegl, H., Ivarsson, L., Goebel, G., Perkmann, E., Marth, C., and Widschwendter, M. (2003). DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res.* **63**, 7641-5.
- Munger, J. S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M. J., Dalton, S. L., Wu, J., Pittet, J. F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M. A., Rifkin, D. B., and Sheppard, D. (1999). The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**, 319-28.
- Murray, J. T., Campbell, D. G., Morrice, N., Auld, G. C., Shpiro, N., Marquez, R., Peggie, M., Bain, J., Bloomberg, G. B., Grahammer, F., Lang, F., Wulff, P., Kuhl, D., and Cohen, P. (2004). Exploitation of KESTREL to identify NDRG family members as physiological substrates for SGK1 and GSK3. *Biochem. J.* **384**, 477-88.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-9.
- Newman, B., Austin, M. A., Lee, M., and King, M. C. (1988). Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**, 3044-8.
- Nicholson, R. I., and Johnston, S. R. (2005). Endocrine therapy--current benefits and limitations. *Breast Cancer Res. Treat.* **93 Suppl 1**, S3-10.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**, 23-8.
- Odum, L., Andersen, C. Y., and Jessen, T. E. (2002). Characterization of the coupling activity for the binding of inter-alpha-trypsin inhibitor to hyaluronan in human and bovine follicular fluid. *Reproduction.* **124**, 249-57.

- Ogino, S., Kawasaki, T., Brahmandam, M., Cantor, M., Kirkner, G. J., Spiegelman, D., Makrigiorgos, G. M., Weisenberger, D. J., Laird, P. W., Loda, M., and Fuchs, C. S. (2006). Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time PCR (MethyLight) for quantitative DNA methylation analysis. *J. Mol. Diagn.* **8**, 209-17.
- Oh, S. S., Kim, D., Kim, D. H., Chang, H. H., Sohn, K. C., Kim, K. H., Jung, S. H., Lee, B. K., Kim, J. H., and Kim, K. D. (2012). NDRG2 correlated with favorable recurrence-free survival inhibits metastasis of mouse breast cancer cells via attenuation of active TGF-beta production. *Carcinogenesis* **33**, 1882-8.
- Oing, C., Jost, E., Dahl, E., Wilop, S., Brummendorf, T. H., and Galm, O. (2011). Aberrant DNA hypermethylation of the ITIH5 tumor suppressor gene in acute myeloid leukemia. *Clin. Epigenetics.* **2**, 419-23.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**, 247-57.
- Okitsu, C. Y., and Hsieh, C. L. (2007). DNA methylation dictates histone H3K4 methylation. *Mol. Cell Biol.* **27**, 2746-57.
- Okuda, T., Higashi, Y., Kokame, K., Tanaka, C., Kondoh, H., and Miyata, T. (2004). Ndr1-deficient mice exhibit a progressive demyelinating disorder of peripheral nerves. *Mol. Cell Biol.* **24**, 3949-56.
- Okuda, T., and Kondoh, H. (1999). Identification of new genes ndr2 and ndr3 which are related to Ndr1/RTP/Dr1 but show distinct tissue specificity and response to N-myc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 208-15.
- Ottaviano, Y. L., Issa, J. P., Parl, F. F., Smith, H. S., Baylin, S. B., and Davidson, N. E. (1994). Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **54**, 2552-5.
- Paris, S., Sesboue, R., Delpech, B., Chauzy, C., Thiberville, L., Martin, J. P., Frebourg, T., and Diarra-Mehrpour, M. (2002). Inhibition of tumor growth and metastatic spreading by overexpression of inter-alpha-trypsin inhibitor family chains. *Int. J. Cancer* **97**, 615-20.
- Park, S. Y., Kwon, H. J., Choi, Y., Lee, H. E., Kim, S. W., Kim, J. H., Kim, I. A., Jung, N., Cho, N. Y., and Kang, G. H. (2012). Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Mod. Pathol.* **25**, 185-96.
- Patani, N., Martin, L. A., Reis-Filho, J. S., and Dowsett, M. (2012). The role of caveolin-1 in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **131**, 1-15.
- Pepe, M. S., Etzioni, R., Feng, Z., Potter, J. D., Thompson, M. L., Thornquist, M., Winget, M., and Yasui, Y. (2001). Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 1054-61.
- Pepe, M. S., and Feng, Z. (2011). Improving biomarker identification with better designs and reporting. *Clin. Chem.* **57**, 1093-5.
- Pepe, M. S., Feng, Z., Janes, H., Bossuyt, P. M., and Potter, J. D. (2008). Pivotal evaluation of the accuracy of a biomarker used for classification or prediction: standards for study design. *J. Natl. Cancer Inst.* **100**, 1432-8.

- Perkins, G. L., Slater, E. D., Sanders, G. K., and Prichard, J. G. (2003). Serum tumor markers. *Am. Fam. Physician* **68**, 1075-82.
- Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-52.
- Piepoli, A., Cotugno, R., Merla, G., Gentile, A., Augello, B., Quitadamo, M., Merla, A., Panza, A., Carella, M., Maglietta, R., D'Addabbo, A., Ancona, N., Fusilli, S., Perri, F., and Andriulli, A. (2009). Promoter methylation correlates with reduced NDRG2 expression in advanced colon tumour. *BMC. Med. Genomics* **2**, 11.
- Place, A. T., Chen, Z., Bakhshi, F. R., Liu, G., O'Bryan, J. P., and Minshall, R. D. (2011). Cooperative role of caveolin-1 and C-terminal Src kinase binding protein in C-terminal Src kinase-mediated negative regulation of c-Src. *Mol. Pharmacol.* **80**, 665-72.
- Plass, C. (2002). Cancer epigenomics. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2479-88.
- Qu, X., Zhai, Y., Wei, H., Zhang, C., Xing, G., Yu, Y., and He, F. (2002). Characterization and expression of three novel differentiation-related genes belong to the human NDRG gene family. *Mol. Cell Biochem.* **229**, 35-44.
- Radpour, R., Barekati, Z., Kohler, C., Lv, Q., Burki, N., Diesch, C., Bitzer, J., Zheng, H., Schmid, S., and Zhong, X. Y. (2011). Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS. One.* **6**, e16080.
- Rao, T. P., and Kuhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ. Res.* **106**, 1798-806.
- Ravdin, P. M., and Chamness, G. C. (1995). The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review. *Gene* **159**, 19-27.
- Remmele, W., and Stegner, H. E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe* **8**, 138-40.
- Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G. G., Rottem, S., and Razin, A. (1990). Cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of the gene coding for the CpG DNA methylase from Spiroplasma sp. strain MQ1(M.SssI). *Nucleic Acids Res.* **18**, 1145-52.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**, 105-11.
- Rideout, W. M., III, Coetzee, G. A., Olumi, A. F., and Jones, P. A. (1990). 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* **249**, 1288-90.
- Ringner, M., Fredlund, E., Hakkinen, J., Borg, A., and Staaf, J. (2011). GOBO: gene expression-based outcome for breast cancer online. *PLoS. One.* **6**, e17911.
- Rolan, P., Atkinson, A. J., Jr., and Lesko, L. J. (2003). Use of biomarkers from drug discovery through clinical practice: report of the Ninth European Federation of Pharmaceutical Sciences Conference on Optimizing Drug Development. *Clin. Pharmacol. Ther.* **73**, 284-91.

- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., and Nyren, P. (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* **242**, 84-9.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., and Nyren, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**, 363, 365.
- Rose, M. (2013). Identifizierung und Validierung neuer DNA-Methylierungsbiomarker zur Früherkennung von Harnblasentumoren sowie Charakterisierung des putativen Tumorsuppressorgens ITIH5 für das Harnblasen- und Mammakarzinom. *Diss. Aachen*. RWTH Aachen University.
- Roux-Dosseto, M., Romain, S., Dussault, N., Desideri, C., Piana, L., Bonnier, P., Tubiana, N., and Martin, P. M. (1992). c-myc gene amplification in selected node-negative breast cancer patients correlates with high rate of early relapse. *Eur. J. Cancer* **28A**, 1600-4.
- Roylance, R., Gorman, P., Harris, W., Liebmann, R., Barnes, D., Hanby, A., and Sheer, D. (1999). Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res.* **59**, 1433-6.
- Ruffell, B., and Johnson, P. (2008). Hyaluronan induces cell death in activated T cells through CD44. *J. Immunol.* **181**, 7044-54.
- Rugg, M. S., Willis, A. C., Mukhopadhyay, D., Hascall, V. C., Fries, E., Fulop, C., Milner, C. M., and Day, A. J. (2005). Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **280**, 25674-86.
- Russo, J., Yang, X., Hu, Y. F., Bove, B. A., Huang, Y., Silva, I. D., Tahin, Q., Wu, Y., Higgy, N., Zekri, A., and Russo, I. H. (1998). Biological and molecular basis of human breast cancer. *Front Biosci.* **3**, D944-D960.
- Sager, R. (1985). Genetic suppression of tumor formation. *Adv. Cancer Res.* **44**, 43-68.
- Sahai, E. (2005). Mechanisms of cancer cell invasion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 87-96.
- Salier, J. P. (1990). Inter-alpha-trypsin inhibitor: emergence of a family within the Kunitz-type protease inhibitor superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 435-9.
- Salier, J. P., Rouet, P., Raguenez, G., and Daveau, M. (1996). The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem. J.* **315 (Pt 1)**, 1-9.
- Sanggaard, K. W., Karring, H., Valnickova, Z., Thogersen, I. B., and Enghild, J. J. (2005). The TSG-6 and I alpha I interaction promotes a transesterification cleaving the protein-glycosaminoglycan-protein (PGP) cross-link. *J. Biol. Chem.* **280**, 11936-42.
- Santi, D. V., Norment, A., and Garrett, C. E. (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 6993-7.
- Sanz-Rodriguez, F., Guerrero-Esteo, M., Botella, L. M., Banville, D., Vary, C. P., and Bernabeu, C. (2004). Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J. Biol. Chem.* **279**, 32858-68.

- Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 1412-7.
- Sharma, G., Mirza, S., Parshad, R., Srivastava, A., Gupta, S. D., Pandya, P., and Ralhan, R. (2010). Clinical significance of promoter hypermethylation of DNA repair genes in tumor and serum DNA in invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci.* **87**, 83-91.
- Shaw, K. J., Thain, L., Docker, P. T., Dyer, C. E., Greenman, J., Greenway, G. M., and Haswell, S. J. (2009). The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths. *Anal. Chim. Acta* **652**, 231-3.
- Shimono, A., Okuda, T., and Kondoh, H. (1999). N-myc-dependent repression of *ndr1*, a gene identified by direct subtraction of whole mouse embryo cDNAs between wild type and N-myc mutant. *Mech. Dev.* **83**, 39-52.
- Shon, S. K., Kim, A., Kim, J. Y., Kim, K. I., Yang, Y., and Lim, J. S. (2009). Bone morphogenetic protein-4 induced by NDRG2 expression inhibits MMP-9 activity in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **385**, 198-203.
- Simon, R., Lam, A., Li, M. C., Ngan, M., Menenzes, S., and Zhao, Y. (2007). Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform.* **3**, 11-7.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-82.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A., and . (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244**, 707-12.
- Song, S. P., Zhang, S. B., Liu, R., Yao, L., Hao, Y. Q., Liao, M. M., Zhang, Y. D., and Li, Z. H. (2012). NDRG2 down-regulation and CD24 up-regulation promote tumor aggravation and poor survival in patients with gallbladder carcinoma. *Med. Oncol.* **29**, 1879-85.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lonning, P. E., and Borresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 10869-74.
- Stavik, B., Skretting, G., Aasheim, H. C., Tinholt, M., Zernichow, L., Sletten, M., Sandset, P. M., and Iversen, N. (2011). Downregulation of TFPI in breast cancer cells induces tyrosine phosphorylation signaling and increases metastatic growth by stimulating cell motility. *BMC. Cancer* **11**, 357.
- Strachan, T., and Read, A. P. (1999).
- Strahl, B. D., and Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5.
- Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Lefort, F., Rossier, A., Chen, X. Q., and Anker, P. (2000). The origin and mechanism of circulating DNA. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **906**, 161-8.

- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., and Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 15545-50.
- Summy, J. M., and Gallick, G. E. (2003). Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* **22**, 337-58.
- Suzuki, H., Toyota, M., Carraway, H., Gabrielson, E., Ohmura, T., Fujikane, T., Nishikawa, N., Sogabe, Y., Nojima, M., Sonoda, T., Mori, M., Hirata, K., Imai, K., Shinomura, Y., Baylin, S. B., and Tokino, T. (2008). Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br. J. Cancer* **98**, 1147-56.
- Taback, B., Giuliano, A. E., Lai, R., Hansen, N., Singer, F. R., Pantel, K., and Hoon, D. S. (2006). Epigenetic analysis of body fluids and tumor tissues: application of a comprehensive molecular assessment for early-stage breast cancer patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1075**, 211-21.
- Takai, D., and Jones, P. A. (2002). Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 3740-5.
- Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I., and Kunkel, H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest* **45**, 1732-40.
- Tavassoli, F. A. (1992). Classification of metaplastic carcinomas of the breast. *Pathol. Annu.* **27 Pt 2**, 89-119.
- Taylor, M. A., Lee, Y. H., and Schiemann, W. P. (2011). Role of TGF-beta and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis. *Gene Expr.* **15**, 117-32.
- Tepel, M., Roerig, P., Wolter, M., Gutmann, D. H., Perry, A., Reifenberger, G., and Riemenschneider, M. J. (2008). Frequent promoter hypermethylation and transcriptional downregulation of the NDRG2 gene at 14q11.2 in primary glioblastoma. *Int. J. Cancer* **123**, 2080-6.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**, 422-6.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 442-54.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., and Pfaffl, M. W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res.* **31**, e122.
- Timpl, R., and Dziadek, M. (1986). Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* **29**, 1-112.
- Tost, J., Dunker, J., and Gut, I. G. (2003). Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques* **35**, 152-6.
- Trimmer, C., Whitaker-Menezes, D., Bonuccelli, G., Milliman, J. N., Daumer, K. M., Aplin, A. E., Pestell, R. G., Sotgia, F., Lisanti, M. P., and Capozza, F. (2010). CAV1 inhibits metastatic potential in melanomas through suppression of the integrin/Src/FAK signaling pathway. *Cancer Res.* **70**, 7489-99.

- Tuckwell, D. (1999). Evolution of von Willebrand factor A (VWA) domains. *Biochem. Soc. Trans.* **27**, 835-40.
- Turker, M. S. (1999). The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Semin. Cancer Biol.* **9**, 329-37.
- Umbricht, C. B., Evron, E., Gabrielson, E., Ferguson, A., Marks, J., and Sukumar, S. (2001). Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene* **20**, 3348-53.
- Valgardsdottir, R., Tryggvadottir, L., Steinarsdottir, M., Olafsdottir, K., Jonasdottir, S., Jonasson, J. G., Ogmundsdottir, H. M., and Eyfjord, J. E. (1997). Genomic instability and poor prognosis associated with abnormal TP53 in breast carcinomas. Molecular and immunohistochemical analysis. *APMIS* **105**, 121-30.
- Van, D., V, Speeckaert, R., Van, G. D., Bracke, M., De, N. W., Delanghe, J., and Speeckaert, M. (2012). DNA methylation-based biomarkers in serum of patients with breast cancer. *Mutat. Res.*
- Van, d. A., I, Elst, H. J., Van Laere, S. J., Maes, H., Huget, P., van, D. P., Van Marck, E. A., Vermeulen, P. B., and Dirix, L. Y. (2009). The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *Br. J. Cancer* **100**, 1277-86.
- Vanhaecke, T., Papeleu, P., Elaut, G., and Rogiers, V. (2004). Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1629-43.
- Veeck, J., Bektas, N., Hartmann, A., Kristiansen, G., Heindrichs, U., Knuchel, R., and Dahl, E. (2008a). Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. *Breast Cancer Res.* **10**, R82.
- Veeck, J., Chorovicer, M., Naami, A., Breuer, E., Zafrakas, M., Bektas, N., Durst, M., Kristiansen, G., Wild, P. J., Hartmann, A., Knuechel, R., and Dahl, E. (2008b). The extracellular matrix protein ITIH5 is a novel prognostic marker in invasive node-negative breast cancer and its aberrant expression is caused by promoter hypermethylation. *Oncogene* **27**, 865-76.
- Veeck, J., and Dahl, E. (2012). Targeting the Wnt pathway in cancer: the emerging role of Dickkopf-3. *Biochim. Biophys. Acta* **1825**, 18-28.
- Veeck, J., Geisler, C., Noetzel, E., Alkaya, S., Hartmann, A., Knuchel, R., and Dahl, E. (2008c). Epigenetic inactivation of the secreted frizzled-related protein-5 (SFRP5) gene in human breast cancer is associated with unfavorable prognosis. *Carcinogenesis* **29**, 991-8.
- Veeck, J., Niederacher, D., An, H., Klopocki, E., Wiesmann, F., Betz, B., Galm, O., Camara, O., Durst, M., Kristiansen, G., Huszka, C., Knuchel, R., and Dahl, E. (2006). Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* **25**, 3479-88.
- Veeck, J., Noetzel, E., Bektas, N., Jost, E., Hartmann, A., Knuchel, R., and Dahl, E. (2008d). Promoter hypermethylation of the SFRP2 gene is a high-frequent alteration and tumor-specific epigenetic marker in human breast cancer. *Mol. Cancer* **7**, 83.
- Vona-Davis, L., and Rose, D. P. (2007). Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr. Relat Cancer* **14**, 189-206.

- Wagener, C., and Müller, O. (2010). Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte. *Georg Thieme Verlag KG*. **3. Auflage.**
- Wagner, U. G., Hasslacher, M., Griengl, H., Schwab, H., and Kratky, C. (1996). Mechanism of cyanogenesis: the crystal structure of hydroxynitrile lyase from *Hevea brasiliensis*. *Structure*. **4**, 811-22.
- Wang, H., Wang, W., Wang, X., Cai, K., Wu, H., Ju, Q., Huang, Z., and Gao, X. (2012). Reduced N-Myc downstream-regulated gene 2 expression is associated with CD24 upregulation and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Med. Oncol.* **29**, 3162-8.
- Wang, M., Zhao, D., Spinetti, G., Zhang, J., Jiang, L. Q., Pintus, G., Monticone, R., and Lakatta, E. G. (2006). Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1503-9.
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 457-66.
- Wellings, S. R., Jensen, H. M., and Marcum, R. G. (1975). An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* **55**, 231-73.
- Werbowetski-Ogilvie, T. E., Agar, N. Y., Waldkircher de Oliveira, R. M., Faury, D., Antel, J. P., Jabado, N., and Del Maestro, R. F. (2006). Isolation of a natural inhibitor of human malignant glial cell invasion: inter alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2. *Cancer Res.* **66**, 1464-72.
- Widschwendter, M., Siegmund, K. D., Muller, H. M., Fiegl, H., Marth, C., Muller-Holzner, E., Jones, P. A., and Laird, P. W. (2004). Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res.* **64**, 3807-13.
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., and Rasmussen, R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22**, 130-8.
- Wu, P., Wang, X., Li, F., Qi, B., Zhu, H., Liu, S., Cui, Y., and Chen, J. (2008). Growth suppression of MCF-7 cancer cell-derived xenografts in nude mice by caveolin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376**, 215-20.
- Xie, B., Zhao, J., Kitagawa, M., Durbin, J., Madri, J. A., Guan, J. L., and Fu, X. Y. (2001). Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J. Biol. Chem.* **276**, 19512-23.
- Xue, C., Plieth, D., Venkov, C., Xu, C., and Neilson, E. G. (2003). The gatekeeper effect of epithelial-mesenchymal transition regulates the frequency of breast cancer metastasis. *Cancer Res.* **63**, 3386-94.
- Yan, P. S., Shi, H., Rahmatpanah, F., Hsiao, T. H., Hsiao, A. H., Leu, Y. W., Liu, J. C., and Huang, T. H. (2003). Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer. *Cancer Res.* **63**, 6178-86.
- Yan, P. S., Venkataramu, C., Ibrahim, A., Liu, J. C., Shen, R. Z., Diaz, N. M., Centeno, B., Weber, F., Leu, Y. W., Shapiro, C. L., Eng, C., Yeatman, T. J., and Huang, T. H. (2006). Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin. Cancer Res.* **12**, 6626-36.

- Yang, J., and Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev. Cell* **14**, 818-29.
- Yang, X., Pursell, B., Lu, S., Chang, T. K., and Mercurio, A. M. (2009). Regulation of beta 4-integrin expression by epigenetic modifications in the mammary gland and during the epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* **122**, 2473-80.
- Yang, X., Yan, L., and Davidson, N. E. (2001). DNA methylation in breast cancer. *Endocr. Relat Cancer* **8**, 115-27.
- Yoneda, M., Suzuki, S., and Kimata, K. (1990). Hyaluronic acid associated with the surfaces of cultured fibroblasts is linked to a serum-derived 85-kDa protein. *J. Biol. Chem.* **265**, 5247-57.
- Yu, C., Wu, G., Dang, N., Zhang, W., Zhang, R., Yan, W., Zhao, Y., Gao, L., Wang, Y., Beckwith, N., Yuan, J., and Yao, L. (2011). Inhibition of N-myc downstream-regulated gene 2 in prostatic carcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **12**, 304-13.
- Zhang, L., Wang, D., Jiang, W., Edwards, D., Qiu, W., Barroilhet, L. M., Rho, J. H., Jin, L., Seethappan, V., Vitonis, A., Wang, J., Mok, S. C., Crum, C., Cramer, D. W., and Ye, B. (2010). Activated networking of platelet activating factor receptor and FAK/STAT1 induces malignant potential in BRCA1-mutant at-risk ovarian epithelium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **8**, 74.
- Zhao, M., Yoneda, M., Ohashi, Y., Kurono, S., Iwata, H., Ohnuki, Y., and Kimata, K. (1995). Evidence for the covalent binding of SHAP, heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor, to hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **270**, 26657-63.
- Zheng, J., Li, Y., Yang, J., Liu, Q., Shi, M., Zhang, R., Shi, H., Ren, Q., Ma, J., Guo, H., Tao, Y., Xue, Y., Jiang, N., Yao, L., and Liu, W. (2011). NDRG2 inhibits hepatocellular carcinoma adhesion, migration and invasion by regulating CD24 expression. *BMC. Cancer* **11**, 251-9.
- Zheng, J., Liu, Q., Li, Y., Yang, J., Ma, J., Yu, F., Shi, H., Ren, Q., Zhang, R., Zhang, J., Xue, Y., Tao, Y., Jiang, N., Guo, H., Yao, L., and Liu, W. (2010). NDRG2 expression regulates CD24 and metastatic potential of breast cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **11**, 1817-21.
- Zhu, H., Lei, X., Feng, J., and Wang, Y. (2012). Oral contraceptive use and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care* **17**, 402-14.
- Zhuo, L., Hascall, V. C., and Kimata, K. (2004). Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J. Biol. Chem.* **279**, 38079-82.
- Zhuo, L., and Kimata, K. (2008). Structure and function of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains. *Connect. Tissue Res.* **49**, 311-20.
- Zweig, M. H., and Campbell, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin. Chem.* **39**, 561-77.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------------------|---|----|
| <u>Abbildung 1-1:</u> | Schematische Darstellung der weiblichen Brustanatomie | 2 |
| <u>Abbildung 1-2:</u> | Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen aller Krebs- Neuerkrankungen in Deutschland 2012 | 3 |
| <u>Abbildung 1-3:</u> | Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinoms..... | 5 |
| <u>Abbildung 1-4:</u> | Stilllegung der Genexpression durch die Interaktion von DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen innerhalb der Tumorgenese | 13 |
| <u>Abbildung 1-5:</u> | Das Hypermethylierungs-Profil von CpG-Inseln relevanter Tumorsuppressorgene in humanen Krebsentitäten | 16 |
| <u>Abbildung 1-6:</u> | Schematische Darstellung der genomischen Organisation und Domänen Struktur des <i>ITIH5</i> -Gens | 25 |
| <u>Abbildung 2-1:</u> | Übersicht des in dieser Studie analysierten Serumkollektivs | 33 |
| <u>Abbildung 2-2:</u> | Schematische Darstellung des typischen Kurvenverlaufs einer <i>Real-time</i> PCR..... | 46 |
| <u>Abbildung 2-3:</u> | Die Bisulfit-vermittelte Umwandlung von Cytosin zu Uracil verläuft in drei Schritten | 47 |
| <u>Abbildung 2-4:</u> | Prinzip der Sequenzänderung durch die Bisulfit-Konversion und die MSP | 49 |
| <u>Abbildung 2-5:</u> | Schematischer Reaktionsablauf einer Pyrosequenzierung | 56 |
| <u>Abbildung 2-6:</u> | Schematische Darstellung des Phagemid-Vektor pBK-CMV | 66 |
| <u>Abbildung 2-7:</u> | MCS (<i>Multi Cloning Site</i>) des Vektors pBK CMV mit klonierter Vollängen- <i>ITIH5</i> - cDNA..... | 67 |
| <u>Abbildung 3-1:</u> | Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse eingesetzter MSP-Assays der Kandidatengene | 77 |
| <u>Abbildung 3-2:</u> | Methylierungsanalysen der Kandidatengene <i>WIF1</i> , <i>DKK3</i> und <i>ITIH5</i> in Gewebe- DNA und der zugehörigen Serum-cfDNA derselben Patientin | 78 |
| <u>Abbildung 3-3:</u> | Darstellung der Sensitivitäts- und Spezifitätsrate der kombinierten <i>ITIH5</i> - und <i>DKK3</i> -Methylierung im Testkollektiv..... | 81 |
| <u>Abbildung 3-4:</u> | Die <i>ITIH5</i> - und <i>DKK3</i> -basierte qMSP Analyse <i>in vitro</i> methylierter Leukozyten-Bis- DNA zeigt eine hohe analytische Leistungsfähigkeit..... | 83 |
| <u>Abbildung 3-5:</u> | Die <i>GAPDH</i> -basierte qMSP-Analyse der Verdünnungsreihe <i>in vitro</i> methylierter Leukozyten-Bis-DNA verdeutlicht die homogene Konzentration eingesetzter Bis- DNA einzelner Verdünnungsstufen..... | 84 |
| <u>Abbildung 3-6:</u> | Die für die Analyse der <i>DKK3</i> - und <i>ITIH5</i> -Methylierung eingesetzten Assays zeigen eine gute Reproduzierbarkeit mit einem stabilen Korrelationskoeffizienten | 85 |

| | | |
|------------------------|---|-----|
| <u>Abbildung 3-7:</u> | Die repräsentative <i>DKK3</i> -basierte qMSP Analyse in einem <i>Spiking</i> -Experiment zeigt eine Nachweisgrenze von 50 pg..... | 85 |
| <u>Abbildung 3-8:</u> | Biomarker-Effizienz der kombinierten <i>ITIH5</i> - und <i>DKK3</i> -Methylierung..... | 88 |
| <u>Abbildung 3-9:</u> | Die <i>RASSF1A</i> -basierte qMSP Analyse <i>in vitro</i> methylierter Leukozyten-Bis-DNA zeigt eine hohe analytische Leistungsfähigkeit..... | 90 |
| <u>Abbildung 3-10:</u> | Biomarker-Effizienz der <i>RASSF1A</i> -Methylierung..... | 91 |
| <u>Abbildung 3-11:</u> | Biomarker-Effizienz des <i>3-Gen-Panels</i> | 93 |
| <u>Abbildung 3-12:</u> | Das <i>ITIH5-DKK3</i> Biomarker-Duplett zeigt eine starke klinische Effizienz in prämenopausalen Frauen..... | 97 |
| <u>Abbildung 3-13:</u> | Die Generierung eines Zellkultur-basierten <i>gain-of-function</i> Tumormodells der Brust..... | 99 |
| <u>Abbildung 3-14:</u> | Die <i>ITIH5</i> -Proteinexpression in der stabil transfizierten humanen Mammakarzinom-Zelllinie BT20..... | 100 |
| <u>Abbildung 3-15:</u> | Einfluss der <i>ITIH5</i> -Reexpression auf die Zellproliferation humaner BT20-Mammakarzinomzellen..... | 102 |
| <u>Abbildung 3-16:</u> | Der Einfluss der <i>ITIH5</i> -Reexpression auf das Kolonienbildungsvermögen humaner BT20-Mammakarzinomzellen..... | 103 |
| <u>Abbildung 3-17:</u> | Der Einfluss von <i>ITIH5</i> auf die Adhärenz humaner BT20-Mammakarzinomzellen..... | 105 |
| <u>Abbildung 3-18:</u> | Das Migrationsverhalten von stabilen BT20-Klonen..... | 106 |
| <u>Abbildung 3-19:</u> | Repräsentative Darstellung des Migrationsverhaltens der stabilen BT20-Klone #6 und #7..... | 107 |
| <u>Abbildung 3-20:</u> | Genexpressionssignatur differenzieller <i>ITIH5</i> -assoziierter Zielgene in dem humanen Mammakarzinom-Modell BT20..... | 110 |
| <u>Abbildung 3-21:</u> | Genexpressionssignatur differenzieller <i>ITIH5</i> -assoziierter Zielgene in dem GO-Term „Extrazelluläre Region“..... | 113 |
| <u>Abbildung 3-22:</u> | Univariate und multivariate Überlebens-Analyse der 61-Kandidatengen-Expression des BT20-Tumormodells..... | 115 |
| <u>Abbildung 3-23:</u> | Univariate Überlebens-Analyse der Kandidatengen-Expression des BT20-Tumormodells..... | 116 |
| <u>Abbildung 3-24:</u> | Univariate Überlebens-Analyse der Kandidatengen-Expression des BT20-Tumormodells..... | 117 |
| <u>Abbildung 3-25:</u> | Genexpressionssignatur differenzieller <i>ITIH5</i> -assoziierter Zielgene in dem humanen Mammakarzinom-Modell MDA-MB-231..... | 119 |

| | |
|---|-----|
| <u>Abbildung 3-26</u> : Die Endoglin-Reexpression kann auch auf Proteinebene in den ITIH5-Klonen nachgewiesen werden..... | 122 |
| <u>Abbildung 3-27</u> : Die differenzielle Expression FAK/Src-assoziiierter Signaltransduktions-Moleküle in den ITIH5-Klonen..... | 124 |
| <u>Abbildung 3-28</u> : DNA-Methylierungsprofil der ausgewählten koexprimierten ITIH5-Zielgene <i>NDRG2</i> , <i>EHD3</i> und <i>Endoglin</i> | 125 |
| <u>Abbildung 3-29</u> : Methylierungsgrad der CpG-Dinukleotide im <i>NDRG2</i> -Promotor der MDA-MB-231-Zellklone..... | 127 |
| <u>Abbildung 3-30</u> : Die <i>NDRG2</i> -Reexpression korreliert mit einer <i>NDRG2</i> -Promotor-Demethylierun | 129 |
| <u>Abbildung 3-31</u> : Die <i>NDRG2</i> -Reexpresion in den ITIH5-Klonen findet auf RNA- und Proteinebene statt. | 130 |
| <u>Abbildung 3-32</u> : Die <i>NDRG2</i> -Expression geht im Brustkrebsgewebe verloren | 131 |
| <u>Abbildung 3-33</u> : Positive Korrelation zwischen der <i>ITIH5</i> - und der <i>NDRG2</i> -RNA-Expression in Mammakarzinomgeweben..... | 132 |
| <u>Abbildung 3- 34</u> : Univariate und multivariate Überlebens-Analyse der <i>NDRG2-ITIH5</i> -Expressionsachse..... | 135 |
| <u>Abbildung 3-35</u> : Der RNA-Interferenz induzierte <i>NDRG2</i> -mRNA-Expressionsverlust in den MDA-MB-231-Zellklonen ITIH5 #4 und #7 | 137 |
| <u>Abbildung 3-36</u> : Der RNA-Interferenz induzierte <i>NDRG2</i> -Proteinverlust in den MDA-MB-231-Zellklonen ITIH5 #4 und #7 | 138 |
| <u>Abbildung 3-37</u> : Einfluss des RNAi-induzierten <i>NDRG2</i> -Expressionsverlusts auf die Zellproliferation der MDA-MB-231-ITIH5-Klone #4 und #7..... | 139 |
| <u>Abbildung 3-38</u> : Grafische Darstellung des Migrationsverhalten von dem RNAi-behandelten MDA-MB-231-ITIH5-Klon #4 sowie dem unbehandelten Leerklon #2..... | 140 |
| <u>Abbildung 3-39</u> : Der <i>NDRG2</i> -defiziente MDA-MB-231-ITIH5-Klon #4 zeigt eine erhöhte Migrationsrate im Vergleich zu dem <i>NDRG2</i> -positiven ITIH5-Klon #4..... | 141 |
| <u>Abbildung 4-1</u> : Das hypothetische Modell des molekularen Wirkungsspektrums von ITIH5 in der Verbindung zwischen den fokalen Adhäsionskomplexen und der extrazellulären Matrix..... | 158 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|----------------------|--|----|
| <u>Tabelle 1-1:</u> | Tumor <i>Staging</i> nach der TNM-Klassifikation | 5 |
| <u>Tabelle 1-2:</u> | Subtypen Klassifizierung | 6 |
| <u>Tabelle 1-3:</u> | Zentrale hypermethylierte Tumorsuppressorgene im Brustkrebs | 17 |
| <u>Tabelle 1-4:</u> | Publizierte potentielle Brustkrebs Früherkennungs-Biomarker | 21 |
| <u>Tabelle 2-1:</u> | Verwendete Geräte | 34 |
| <u>Tabelle 2-2:</u> | Verwendete Software | 34 |
| <u>Tabelle 2-3:</u> | Verwendete Chemikalien | 35 |
| <u>Tabelle 2-4:</u> | Verwendete Lösungsmittel | 35 |
| <u>Tabelle 2-5:</u> | Verwendete Puffer und Lösungen | 36 |
| <u>Tabelle 2-6:</u> | Verwendete Zellkulturmedien | 37 |
| <u>Tabelle 2-7:</u> | Verwendete monoklonale und polyklonale Antikörper | 37 |
| <u>Tabelle 2-8:</u> | Verwendete molekularbiologische Kits | 38 |
| <u>Tabelle 2-9:</u> | Oligonukleotid-Sequenzen für die Pyrosequenzierung | 38 |
| <u>Tabelle 2-10:</u> | Oligonukleotid-Sequenzen für die MSP-Primer und MSP-Bedingungen | 39 |
| <u>Tabelle 2-11:</u> | Oligonukleotid-Sequenzen für die qMSP-Primer und qMSP-Bedingungen | 40 |
| <u>Tabelle 2-12:</u> | Sequenzen für die <i>Real-time</i> PCR und PCR-Bedingungen | 40 |
| <u>Tabelle 2-13:</u> | Sequenzen der verwendeten <i>NDRG2</i> -siRNA | 41 |
| <u>Tabelle 2-14:</u> | Standardansatz einer <i>Real-time</i> PCR | 45 |
| <u>Tabelle 2-15:</u> | Temperaturprofil einer <i>Real-time</i> PCR | 45 |
| <u>Tabelle 2-16:</u> | Standardansatz einer methylierungsspezifischen PCR | 50 |
| <u>Tabelle 2-17:</u> | Temperaturprofil einer methylierungsspezifischen PCR | 50 |
| <u>Tabelle 2-18:</u> | Standardansatz einer quantitativen methylierungsspezifischen PCR | 51 |
| <u>Tabelle 2-19:</u> | Temperaturprofil quantitativen methylierungsspezifischen PCR | 51 |
| <u>Tabelle 2-20:</u> | Standardansatz einer <i>in vitro</i> DNA-Methylierung | 53 |
| <u>Tabelle 2-21:</u> | Konzentrationen der eingesetzten Leukozyten-DNA für die Verdünnungsreihe ... | 54 |
| <u>Tabelle 2-22:</u> | Standardansatz einer Prä-Pyro-PCR | 57 |
| <u>Tabelle 2-23:</u> | Prä-PCR Standardprogramm für das Gen <i>NDRG2</i> | 58 |
| <u>Tabelle 2-24:</u> | Absteigende Alkoholreihe für die IHC | 60 |
| <u>Tabelle 2-25:</u> | Aufsteigende Alkoholreihe für die IHC | 61 |
| <u>Tabelle 2-26:</u> | Transfektions-Schema | 67 |
| <u>Tabelle 2-27:</u> | Titration-Schema | 68 |

| | |
|----------------------|--|
| <u>Tabelle 3-1:</u> | Frequenz der Serum- und Gewebe-DNA basierten Detektion ausgewählter Kandidatengene in 112 korrespondierenden Brustkrebsproben79 |
| <u>Tabelle 3-2:</u> | Korrelation des <i>DKK3</i> - und <i>ITIH5</i> -Methylierungsstatus in Gewebe- und Serum-DNA gepaarter Brustkrebsproben79 |
| <u>Tabelle 3-3:</u> | Sensitivität und Spezifität Serum-basierter Detektion von aberrant methylierten Genen im Testkollektiv80 |
| <u>Tabelle 3- 4:</u> | Effizienz der kombinierten <i>ITIH5</i> - und <i>DKK3</i> -Methylierung89 |
| <u>Tabelle 3-5:</u> | Effizienz der <i>RASSF1A</i> -Methylierung.....92 |
| <u>Tabelle 3-6:</u> | Sensitivität und Spezifität der Blut-basierten Detektion von Brustkrebs mit verschiedenen Marker-Kombinationen.....94 |
| <u>Tabelle 3-7:</u> | Assoziation der <i>DKK3</i> - und <i>ITIH5</i> -Methylierung in cfDNA mit der Tumorgroße.....95 |
| <u>Tabelle 3-8:</u> | Sensitivität und Spezifität der Blut-basierten Brustkrebs Detektion in prä- und postmenopausalen Patientinnen im Testkollektiv.....95 |
| <u>Tabelle 3- 9:</u> | Sensitivität und Spezifität der Blut-basierten Brustkrebs-Detektion in prä- und postmenopausalen Patientinnen im Validierungskollektiv96 |
| <u>Tabelle 3-10:</u> | Ausgewählte GO-Klassen mit den zugehörigen GO-Termini des BT20-Tumormodells innerhalb des gesamten <i>Microarray</i>112 |
| <u>Tabelle 3-11:</u> | Ausgewählte GO-Klassen mit den zugehörigen GO-Termini der 117 Genliste des MDA-MB-231-Tumormodells120 |
| <u>Tabelle 3-12:</u> | Ausgewählte GO-Klassen mit den zugehörigen GO-Begriffen des MDA-MB-231-Tumormodells innerhalb des gesamten <i>Microarray</i>121 |
| <u>Tabelle 3-13:</u> | Korrelation der mRNA-Expression von <i>ITIH5</i> und <i>NDRG2</i> in primären Mammakarzinomen132 |
| <u>Tabelle 3-14:</u> | Korrelation der Protein-Expression von <i>ITIH5</i> und <i>NDRG2</i> in primären Mammakarzinomen133 |
| <u>Tabelle 3-15:</u> | Die Assoziation der <i>NDRG2</i> - <i>ITIH5</i> -Expression zu den klinisch-pathologischen Parametern.134 |

A.1 KLASSIFIKATION MALIGNER TUMORE

A.1.1 STAGING DES MAMMAKARZINOMS

Das *Staging* des Mammakarzinoms erfolgt nach der aktuellen UICC-Klassifikation (Sobin und Wittekind 2002), wobei Tumorausdehnung (T), Lymphknotenbefall (Nodalstatus N) und Metastasen (M) berücksichtigt werden. Eine Übersicht geben Tabelle A.1-1 und A.1-2.

Tabelle A.1-1: TNM-Klassifikation des humanen Mammakarzinoms nach Sobin & Wittekind 2002

| Stadium (T) | Primärtumor |
|--------------------------|---|
| Tx | Primärtumor kann nicht beurteilt werden |
| T0 | kein Anhaltspunkt für einen Primärtumor |
| Tis | Carcinoma <i>in situ</i> |
| T1 | Tumor bis 2 cm in größter Ausdehnung |
| T1a | Tumor bis 0,5 cm |
| T1b | Tumor 0,5 - 1 cm |
| T1c | Tumor 1 - 2 cm |
| T2 | Tumor > 2 cm, aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung |
| T3 | Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung |
| T4 | Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut |
| T4a | mit Ausdehnung auf die Brustwand |
| T4b | mit Ödem, Ulzeration der Brusthaut oder Satellitenmetastasen der Haut |
| T4c | Kriterien 4a und 4b gemeinsam |
| T4d | inflammatorisches Karzinom |
| Nodalstatus (N) | |
| Nx | keine Beurteilung möglich |
| N0 | keine regionalen Lymphknotenmetastasen |
| N1 | Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten |
| N1a | nur Mikrometastasen, keine > 0,2 cm |
| N1b | Metastasen in Lymphknoten, zumindest eine > 0,2 cm |
| N1bI | Metastasen in 1 - 3 Lymphknoten, eine > 0,2 cm aber alle < 2 cm |
| N1bII | Metastasen in 4 oder mehr Lymphknoten, eine > 0,2 cm, aber alle < 2 cm |
| N1bIII | Ausdehnung der Metastasen über die Lymphknotenkapsel hinaus (alle < 2 cm) |
| N1bIV | Metastasen in Lymphknoten ≥ 2 cm in größter Ausdehnung |
| N2 | Metastasen in ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander fixiert |
| N3 | Metastasen in Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna |
| Fernmetastase (M) | |
| Mx | keine Beurteilung möglich |
| M0 | keine Fernmetastasen |
| M1 | Fernmetastasen vorhanden |

A.1.2 HISTOLOGISCHE GRADUIERUNG DES HUMANEN MAMMAKARZINOMS

Zusätzlich zur TNM-Klassifikation wird eine histopathologische Tumorgraduierung beschrieben. Hierbei werden die Kriterien Tubulusbildung, Kernpleomorphie und Mitoserate bestimmt (nach Elston & Ellis 1993) und der Malignitätsgrad des Tumors beurteilt.

Tabelle A.1-2: Histologische Graduierung des Mammakarzinoms

| Merkmal | Kriterium | Wert |
|-------------------|--------------|-------|
| Tubulusausbildung | 75% | 1 |
| | 10%-75% | 2 |
| | <10% | 3 |
| Kernpolymorphie | Gering | 1 |
| | Mittelgradig | 2 |
| | Stark | 3 |
| Mitoserate | 0-5/10 HPFa | 1 |
| | 6-11/10 HPFa | 2 |
| | ≥ 12/10 HPFa | 3 |
| Summenscore | | 3 - 9 |

aHPF: *High Power Field* (400-fache Vergrößerung)

A.1.3 AUSWERTESYSTEM DES HISTOLOGISCHEN SUMMENScores

Tabelle A.1-3: Auswertungssystem des histologischen Summenscores

| Summenscore | Malignitätsgrad | G-Gruppe | Definition |
|-------------|-----------------|----------|---------------------|
| 3,4,5 | Gering | G1 | Gut differenziert |
| 6,7 | Mäßig | G2 | Mäßig differenziert |
| 8,9 | Hoch | G3 | Entdifferenziert |

A.2 EIGENSCHAFTEN DER VERWENDETEN PATIENTEN-KOHORTE**Tabelle A.2-1: Klinisch-pathologische Parameter der Mammakarzinom-Patientinnen**

| Parameter | Testkollektiv (n ^a =112) | % | Validierungskollektiv (n ^a =138) | % | P- Wert ^b |
|---|--|------|--|------|-------------------------|
| Alter bei Diagnose | | | | | |
| Median | 60 Jahre (36-87) | | 63 Jahre (33-86) | | 0.327 |
| Menopausaler Status | | | | | |
| prämenopausal | 22 | 19.6 | 21 | 15.2 | 0.791 |
| postmenopausal | 90 | 80.4 | 117 | 84.8 | |
| Tumorgröße ^c | | | | | |
| pT1 | 49 | 43.8 | 67 | 48.6 | 0.337 |
| pT2 | 51 | 45.5 | 59 | 42.8 | |
| pT3 | 8 | 7.1 | 8 | 5.9 | |
| pT4 | 2 | 1.8 | 2 | 1.4 | |
| unbekannt | 2 | 1.8 | 2 | 1.4 | |
| Lymphknotenstatus ^c | | | | | |
| pN0 | 55 | 49.1 | 77 | 55.8 | 0.997 |
| pN1 | 38 | 33.9 | 42 | 30.4 | |
| pN2 | 9 | 8.0 | 10 | 7.2 | |
| pN3 | 7 | 6.3 | 6 | 4.3 | |
| unbekannt | 3 | 2.7 | 3 | 2.2 | |
| Histologie | | | | | |
| Invasiv duktal | 89 | 79.5 | 115 | 83.3 | 0.617 |
| Invasiv lobulär | 15 | 13.4 | 17 | 12.3 | |
| andere | 8 | 7.2 | 6 | 4.2 | |
| Tumorgraduierung ^d | | | | | |
| G1 | 6 | 5.4 | 14 | 10.1 | 0.175 |
| G2 | 62 | 55.4 | 76 | 55.1 | |
| G3 | 44 | 39.3 | 48 | 34.8 | |
| Östrogenrezeptor Status ^e | | | | | |
| Negativ (IRS0-2) | 22 | 19.7 | 27 | 19.5 | 0.293 |
| Positiv (IRS3-12) | 84 | 75.0 | 109 | 78.9 | |
| unbekannt | 6 | 5.4 | 2 | 1.4 | |
| Progesteronrezeptor Status ^e | | | | | |
| Negativ (IRS0-2) | 30 | 26.8 | 39 | 28.2 | 0.112 |
| Positiv (IRS3-12) | 76 | 68.0 | 96 | 69.3 | |
| unbekannt | 6 | 5.4 | 3 | 2.2 | |
| HER-2 Status ^f | | | | | |
| Negativ (0;1+;2+) | 90 | 80.4 | 114 | 82.6 | 0.112 |
| Positiv (3+) | 14 | 12.5 | 20 | 14.9 | |
| unbekannt | 8 | 7.1 | 4 | 2.9 | |

^aNur weibliche Patientinnen mit einem primären, unilateralem invasiven Brusttumor; ^bExakter Test nach Fischer, zweiseitiges Signifikanzniveau von $P < 0,05$; ^cIn Anlehnung an die TNM-Klassifikation nach Sobin & Wittekind 2002; ^dNach Bloom & Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis; ^eIRS=Immunreaktiver Score nach Remmele & Stegner; ^fÜberexpression für das *HER-2* Gene wurde analog zu dem Schwellenwert des DAKO-Score System diagnostiziert.

A.3 61-GEN-SIGNATUR DES HUMANEN MAMMAKARZINOM-MODELLS BT20

Tabelle A.3-1: 61-Gen-Signatur ko-regulierter ITIH5-Gene

| Gen | Parametrischer P-Wert | Permutations P-Wert | Intensität ITIH5-Klone | Intensität Leerklone | Fold Change | EntrezID |
|--------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|-------------|------------------------|
| ITIH5 | < 1e-07 | 0,0285714 | 511,3 | 44,66 | 11,45 | 80760 |
| ANKRD1 | 0,0001177 | 0,0285714 | 136,69 | 45,73 | 2,99 | 27063 |
| IL32 | 0,00012 | 0,0285714 | 226,4 | 100,07 | 2,26 | 9235 |
| LIMA1 | 0,0001835 | 0,0285714 | 202,53 | 93,79 | 2,16 | 51474 |
| GPNMB | 0,0002728 | 0,0285714 | 223,53 | 55,95 | 4 | 10457 |
| CLIP1 | 0,0006497 | 0,0285714 | 199,06 | 99,41 | 2 | 6249 |
| ATP2B1 | 0,0008642 | 0,0285714 | 284,91 | 149,38 | 1,91 | 490 |
| VTCN1 | 0,0008898 | 0,0571429 | 171,31 | 66,45 | 2,58 | 79679 |
| ATP6V1C1 | 0,0010623 | 0,0285714 | 338,1 | 163,47 | 2,07 | 528 |
| APOD | 0,0010903 | 0,0285714 | 882,85 | 318,19 | 2,77 | 347 |
| GNS | 0,0012126 | 0,0571429 | 1410,01 | 681,62 | 2,07 | 2799 |
| GLS2 | 0,0013557 | 0,0285714 | 118,75 | 51,6 | 2,3 | 27165 |
| FBXO32 | 0,0014977 | 0,0285714 | 99,78 | 43,46 | 2,3 | 114907 |
| PGC | 0,0018654 | 0,0285714 | 121,83 | 66,98 | 1,82 | 5225 |
| PAPSS2 | 0,0018796 | 0,0285714 | 776,72 | 290,05 | 2,68 | 9060 |
| DNM1L | 0,0018886 | 0,0285714 | 396,1 | 190,19 | 2,08 | 10059 |
| ITPR2 | 0,0019415 | 0,0285714 | 167,11 | 92,21 | 1,81 | 3709 |
| AHR | 0,0020524 | 0,0285714 | 291,05 | 132,55 | 2,2 | 196 |
| MYO1B | 0,0025158 | 0,0285714 | 1145,72 | 618,56 | 1,85 | 4430 |
| SUCLG2 | 0,0025434 | 0,0285714 | 238,04 | 124,18 | 1,92 | 8801 |
| C3 | 0,0026786 | 0,0285714 | 170,44 | 62,72 | 2,72 | 718 |
| EPAS1 | 0,0027112 | 0,0571429 | 613,11 | 274,24 | 2,24 | 2034 |
| SYTL2 | 0,0035345 | 0,0285714 | 280,59 | 152,56 | 1,84 | 54843 |
| GPRC5B | 0,0036001 | 0,0571429 | 276,16 | 137,1 | 2,01 | 51704 |
| TFPI | 0,0037775 | 0,0285714 | 139,86 | 46,13 | 3,03 | 7035 |
| INPP4B | 0,0043134 | 0,0857143 | 857,96 | 421,04 | 2,04 | 8821 |
| ITGA6 | 0,0050128 | 0,0571429 | 348,36 | 160,13 | 2,18 | 3655 |
| SERPINA3 | 0,0052226 | 0,0857143 | 1842,84 | 811,76 | 2,27 | 12 |
| ANXA3 | 0,0052325 | 0,0571429 | 601,46 | 314,85 | 1,91 | 306 |
| RRAGD | 0,0052774 | 0,0285714 | 219,97 | 99,36 | 2,21 | 58528 |
| ERGIC2 | 0,0058604 | 0,0571429 | 215,58 | 114,91 | 1,88 | 51290 |
| TGFB2 | 0,0058938 | 0,0285714 | 200,56 | 67,63 | 2,97 | 7042 |
| USP6NL | 0,00608 | 0,0571429 | 320,81 | 178,2 | 1,8 | 9712 |
| UGDH | 0,0062709 | 0,0571429 | 874,72 | 482,78 | 1,81 | 7358 |
| FOSL2 | 0,0064285 | 0,0857143 | 837,88 | 451,39 | 1,86 | 2355 |
| KYNU | 0,006824 | 0,0285714 | 375,9 | 131,62 | 2,86 | 8942 |
| RAB31 | 0,0069262 | 0,0857143 | 2494,65 | 1210,94 | 2,06 | 11031 |
| PLK2 | 0,0073995 | 0,0571429 | 1165,71 | 550,85 | 2,12 | 10769 |
| LYN | 0,0081037 | 0,0857143 | 136,61 | 55,53 | 2,46 | 4067 |
| CD47 | 0,0083399 | 0,0285714 | 1022,05 | 515,22 | 1,98 | 961 |
| OGFRL1 | 0,0085029 | 0,0857143 | 1157,77 | 548,41 | 2,11 | 79627 |
| RBMS1 | 0,009635 | 0,0857143 | 175,85 | 84,79 | 2,07 | 5937 |
| PYROXD1 | 0,0114945 | 0,1428571 | 99,18 | 46,09 | 2,15 | 79912 |
| CLDN1 | 0,0119018 | 0,0571429 | 231,81 | 80,07 | 2,89 | 9076 |
| CD22 | 0,0143045 | 0,0571429 | 220,72 | 101,14 | 2,18 | 933 |
| TNFAIP3 | 0,0153289 | 0,0857143 | 94,94 | 39,77 | 2,39 | 7128 |
| RPS6KA3 | 0,0176766 | 0,1142857 | 186,59 | 103,65 | 1,8 | 6197 |
| SCIN | 0,0183644 | 0,0571429 | 51,6 | 27,81 | 1,86 | 85477 |
| EPB41L4A | 0,0184796 | 0,0857143 | 134,69 | 61,82 | 2,18 | 64097 |

| Gen | Parametrischer P-Wert | Permutations P-Wert | Intensität ITIH5-Klone | Intensität Leerklone | <i>Fold Change</i> | EntrezID |
|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| TLR6 | 0,0220713 | 0,0571429 | 40,46 | 21,47 | 1,88 | 10333 |
| EHF | 0,0269419 | 0,1428571 | 97,61 | 51,92 | 1,88 | 26298 |
| EPA4 | 0,0278818 | 0,1142857 | 511,98 | 201,48 | 2,54 | 2043 |
| TMRSS4 | 0,0283885 | 0,1142857 | 325,53 | 161,1 | 2,02 | 56649 |
| LAMB1 | 0,0310975 | 0,0857143 | 160,57 | 85,47 | 1,88 | 3912 |
| DPP4 | 0,0356701 | 0,0285714 | 59,69 | 31,36 | 1,9 | 1803 |
| MIR21 | 0,0366293 | 0,1428571 | 453,04 | 236,44 | 1,92 | 406991 |
| ARHGDIB | 0,0411745 | 0,1714286 | 66,13 | 32,2 | 2,05 | 397 |
| OLFML3 | 0,0466365 | 0,1428571 | 297,15 | 135,89 | 2,19 | 56944 |
| CPE | 0,0483185 | 0,1428571 | 437,6 | 241,32 | 1,81 | 1363 |

A.4 DANKSAGUNG

Einen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Edgar Dahl (Institut für Pathologie, UK Aachen) für das interessante Thema meiner Arbeit und seine engagierte Betreuung. Sein Interesse an dem Projekt und seine Unterstützung haben ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Björn Usadel (Institut für Biologie I, RWTH Aachen) für die freundliche Übernahme des Ko-Referates.

Frau Prof. Dr. Ruth Knüchel-Clarke (Institut für Pathologie, UK Aachen) danke ich sehr für die Möglichkeit am Institut für Pathologie meine Promotion absolvieren zu können. Vielen Dank für Ihre stets motivierende und positive Unterstützung.

Für die Bereitstellung der Serumproben und der daraus entstandenen tollen und erfolgreichen Kooperation möchte ich ganz herzlich Herrn Dr. Tobias Anzeneder und Frau Ulla Ohlms (Stiftung PATH), Herrn Prof. Dr. Nicolai Maass und Herrn Dr. Dirk Bauerschlag (Frauenklinik der Uniklinik RWTH Aachen) sowie Herrn Dr. Michael Schrauder und Prof. Dr. Peter Fasching (Frauenklinik der Uniklinik Erlangen) danken. Ohne ihre Expertise und ihren Einsatz wäre die Zusammenstellung des umfangreichen Serumkollektivs nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank geht an Frau Birte Becker, die durch ihr stetiges Engagement bei der Analyse der Serumproben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit und der zugehörigen Veröffentlichung beigetragen hat.

Auch möchte ich mich bei Herrn Dr. Jürgen Veeck bedanken, der mir bei so manchen Schwierigkeiten bezüglich meines Früherkennungs-Projekts immer gerne geholfen hat.

Mein Dank geht auch an Herrn Dr. Steffen Meurer und Prof. Dr. Ralf Weiskirchen (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, UK Aachen), ohne deren Geduld, Engagement und Hilfe die erstmalige Einordnung von ITIH5 in einen Signalweg nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte mich vor allem bei den Technischen Assistentinnen für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft danken: Sonja von Serényi, Jennifer Wipperfürth, Inge Losen und Roswitha Davtalab. Besonders danke ich dabei Frau Sonja von Serényi für ihre tolle Unterstützung in

der Etablierung der qMSP und ihre wertvollen Hilfestellungen im Früherkennungs-Projekt sowie den ein oder anderen Schwierigkeiten des Laboralltags.

Dankbar bin ich auch Herrn Dr. Michael Rose für seine tolle Unterstützung meiner Projekte und seine zahlreichen produktiven Ideen.

Vielen Dank an das Team der Molekularen Onkologie. Ihr seid großartig, und wenn ich könnte würde ich Euch mitnehmen!

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie und meinen Freunden. Danke für Eure großartige Unterstützung!