



Fakultät für Medizin
Frauenklinik der Technischen Universität München

**Expressionsanalyse und Epigenetik
der Serinprotease HTRA1 im Mammakarzinom**

Anna Veronika Lehner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. M. B. Kiechle

2. Univ.-Prof. Dr. B. Schmalfeldt

Die Dissertation wurde am 27.04.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Mammakarzinom.....	3
1.1.1 Epidemiologie	3
1.1.2 Klassifikation des Mammakarzinoms, prognostische und prädiktive Faktoren der loko-regionären Primärerkrankung	5
1.2 Karzinogenese.....	9
1.2.1 Tumorsuppressorgene und Onkogene	10
1.2.2 DNA-Methylierung und maligne Erkrankung	11
1.3 Die Serinprotease HTRA1	13
1.3.1 HTRA-Proteine	13
1.3.2 HTRA1 – Aufbau	14
1.3.3 HTRA1 – Funktion und klinische Bedeutung	14
2 Zielsetzung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Proben und Patientenkollektive.....	20
3.1.1 Proben aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande	20
3.1.2 Tumorbank Frauenklinik der TU München – Ovarialkarzinom.....	22
3.1.3 Proben aus dem Universitätsklinikum Dresden	22
3.1.4 Zelllinien	22
3.2 Geräte, Chemikalien und Kits.....	23
3.2.1 Geräte	23
3.2.2 Labormaterial.....	24
3.2.3 Chemikalien.....	24
3.2.4 Kits	25
3.2.5 Software	25
3.3 Methoden	26
3.3.1 Agarose-Gele	26
3.3.2 RNA- und DNA-Konzentrationsbestimmungen.....	26
3.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
3.3.4 Genexpressionsanalyse mit dem Taqman-System	28
3.3.5 DNA-Methylierung	35
3.4 Statistische Auswertung	42
3.4.1 Auswertung des experimentellen Teils	42
3.4.2 Auswertung der GEO-Daten.....	43

4	Ergebnisse	44
4.1	Expressionsanalyse HTRA1	44
4.1.1	Methodenetablierung der mRNA-Expressionsanalyse	44
4.1.2	Expressionsanalyse des Nijmegen-Kollektives	49
4.1.3	HTRA1-Expression aus GEO-Datenbank.....	67
4.1.4	HTRA1-Expression in den Zelllinien	73
4.2	DNA-Methylierung	74
4.2.1	Leukozyten-DNA und Positivkontrolle	75
4.2.2	Ergebnisse der genomischen Bisulfit-Sequenzierung von Tumor-und Zelllinien DNA ohne vorherige Klonierung.....	76
4.2.3	Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung mit vorheriger Klonierung.....	79
5	Diskussion	81
5.1	Analyse der mRNA-Expression von HTRA1.....	81
5.1.1	Methodenetablierung anhand von Ovarialkarzinom-Proben und Mammakarzinom-Proben aus dem Kollektiv Dresden.....	81
5.1.2	HTRA-1-mRNA-Expression in Mammakarzinom-Proben des Kollektivs Nijmegen	82
5.1.3	HTRA1-Expressionsanalyse in der GEO-Datenbank	85
5.1.4	HTRA1-mRNA-Expression von Zelllinien	88
5.2	Regulierung der HTRA1-Expression über DNA-Methylierung.....	88
6	Zusammenfassung	90
7	Literaturverzeichnis	91
8	Anhang	105
8.1	Tabellenverzeichnis.....	105
8.2	Abbildungsverzeichnis	107
9	Lebenslauf	110
	Danksagung	112

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer gene</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CpG	Dinukleotid 5'-Cytosin-Phosphat-Guanosin-3'
CpG-Inseln	Genomische Region mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte
Ct	<i>threshold cycle</i> , PCR-Zyklusanzahl am Fluoreszenz-Schwellwert
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E	Effizienz
EF	<i>event frequency</i> , Ereignis-Häufigkeit
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i>
ER	Östrogenrezeptor (<i>estrogen receptor</i>)
ff.	und die folgenden
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEO	<i>gene expression omnibus</i> : öffentliche Datenbank mit Genexpressionsdaten
G6PDH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HR	<i>Hazard Ratio</i> ; relatives Risiko
HTRA1	Protein <i>high temprature requirement A1</i>
IGF	<i>insulin-like-growth-factor</i>
IGF-BP	<i>insulin-like-growth-factor binding protein</i>
IR	<i>interquartile Range</i> , Interquartilen-Abstand
k. A.	keine Angaben
95%KI	95%-Konfidenzintervall
min	Minute
mM	Milimol/Liter
OS	<i>Overall-Survival</i> , Gesamtüberleben
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ-Domäne	Teil eines Proteins, der mit anderen Proteinen interagiert
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
uPA	urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator
uPAR	Rezeptor für urokinasetyp-Plasminogen-Aktivator

RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RPS9F	ribosomales Protein S9F
RFS	Relapse-Free-Survival, Rezidiv-freies Überleben
s	Sekunde
SAM	S-adenosylmethionin
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , DNA-Basenaustausch-Polymorphismus
S.O.C.	Nährmedium für transformierte Bakterien
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TGF- β	tumor-growth-factor β
TM	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

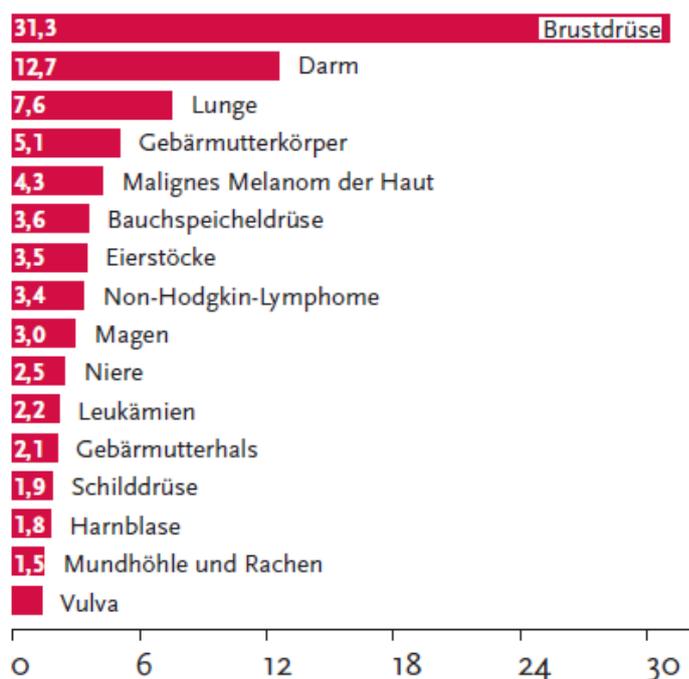


Abbildung 1 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs) bei Frauen in Deutschland 2010 (modifiziert nach [Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) 2013])

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau in Deutschland (Abbildung 1). Es erkrankt nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Die Inzidenz unterscheidet sich stark in den einzelnen Altersgruppen, mit einem sehr niedrigen Erkrankungsrisiko für junge Frauen vor dem 30. Lebensjahr. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2010 bei 64 Jahren für Frauen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate wird für alle Betroffenen gemittelt mit 87% beziffert [Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der

epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) 2013]. Im Jahr 2011 starben 17 815 Frauen in Deutschland an Brustkrebs. Damit gehört diese Erkrankung zu einer der häufigsten Todesursachen in Deutschland (vgl. Abbildung 2) [Statistisches Bundesamt (Destatis) 2012].

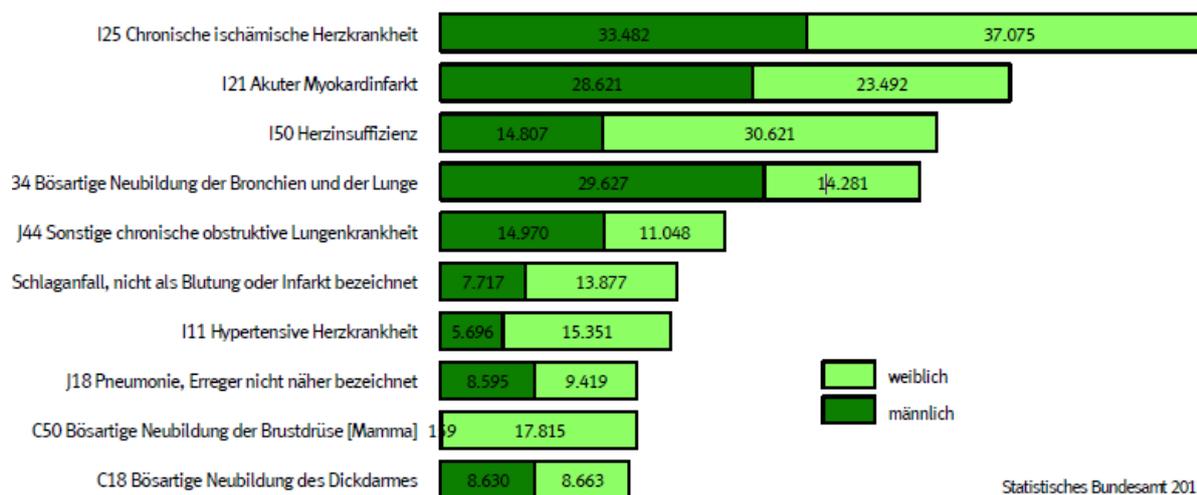


Abbildung 2 Todesursachen in Deutschland, adaptiert nach Statistisches Bundesamt [Statistisches Bundesamt (Destatis) 2012]

Es muss berücksichtigt werden, dass es sich bei der Diagnose Mammakarzinom um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit stark variabler Prognose handelt. Unter therapeutischen Gesichtspunkten wird zunächst zwischen der loko-regional begrenzten Primärerkrankung, dem lokalen Rezidiv und dem metastasiertem Mammakarzinom unterschieden. Während bei letzterem nur in Ausnahmefällen eine Aussicht auf vollständige Heilung besteht, wird bei der loko-regional begrenzten Primärerkrankung im Allgemeinen eine kurative Therapie angestrebt. Auch bei lokalem Rezidiv ist noch in ca. 70% die vollständige Heilung Therapieziel [Kreienberg et al. 2008]. Die Mehrzahl aller Mammakarzinome entsteht sporadisch. Zu den Risikofaktoren gehören Adipositas in der Postmenopause, frühe Menarche und späte Menopause, späte oder keine Schwangerschaft und die Hormonersatztherapie bzw. die Einnahme oraler Kontrazeptiva [Harbeck et al. 2007]. Für 5-10% der Fälle wird eine autosomal-dominant vererbte Mutation in einem Gen als Ursache angenommen. Bekannte Beispiele sind BRCA1 und BRCA2, vererbte Mutationen in diesen Genen sind für ca. 5% aller Mammakarzinome ursächlich. Auch Keimbahn-Mutationen in RAD51C, TP53(Li-Fraumeni-Syndrom), STK11/LKB1(Peutz-Jeghers) und PTEN erhöhen das Brustkrebsrisiko deutlich, sie sind aber insgesamt seltener. Zusätzlich werden polygene Erbgänge und Gendefekte mit niedriger Penetranz für die familiäre Häufung von Brustkrebs verantwortlich gemacht [Meindl et al. 2011].

1.1.2 Klassifikation des Mammakarzinoms, prognostische und prädiktive Faktoren der loko-regionären Primärerkrankung

Prognostische Faktoren geben Informationen über den wahrscheinlichen Krankheitsverlauf. Abzugrenzen sind prädiktive Faktoren, die etwas über das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie aussagen. Beide Gruppen sind wichtige Entscheidungshilfen für die Auswahl der adjuvanten Therapie beim loko-regional begrenzten Mammakarzinom (siehe auch Tabelle 1). Ziel ist eine möglichst genaue Auswahl derjenigen Patienten die von einer medikamentös-systemischen Therapie profitieren. So bleiben Nebenwirkungen den Patienten erspart, für die die lokale Behandlung bereits die Heilung herbeiführt bzw. die von einer Therapieform höchstwahrscheinlich nicht profitieren (z.B. Hormonrezeptor-negativer Tumor und endokrine Therapie).

Die genaue Stadieneinteilung erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (*Union internationale contre le cancer*). Für die Einteilung wird der größte Durchmesser des Primärtumors(pT) und die Anzahl und Lokalisation der befallenen regionalen Lymphknoten(pN) vom Pathologen am Operationspräparat bestimmt. Zusätzlich wird die Existenz von Fernmetastasen(M) berücksichtigt. Einer der stärksten prognostischen Faktoren für Rezidiv- und Sterberisiko beim primären Mammakarzinom ist der Befall der axillaren Lymphknoten. So sank beispielsweise nach Daten des Tumorregisters München bei zehn oder mehr befallenen Lymphknoten im Vergleich zu negativen Nodalstatus die relative 5-Jahresüberlebenszeit von 97,7% auf 51,1% [Schrodi et al. 2011]. Der Befall der axillaren Lymphknoten korreliert positiv mit der Tumorgroße, beide tragen aber unabhängige Information zur Prognose bei [Carter et al. 1989].

Histologisch lassen sich mehrere Typen des invasiven Mammakarzinoms unterscheiden, die häufigsten sind das invasiv-duktales (70-80%) und das invasiv-lobuläres Mammakarzinom (10%) [Harbeck et al. 2007]. Als prognostisch günstig gelten das tubuläre, muzinöse, adenoid-zystische und kribiforme Karzinom [Ellis et al. 1992; Rosen et al. 1993]. Daneben erfolgt eine Graduierung des Differenzierungsgrades des Tumors nach der Ellis- und Elston-Modifikation des Bloom und Richardson-Gradings. Diese unterscheidet die drei Grade gut (G1), mäßig (G2) und schlecht (G3) differenziert. Als Kriterien hierfür werden

Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate gewertet. Sie hat eine größere Bedeutung für Prognose und Therapieentscheidung als der histologische Typ [Elston et al. 1991; Bloom et al. 1957]. Im histologischen Befund haben neben Differenzierungsgrad und Typ auch das Ausmaß des Tumoreinbruchs in Lymph- und Blutgefäße und der Resektionsstatus und -rand Bedeutung für die Prognose. Zu den klassischen Prognosefaktoren zählt außerdem das Alter der Patientin bei Erstdiagnose. Die schlechtere Prognose jüngerer Patientinnen ist am ehesten auf das häufigere Auftreten aggressiver Karzinome zurück zu führen, zum Beispiel von G3-Tumoren [Kollias et al. 1997] oder „triple-negativen“ Mammakarzinomen [Hudis et al. 2011].

Immer wichtiger für Therapie und Prognose werden die biologischen Eigenschaften der Tumoren. Anhand von Genexpressionsprofilen lassen sich Mammakarzinome in verschiedene Subtypen einteilen. Eine gängige Einteilung unterscheidet nach mRNA-Expressionsmuster vier Hauptsubtypen, die durch immunhistochemische Untersuchungen angenähert werden können: zwei Hormonrezeptor-positive Varianten, Luminal A und B; eine erbB2-überexprimierende Variante und die Basalzell-ähnlichen Tumoren (siehe auch Tabelle 1, S. 7). Letztere gehören zu den „triple-negativen“-Mammakarzinomen, die weder Hormon- noch Her2neu-Rezeptor überexprimieren [Perou et al. 2000; Sørlie et al. 2001].

Das Vorhandensein von Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie dem Wachstumsfaktor-Rezeptor Her2/neu wird in der Regel immunhistochemisch bestimmt. Die Überexpression von Her2/neu kann mit der Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung(FISH), in der die Genamplifikation als Ursache sichtbar gemacht wird, bestätigt werden. Durch die prädiktive Bedeutung für das Ansprechen auf endokrine bzw. Her2/neu-Antikörpertherapie haben diese Faktoren eine essentielle Bedeutung für die Auswahl der adjuvanten Therapie.

Tabelle 1 Übersicht der empfohlenen adjuvanten Therapie in Abhängigkeit von Subtyp nach Konsensus St. Gallen 2011 [Goldhirsch et al. 2011] (a: ER/PR: Östrogen und-/oder Progesteronrezeptor)

Subtyp	Rezeptorstatus		Ki67	Therapie
	ER/PR ^a	Her2neu		
Luminal A	+	-	niedrig	endokrine Therapie, bei hohem Risiko (z.B. Nodalstatus) auch Chemotherapie
Luminal B				
• ohne erbB2-Überexpression	+	-	hoch	endokrine Therapie, Kombination mit Chemotherapie diskutieren
• mit erbB2-Überexpression	+	+	alle	Chemotherapie, endokrine Therapie und anti-Her2-Therapie
Non-luminal mit erb2-Überexpression	-	+	k. A.	Chemotherapie und anti-Her2-Therapie
Basal-like (ca. 80% aller triple-negativen Karzinome)	-	-	k. A.	Chemotherapie
Histologische Sonderformen			k. A.	
• kribriform, tubulär, muzinös	+	-		Endokrine Therapie
• medullär*, adenoid-zystisch* apokrin, metaplastisch	-	-		Je nach Typ/Nodalstatus Chemotherapie oder Beobachtung (möglich bei *)

Während die Bestimmung des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus für die Prognose nur eine untergeordnete Bedeutung hat, ist die prädiktive Aussage vor allem des Östrogenrezeptorstatus für eine höhere Ansprechrate (ca. 60-70%) auf eine endokrine Therapie bereits seit über 30 Jahren von großer klinischer Bedeutung [Donegan 1992]. Wichtig als Auswahlkriterium für die Art der endokrinen Therapie ist der Menopausenstatus der Patientin. Bei prämenopausalen Patientinnen ist der Einsatz von Tamoxifen, evtl. kombiniert mit der Ausschaltung der Ovarfunktion durch die Gabe von Gonadotropin-Releasing-Hormon(GnRH)-Analoga oder die operative/strahlentherapeutische Ablation, Standard. Bei sicher postmenopausalen Patientinnen hat sich gezeigt, dass eine Therapie mit Aromatasehemmern der 3. Generation, z.B. Letrozol, einer reinen Tamoxifen-Therapie überlegen ist [Regan et al. 2011]. Diese können anstatt des Tamoxifens für volle 5 Jahre („upfront“) oder im Wechsel („switch“), nach oder vor, 2-3 Jahren Tamoxifen gegeben werden.

Eine Überexpression von Her2/neu, einem Wachstumsfaktorrezeptor, wird mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht [Slamon et al. 1987; Chia et al.

2008]. Sie tritt in bis zu 25% aller frühen Brustkrebsfälle auf und ist für ein Ansprechen auf eine Therapie mit einem monoklonalen Antikörper zur Blockade des Her2/neu-Wachstumsfaktorrezeptors, dem Trastuzumab, wichtig [Baselga et al. 2006]. Weitere Medikamente, die als Ziel Her-2/neu haben, sind Lapatinib, Pertuzumab und T-DM1. Während erstere beiden ebenfalls der Blockade der Her2/neu-Signaltransduktion dienen, ist T-DM1 eine Kombination aus Antikörper und Chemotherapeutikum [Baselga 2010]. Ein Her2/neu-negativer Tumor, der auch keine Hormonrezeptoren exprimiert, wird als „Triple-negatives-Mammakarzinom“ bezeichnet. Es macht ca. 12-17% aller Mammakarzinome aus. Bei Patientinnen mit BRCA1-Mutation wird diese Subgruppe sogar in bis zu 75% der Fälle diagnostiziert. Spricht dieses wenig auf die Chemotherapie an, hat es eine sehr schlechte Prognose [Foulkes et al. 2010].

Der Marker Ki-67 kann zusätzlich zur histologischen Graduierung objektivere Information über die Proliferationsrate geben und bei der Einteilung von Risikogruppen von Nutzen sein, und so z.B. bei der Entscheidung helfen, ob bei Hormonrezeptor-positiven Tumoren eine Chemotherapie empfehlenswert ist [Dowsett et al. 2011; Goldhirsch et al. 2011].

Auch die Bestimmung von uPA (Urokinasetyp Plasminogen Aktivator) und PAI-1 (Plasminogen Aktivator Inhibitor 1) kann zur Therapieentscheidung beitragen [Beckmann et al. 2009]. Klinischer Einsatz erfolgt vor allem bei nodal-negativen, G2-Tumoren. Erhöhte uPA/PAI-1-Werte im ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) zeigen ein erhöhtes Rezidiv-Risiko und somit die Notwendigkeit einer Chemotherapie an. Darüber hinaus profitieren Patientinnen mit höheren uPA/PAI-1-Expression mehr von der Chemotherapie [Harbeck et al. 2004; Harbeck et al. 2002]. Die uPA/PAI-1-Messung konnte in der Chemo-N0-Studie in einem Kollektiv von 647 Mammakarzinom-Patientinnen ohne Lymphknotenbefall eine Gruppe von Patientinnen mit hohem Rezidiv-Risiko identifizieren, die von einer Chemotherapie erheblich profitierten, während in der Gruppe mit niedrigem uPA/PAI-1-ELISA-Testergebnis das Rezidiv-Risiko auch ohne Therapie gering ausfiel [Harbeck et al. 2002]. uPA/PAI-1 sind Teil des Fibrinolyse-Systems, dem Gegenspieler der Blutgerinnung. uPA aktiviert das Plasmin, das wiederum Fibrin - das Endprodukt der Blutgerinnungskaskade - spaltet. PAI-1 ist einer seiner Inhibitoren. Auch im Gewebe sind uPA und PAI-1 vorhanden, zusätzlich existiert auf der Oberfläche von Zellen ein

uPA-Rezeptor (uPAR). Analog zur Hemmung der Blutgerinnung ist eine Rolle des uPA/PAI-1-Systems beim Umbau und der Degradation extrazellulärer Matrix bekannt. Diese Vorgänge sind wichtig für Invasion und Metastasierung maligner Tumoren. Zusätzlich kommt es bei diesem Umbau zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Signalstoffen, die unter anderem Einfluss auf Angiogenese, Tumorwachstum und -motilität haben. In verschiedenen Malignomen konnte im Vergleich zum jeweiligen Normalgewebe eine höhere uPA/PAI-1-Expression nachgewiesen werden, welche zudem mit einer schlechteren Prognose verbunden ist [Schmitt et al. 2008; Danø et al. 2005; Harbeck et al. 2004].

Auf mRNA-Ebene sind drei Assays vorhanden, die Anhand eines Expressionsprofils mehrerer Gene den untersuchten Tumor einer Subgruppe zuordnen. Oncotype DX® ist der im Moment am besten durch Studien belegte Test, und kann zur Abschätzung der Notwendigkeit einer Chemotherapie herangezogen werden. Anwendung findet er in Situationen welche durch andere prognostische und prädiktive Faktoren nicht geklärt werden können [Goldhirsch et al. 2011; Paik et al. 2004].

1.2 Karzinogenese

Ein Tumor kann sich aus einer einzelnen entarteten Zelle über klonale Vermehrung entwickeln. Eine Tumorzelle unterscheidet sich gegenüber einer normalen Zelle durch charakteristische Fähigkeiten, die sie sich im Lauf ihrer Entwicklung angeeignet hat. Sie wurden von Hanahan und Weinberg [Hanahan et al. 2000; Hanahan et al. 2011] als die „Hallmarks of Cancer“ zusammengefasst:

- Unlimitiertes Potential zur Zellvermehrung
- Gewebeinvasion und Metastasierung
- Hemmung der Apoptose
- Unabhängigkeit von externen Wachstums-Signalen
- Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Ausreichende Angiogenese zur Tumorversorgung
- Vermeidung von Zerstörung durch die Immunabwehr
- Stoffwechseländerungen zur maximalen Energiebereitstellung

Diese Eigenschaften werden über genetische und epigenetische Alterationen erworben. Genomische Instabilität und höhere Mutationsraten, z.B. aufgrund von fehlenden/inaktiven Reparaturenzymen, spielen deshalb eine Schlüsselrolle bei der Tumorentstehung. Auch eine peritumorale Entzündung kann die Tumorentwicklung über die Produktion von Signal- und Botenstoffen sowie mutagenen Verbindungen fördern.

1.2.1 Tumorsuppressorgene und Onkogene

Jede maligne Zelle enthält Veränderungen in mehreren Genen. Letztere werden in Tumorsuppressorgene und Proto-Onkogene unterteilt. Tumorsuppressorgene kodieren im Allgemeinen für Proteine, die die Zellproliferation negativ regulieren, z.B. Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparaturenzyme. Ihr Verlust begünstigt eine ungehemmte Zellteilung der malignen Zelle. Nach Knudsons „Two Hit“-Modell müssen beide Allele eines Tumorsuppressor-Gens ihre Funktion einbüßen [Knudson 1971, Knudson 2000]. Die Fehlfunktion oder der Verlust des ersten Allels wird als „Loss of heterozygosity“ (LOH) bezeichnet. Da das zweite Allel normalerweise den Verlust kompensiert, muss noch keine Erkrankung vorliegen. Das kranke Allel kann als Keimbahnmutation vorliegen und kann so weitervererbt werden. Bei Mutation oder Verlust der Expression des zweiten Allels ist die Tumorsuppressor-Funktion nicht mehr vorhanden und es kommt zum Auftreten von Tumoren. So wird für eine Trägerin einer Mutation in einem Allel des BRCA1- [Miki et al. 1994] oder des BRCA2-Gens [Wooster et al. 1995] ein Lebenszeitrisiko von 65% bzw. 45% für ein Mammakarzinom und ca. 45% bzw. 11% für ein Ovarialkarzinom angegeben [Antoniou et al. 2003]. Auch das Risiko für andere Tumore ist erhöht. Die BRCA1 und BRCA2-Gene kodieren für Proteine, die Teile eines Komplexes für die DNA-Reparatur sind [Venkitaraman 2002].

Proto-Onkogene sind Gene die bei Funktionsgewinn die Tumorentwicklung fördern. Die Umwandlung in ein Onkogen durch Mutation, Amplifikation oder Deregulierung der Expression muss nur in einem Allel passieren, sie ist dominant. Oncogene kodieren z.B. für Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren oder Proteine, die die Apoptose blockieren. Ein Beispiel mit klinischer Relevanz beim Mammakarzinom ist das Gen c-erbB2 (auch Her2-Gen). Das HER2/neu-Protein ist ein transmembraner Tyrosinkinase-Wachstumsfaktor-Rezeptor, dessen Aktivierung Zellwachstum und -vermehrung, Angiogenese, Interaktionen zwischen Zellen, Zellmotilität und

Metastasierung fördert und Apoptose hemmt. In ca. 20-30% aller Mammakarzinome lässt sich eine Amplifikation des Her2-Gens nachweisen. Es wurden mehrere therapeutische Strategien entwickelt, die am Her2/neu-Rezeptor angreifen. Die am besten klinisch getestete ist der Antikörper Trastuzumab, der an den Her2/neu-Rezeptor bindet und dessen Aktivierung hemmt [Suter et al. 2007].

1.2.2 DNA-Methylierung und maligne Erkrankung

Die DNA-Methylierung gehört zu der epigenetischen Information einer Zelle. Die Epigenetik umfasst alle Informationen über das Muster der Gen-Expression, die nicht in der DNA-Sequenz gespeichert ist. Sie kann z.B. in Form von Gen-regulierenden MicroRNAs, als Modifikation der DNA-organisierenden Proteine, der Histone, oder der Methylierung der DNA-Basen vorliegen. Epigenetische Information wird bei der Zellteilung weitergegeben.

Die Methylierung der DNA findet in eukaryotischen Zellen fast ausschließlich innerhalb von Cytosin-Guanosin-Dinukleotiden(CpG) an der Base Cytidin statt. Regionen, die viele CpG-Dinukleotide(CpG-Islands) enthalten, finden sich im Promoter-Bereich und im ersten Exon ungefähr der Hälfte aller menschlichen Gene. Eine Hypermethylierung dieser CpG-Islands ist mit einer niedrigen Expression dieser Gene verbunden. Dagegen kann die Methylierung von CpG-Dinukleotiden innerhalb von Genen mit einer erhöhten Genexpression verbunden sein [Lister et al. 2009; Rauch et al. 2009]. Auch außerhalb dieser Bereiche gibt es CpG-Islands, die normalerweise nicht an der Transkriptionsregulation beteiligt sind. In der gesunden Zelle ist die DNA-Methylierung an der Organisation des Chromatins in aktive und inaktive Bereiche, der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms, dem genetischen Imprinting (bevorzugte Expression mütterlicher oder väterlicher Gene) [Weaver et al. 2009], der Inaktivierung parasitärer Sequenzen und der gewebsspezifischen Expression von Genen beteiligt. Zusätzlich spielt die DNA-Methylierung eine wichtige Rolle während der Embryogenese [Li et al. 1992].

In der Krebszelle gibt es zwei gegensätzliche Phänomene. Einerseits ist die DNA-Methylierung im Gesamten geringer als die einer normalen Zelle. Diese Hypomethylierung kann, wenn sie im Promotorbereich auftritt, Proto-Oncogene [Feinberg et al. 1983; Cho et al. 2003] oder Gene aktivieren, die zur Chemotherapie-

Resistenz führen [Nakayama et al. 1998]. Auch wird die Hypomethylierung, besonders von Satelliten-DNA (hoch repetitive DNA) im Zentromerbereich der Chromosomen, mit einer erhöhten genomischen Instabilität in Verbindung gebracht [Eden et al. 2003]. Diese kann zu Verlust von genetischem Material, Translokationen und Aneuploidie führen. Auf der anderen Seite wurde eine Hypermethylierung von Promotor und Genanfang von verschiedenen Tumorsuppressor-Genen nachgewiesen. Diese Gene werden dann weniger oder nicht mehr exprimiert. So wird beispielsweise für das Tumorsuppressor-Gen PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), dessen Verlust die Resistenz gegen Apoptose fördert und das häufig in Mammakarzinomen vermindert oder überhaupt nicht mehr exprimiert wird [Vitolo et al. 2009], Promoter-Hypermethylierung als ein häufiger Mechanismus der Gen-Abschaltung angenommen [Khan et al. 2004; García et al. 2004]. Die DNA-Hypermethylierung im Promotorbereich kann auch über die Abschaltung von Genen, deren Produkte an der DNA-Reparatur beteiligt sind, zur einer erhöhten genomischen Instabilität führen [Kane et al. 1997]. Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen, wie die 5-Aza-Nukleosid-Analoga Decitabin und 5-Azacidin können diese Stilllegung von Genen rückgängig machen. Beide werden in der palliativen Therapie des Multiplen Myeloms mit Erfolg angewandt [Lübbert et al. 2011; Kantarjian et al. 2006; Fenaux et al. 2009].

1.3 Die Serinprotease HTRA1

1.3.1 HTRA-Proteine

Die Proteine der HTRA-Familie sind charakterisiert durch einen modularen Aufbau (Abbildung 3) mit einer N-terminalen Regulationsdomäne, einer Serin-Proteasendomäne vom Trypsin-Typ und mindestens einer PDZ-Domäne. Sie weisen eine hoch konservierte Aminosäuresequenz in der Proteasen-Region auf [Zumbrunn et al. 1996]. Viele Mitglieder der HTRA1-Familie werden funktionell mit der Stressreaktion auf zellulärer Ebene in Verbindung gebracht [Clausen et al. 2002]. So leitet sich auch der Name HTRA *-high temperature requirement A-* von der Funktion des ersten beschriebenen Mitglieds ab: Das Homolog DegP in *E.coli* sichert bei Temperaturerhöhung durch den Abbau degradierter Proteine das Überleben des Bakteriums. Bei Normaltemperatur ist es zudem als *Chaperone* wichtig für die korrekte Faltung von Proteinen [Spiess et al. 1999; Krojer et al. 2008]. Beim Menschen sind vier Proteine der HTRA-Familie bekannt: HTRA1(auch PRSS11, ARMD7, ORF480 oder L56), HTRA2(Omi), HTRA3 und HTRA4.

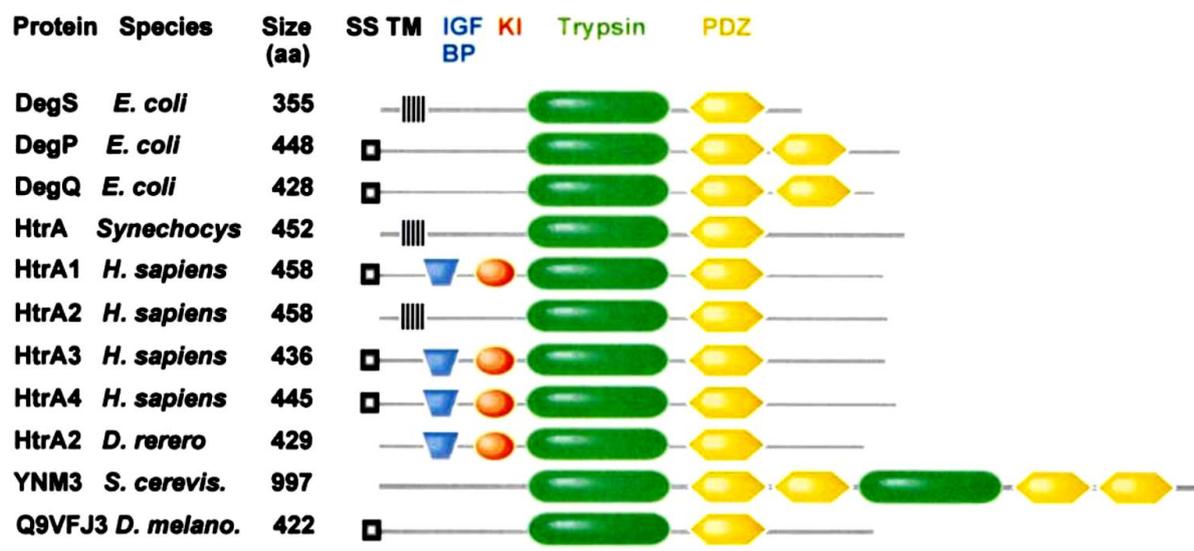


Abbildung 3 Aufbau der Mitglieder der HTRA1-Familie bei unterschiedlichen Spezies: SS: Signalsequenz, TM: Transmembrandomäne, IGF BP: Insulin-ähnlicher-Wachstums-Faktor bindendes Protein, KI: Kazal-Typ Proteasen-Inhibitor, Trypsin: Proteasen-Domäne, PDZ: Domäne für Protein-Protein-Interaktion; modifiziert nach [Clausen et al. 2002]

1.3.2 HTRA1 – Aufbau

Das Gen HTRA1 ist auf Chromosom 10q26.2 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit ca. 50kDa. Es wurde 1996 von Zumbunn und Trueb als ein Gen identifiziert, das in SV40-transformierten Fibroblasten im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr exprimiert wird [Zumbunn et al. 1996].

HTRA1 verfügt über einige Besonderheiten im Aufbau. Am Aminoterminus ist eine Signalsequenz zur Sekretion in den Extrazellularraum enthalten. Es wurde jedoch auch im Zytoplasma, nicht an Organellen gebunden [Luca 2004; Campioni et al. 2010] und im geringeren Umfang auch im Zellkern [Clawson et al. 2008; He et al. 2010] nachgewiesen. Der Signalsequenz folgt eine Regulationsdomäne. Diese ist stark homolog zu dem Protein mac25 [Hu et al. 1998], dessen Rolle als Tumorsuppressor [Kato 2000] auch für HTRA1 eine Funktion bei der Regulierung von Zellwachstum und -teilung nahelegt. Mac25 besitzt eine Bindungsstelle für den Insulin-ähnlichen-Wachstumsfaktor (*insulin-like-growth-factor*, IGF) und einer Kazal-type-Proteaseninhibitor-Domäne. Zusätzlich enthält dieser Abschnitt ein Aminosäuremotiv, das charakteristisch für Follistatin ist, welches verschiedene Mitglieder der TGF- β -Familie inhibieren kann [Lin et al. 2003]. Auch für HTRA1 ist eine Blockade des TGF- β -Signalwegs beschrieben [Shiga et al. 2011]. Die PDZ-Domäne kann über die Bindung anderer Proteine die Aktivität der Protease verändern [MURWANTOKO et al. 2004]. Aber auch durch eine hohe HTRA1-Expression an sich kann über Autoproteolyse ein kürzeres Protein ohne die Mac25-Domäne entstehen, das als aktivere Form der Protease gilt [Chien et al. 2006; He et al. 2010].

1.3.3 HTRA1 – Funktion und klinische Bedeutung

Als Substrate von HTRA1 sind Proteine der extrazellulären Matrix wie Typ-III-Kollagen [MURWANTOKO et al. 2004], Fibronectin [Grau et al. 2006] und Aggrecan [Chamberland et al. 2009], Fragmente des APP(amyloid precursor protein) [Grau et al. 2005] und Fibulin5 [Vierkotten et al. 2011] beschrieben. Aber auch intrazelluläre Proteine wie Tubuline [Chien et al. 2009b; Chien et al. 2009a], XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein) [He et al. 2011] und Tuberin, dem Produkt des Tumorsuppressor-Gens TSC(tuberosis sclerosis complex)-2 [Campioni et al. 2010]

wurden als potentielle Substrate identifiziert. Interaktionen von HTRA1 mit Proteinen der TGF- β -Familie [Oka 2004; Launay et al. 2008; Hara et al. 2009; Shiga et al. 2011], dem EGFR(epidermal growth factor receptor) [He et al. 2010] und dem IGF-BP5 [Hou et al. 2005], lassen zusätzlich eine Rolle in diesen Signalwegen vermuten.

Passend zu der Vielzahl an Substraten wird eine Rolle von HTRA1 in zahlreichen pathologischen Vorgängen diskutiert: dazu zählen - neben der für diese Arbeit zentrale Rolle als Tumorsuppressor-Gen - auch verbreitete Krankheiten wie Alzheimer, Präeklampsie, entzündliche Athropathien und Maculadegeneration. Vererbte Missense- und Nonsense-Mutationen in HTRA1-Gen sind mit CARASIL, *Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*, einer autosomal-rezessiv erblichen Krankheit mit einer Wandverdickung der kleinen Gehirnarterien assoziiert [Hara et al. 2009]. Symptome der sehr seltenen, vor allem in Japan auftretenden Krankheit sind die neurologischen Folgen der subkortikale Infarkte, Alopezie und die frühe degenerative Veränderungen der Bandscheiben und Deformität der Wirbelsäule. Die Krankheit manifestiert sich im frühen Erwachsenenalter [Yanagawa et al. 2002]. In der Literatur wird der Fall eines CARASIL-Patienten mit fortgeschrittenen Nasopharynx-Karzinom im 33. Lebensjahr beschrieben [Yamamura et al. 1987], über eine erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen wird aber nicht generell berichtet. Verschiedene Basenaustausch-Polymorphismen (SNP; *single nucleotid polymorphism*) in der Promotorregion von HTRA1 erhöhen laut mehrerer Studien das Risiko an AMD(age-related macular degeneration) zu erkranken [Yu et al. 2010; Yang et al. 2010], eine erhöhte HTRA1-Expression scheint hier über Wirkung auf den TGF- β -Signalweg in der Pathogenese diese Krankheit involviert. Es sind verschiedene Interaktionen von HTRA1 mit dem TGF- β -Signalwegs beschrieben: HTRA1 kann an Komponenten des TGF- β -Signalwegs binden, sie proteolytisch degradieren und somit Teile der Signalweiterleitung ausschalten [Oka et al. 2004, Shiga et al. 2011]. Auch eine verstärkte Aktivität im TGF- β -Signalweg bei herabgesetzter proteolytischer Funktion von HTRA1 bei Mutation des HTRA1-Gens ist beschrieben [Hara et al. 2009]. Die Rheumatoide Arthritis und die entzündliche Form der Arthrose gehen mit eine Erhöhung der HTRA1 mRNA- und Protein-Expression einher [Hu et al. 1998; Grau et al. 2006]. Bei der in diesem Zusammenhang beschriebenen Degradation von extrazellulär Matrix durch HTRA1 [Murwantoko et al. 2004; Hu et al. 1998; Grau et al.

2006] entstehen Polypeptide, die wiederum als Botenstoffe wirken können [Mauney et al. 2010]. Im Gehirn scheinen dagegen erhöhte HTRA1-Konzentrationen über die Beteiligung am Abbau von Amyloid-Precursor-Protein [Grau et al. 2005] einen protektiven Einfluss auf Entwicklung der Demenz vom Alzheimer-Typ zu haben [Tennstaedt et al. 2012]. Es konnte in einer Studie für SNPs innerhalb von HTRA1 aber keine signifikante Assoziation mit dem Erkrankungsalter und -risiko gefunden werden [Turunen et al. 2011].

Neben der oben bereits erwähnten Entdeckung von HTRA1 im Rahmen der malignen Transformation [Zumbrunn et al. 1996] und seiner Homologie zum Tumorsuppressor Mac25, gibt es zahlreiche Hinweise auf eine Tumorsuppressor-Funktion von HTRA1. Eine Herab-Regulation der Expression von HTRA1-mRNA und/oder -Protein im Vergleich zum Normalgewebe zeigten Ovarialkarzinome [Chien et al. 2004], Endometriumkarzinome [Narkiewicz et al. 2009; Mullany et al. 2011], und Plattenepithelkarzinome des Ösophagus [Yu et al. 2012]. Ein Verlust oder eine Verminderung der HTRA1-Expression wurde zudem auch in verschiedenen malignen Zelllinien festgestellt [Chien et al. 2004; Wang et al. 2012]. Einen Zusammenhang von Tumorprogression und HTRA1-Expression wird unter anderem wegen der niedrigeren Expression in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor beim Bronchialkarzinom [Esposito et al. 2006] und malignen Melanom [Baldi et al. 2003; Baldi et al. 2002] vermutet. Auch ist eine verminderte HTRA1-Expression bei abnehmender histologischer Differenzierung, z.B. für Endometriumkarzinome [Bowden et al. 2006] und Astrozytome [MacDonald et al. 2007], beschrieben. Zudem erhöht eine Variante des HTRA1-Gens in einer Assoziationsstudie signifikant das Brustkrebs-Risiko von BRCA1-Genträgerinnen [Neuhausen et al. 2011]. Die prädiktive Bedeutung der Höhe der HTRA1-Protein-Expression wurde für das Mesotheliom [Baldi et al. 2008] und das hepatozelluläre Karzinom [Zhu et al. 2010] untersucht. Es wurden bessere Überlebensraten der Patienten mit höheren HTRA1-Expressionswerten im Tumor festgestellt.

Die biologische Funktion von HTRA1 als Tumorsuppressor ist noch nicht abschließend geklärt (siehe auch Abbildung 4). Eine unterdrückte HTRA1-Expression führt in Tumorzellen verschiedener Entitäten zu einer erhöhten Zellmotilität und -invasivität, die durch Re-Expression wieder rückgängig gemacht werden kann [Chien et al. 2009a; He et al. 2010].

HTRA1 als Tumorsuppressor

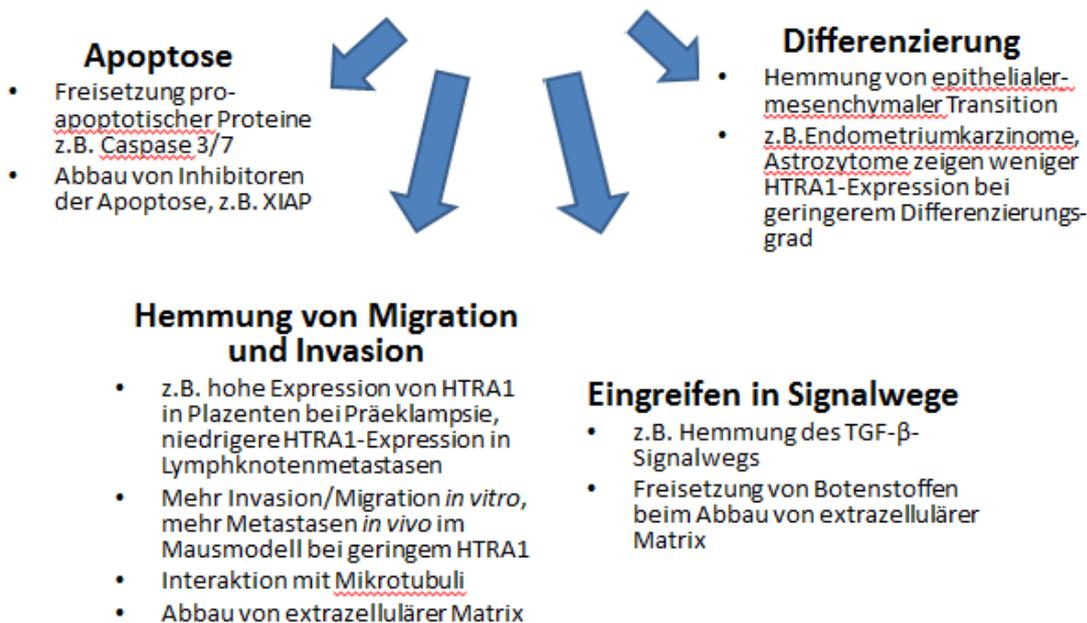


Abbildung 4 HTRA1 als Tumorsuppressor: mögliche Wirkungsweisen

Auch bei der Invasion von Trophoblastenzellen bei der Ausbildung der Plazenta hat sich ein Einfluss der HTRA1-Expression auf die Zellinvasion gezeigt: Invasive extravillöse Trophoblastenzellen exprimieren wesentlich weniger HTRA1 als Syncytiotrophoblastenzellen mit weniger Invasionspotential. Eine insgesamt erhöhte plazentare HTRA1-Expression wurde in Präeklampsie-Fällen gefunden, einer Krankheit, die mit einer gestörten Trophoblasten-Invasion verbunden ist [Nie et al. 2006; Ajayi et al. 2008]. Ein grundlegender Mechanismus für den Einfluss von HTRA1 auf die Zellbewegung könnte die Interaktion mit Mikrotubuli sein [Chien et al. 2009b; Chien et al. 2009a]. An Mammakarzinom-Zelllinien wurde zudem kürzlich gezeigt, dass die mit dem Verlust von HTRA1 einhergehende Steigerung von Migrations- und Invasionsfähigkeit mit einer epithelial-mesenchymalen Transition einhergeht [Wang et al. 2012]. Letztere führt zum Verlust von epithelialen Zellverbindungen und von Zellpolarität, zu für den HTRA1-Verlust mehrfach gezeigter Steigerung der Zellteilungsrate, der Invasivität und des Zellwachstums, aber auch zur Aktivierung von DNA-Schaden-Erkennungs- und Reparaturmechanismen, die wiederum zur Tumorprogression beitragen und eine Chemotherapie-Resistenz bewirken. Tatsächlich zeigten Ovar- und Magenkarzinome mit einer vergleichsweise niedrigen HTRA1-Expression ein schlechteres Ansprechen

auf Chemotherapeutika *in vitro* und *in vivo* [Catalano et al. 2011; Chien et al. 2006]. Auch wurde HTRA1 als Teil eines Gen-Trios beschrieben, dessen mRNA-Expression das Ansprechen auf Doxorubicin/Cyclophosphamid beim Mammakarzinom voraussagen konnte [Barros Filho et al. 2010]. Neben dem Chemotherapie-induzierten Zelltod wird auch eine Resistenz gegenüber der Anoikis (durch Ablösung epithelialer Zellen von der extrazellulären Matrix induzierte Apoptose) durch HTRA1-Herabregulierung beobachtet. So geht eine verminderte HTRA1-Expression mit einer verstärkten Aktivität im EGFR-Signalweg einher, was die Aussaat von Zellen außerhalb ihres epithelialen Verbands möglich macht [He et al. 2010]. Passend dazu wurden bei immunodefizienten Mäusen nach Injektion von Endometriumkarzinomzellen wesentlich mehr Lungenmetastasen nachgewiesen, wenn die Endometriumkarzinomzellen kein HTRA1 exprimierten [Mullany et al. 2011].

2 Zielsetzung

Zahlreiche Hinweise sprechen für eine Tumorsuppressor-Rolle der Serinprotease HTRA1, wie im Kapitel 1.3.3 (S.14ff.) näher dargestellt. So wurde eine Herab-Regulation der HTRA1-Expression im Vergleich zum gesunden Mamma-Gewebe für Brustkrebs-Zelllinien und Gewebe von in situ- bzw. invasivem Mammakarzinomen beschrieben [Chien et al. 2004; Wang et al. 2012]. Da in Studien zum Mesotheliom und hepatozellulären Karzinom sich zudem ein besserer Krankheitsverlauf bei hoher HTRA1-Expression zeigte [Baldi et al. 2008; Zhu et al. 2010], war die primäre Zielsetzung dieser Arbeit die Untersuchung der Frage, ob sich auch beim Mammakarzinom die Höhe der HTRA1-Expression im Primärtumor mit dem Rezidiv-Risiko bzw. dem Gesamtüberleben korrelieren lässt. Hierzu wurde die mRNA-Expression in Proben von 131 Mammakarzinom-Patienten untersucht sowie die gewonnenen Erkenntnisse mit Ergebnissen einer Analyse von 2829 Fällen aus einer öffentlich zugänglichen Online-Datenbank validiert.

Mit dem Einfluss der HTRA1-Expression auf den Krankheitsverlauf geht auch die Frage einher, wie die HTRA1-Expression gezielt verändert werden kann. Grundlegend hierfür ist eine genauere Kenntnis der Expressionsregulation. Es gibt Hinweise für epigenetische Regulations-Mechanismen durch DNA-Methylierung [Chien et al. 2004; Wang et al. 2012]. Mittels der Untersuchung der Promoter-Region von HTRA1 in zwölf Tumorproben und zwei Brustkrebs-Zelllinien mit jeweils unterschiedlicher HTRA1-Expressionshöhe auf DNA-Methylierung, wurde in dieser Dissertation diese Möglichkeit der epigenetischen Expressionsregulation evaluiert.

Eine verminderte HTRA1-Aktivität kann in Neuronen eine Überexpression des uPA-Inhibitors PAI1 auslösen [Launay et al. 2008]. Eine Überexpression von PAI1 ist mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf bei Brustkrebs-Patienten verbunden. Die Korrelation der HTRA1- und uPA/PAI1-mRNA-Expression war deshalb eine zusätzliche Fragestellung dieser Dissertation.

3 Material und Methoden

3.1 Proben und Patientenkollektive

3.1.1 Proben aus dem Universitätsklinikum Nijmegen, Niederlande

Über einer Kooperation mit Prof. Dr. Fred Sweep und Prof. Dr. Paul Span von der Radboud Universität Nijmegen, Niederlande, standen für diese Arbeit 131 Tumorproben von Mammakarzinom-Patientinnen zur Verfügung. Die Patientinnen waren im Zeitraum von 1986-1996 an fünf Krankenhäusern des *Comprehensive Cancer Center East* in den Niederlanden operiert worden. Klinische Daten wurden retrospektiv gesammelt. Das Tumorgrading wurde nach den Bloom-Richardson Kriterien [Bloom et al. 1957] und Tumorstadien nach dem TNM-System bestimmt. Die Studie wurde von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt.

Ein repräsentativer Teil des Tumors wurde von einem Pathologen ausgewählt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. An der Abteilung für Chemische Endokrinologie des Universitätsklinikums Nijmegen wurden der Hormonrezeptorenstatus (Östrogenrezeptor ER, Progesteronrezeptor PR) mit einem Ligandenbindungsassay [Span et al. 2003] bestimmt. Aus ungefähr 20g Gewebe wurde die gesamte RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers isoliert und cDNA mit dem Reverse Transcription System (Promega) oder dem cDNA-Cycle Kit (Invitrogen, Paisley, UK) hergestellt. Diese cDNA wurde in 1:3 Verdünnung aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die Auswahl der Gewebe für die Expressionsanalyse geschah nach Verfügbarkeit. Für die verwendeten Proben lagen Daten aus vorhergehenden Expressionsanalysen von Julia Biermann, Juliane Farthmann und Leon Holzscheiter in unserem Labor zu uPA, PAI-1, uPA-Rezeptor und den beiden Housekeeping-Genen G6PDH und β -Actin vor [Farthmann et al. 2004; Holzscheiter et al. 2006]

Patientinnen mit In-Situ-Karzinom, Fernmetastasierung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Rezidiv innerhalb eines Monats nach der Operation, einer Krebserkrankung in der Vorgeschichte oder Operation nach neoadjuvanter Behandlung wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Information über die Nachsorge war für alle Patientinnen vorhanden, es fehlten lediglich für zwei Patientinnen Angaben über den genauen Todeszeitpunkt. Die mediane Follow-Up-Zeit betrug 93,8 Monate, die maximale war 169,2 Monate. Während dieser Zeit kam es in 50 Fällen(38,1%) zum Rezidiv und zu 37 Todesfällen(28,7%). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug 85,3%(±3,2% Standardfehler) und die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit betrug 65,9(±4,9%). Ohne Rezidiv waren nach der Kaplan-Meier-Schätzung nach 5 Jahren noch 74,6%(±4,0%), nach 10 Jahren 54,5%(±5,2%). Die Wahrscheinlichkeit für kombiniertes krankheitsfreies Überleben (weder Tod noch Rezidiv) war nach 5 Jahren 71,5%(±4,0%) und nach 10 Jahren 50%(±5,0%). Zum Diagnosezeitpunkt betrug das Alter der Patientinnen 31 bis 85 Jahre (Median 61,7 Jahre). 23 Patientinnen(18%) waren unter 50 Jahre, für sie betrug die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 84,7%(±8,1%). 106 Patientinnen(82%) waren über 50 Jahre alt, für sie betrug die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit 86,3%(±3,4%). Von den 131 Patientinnen waren 38(29%) brusterhaltend therapiert und 93(71%) mastektomiert worden. Zusätzlich wurde eine Dissektion der axillären Lymphknoten vorgenommen. Bei 52 Patientinnen(39,7%) konnte kein Befall der axillären Lymphknoten festgestellt werden, für sie betrug für das kombinierte krankheitsfreie Überleben die 5-Jahreswahrscheinlichkeit 79,9%(±5,7%), die 10-Jahreswahrscheinlichkeit 56,5%(±7,8%). Für 19 Patientinnen(14,5%) lag keine Information über den Lymphknotenstatus vor. Adjuvante Therapie erfolgte nach den damaligen Therapiestandards, 61 Patientinnen(47%) erhielten keine adjuvante Therapie, 50(38%) erhielten ausschließlich endokrine Therapie, 20(15%) erhielten Chemotherapie, in 3 Fällen in Kombination mit endokriner Therapie.

Bei 60 Patientinnen(45,8%) wurde ein Tumorbefall der Lymphknoten nachgewiesen, hier lagen für alle Patientinnen Follow-Up-Daten vor. Die mediane Beobachtungszeit war 86,6 Monate, die maximale 169,2 Monate. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit war 82,3%(±5,1%), die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit war 68,1%(±6,8%). Die Wahrscheinlichkeit für

kombiniertes krankheitsfreies Überleben betrug nach 5 Jahren 67,9%(±6,1%), nach 10 Jahren 45,8%(±7,4%). Die Wahrscheinlichkeit für Rezidiv-Freiheit nach 5 Jahren betrug 70,3%(±6,0%), nach 10 Jahren 50,9%(±7,8%). Keine adjuvante Therapie erhielten 7 nodalpositive Patientinnen(12%), ausschließlich endokrine Therapie erhielten 35 Patientinnen(58%). Chemotherapie erhielten 18 Patientinnen(13%), davon 2 in Kombination mit endokriner Therapie.

Von zwölf Tumorgeweben wurde uns vom Universitätsklinikum Nijmegen zusätzlich DNA bereitgestellt. Diese wurden nach der HTRA1-Expressionshöhe ausgewählt. Es wurden Proben von je sechs Tumoren mit hohen und sechs Tumoren niedriger HTRA1-Expression untersucht.

3.1.2 Tumorbank Frauenklinik der TU München – Ovarialkarzinom

Für die Etablierung der Genexpressionsanalyse mit dem Taqman®-System wurden Proben von Ovarialkarzinomen aus der Tumorbank der Frauenklinik der TU München verwendet. Es wurden Proben von 18 Patientinnen untersucht. Dieses Kollektiv enthält Proben von einem Borderline-Tumor, 15 Primärtumoren und 3 Metastasen im Omentum majus von malignen epithelialen Ovarialkarzinomen. Die Patientinnen waren nach Standardmethode operiert worden und die Proben bei -80°C schockgefroren. Es war bereits in unserer Arbeitsgruppe gereinigte RNA hergestellt und deren Qualität überprüft worden.

3.1.3 Proben aus dem Universitätsklinikum Dresden

Durch die Kooperation mit der Klinik für Urologie (Direktor: Prof. Dr. M. Wirth) und dem Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. G. Baretton) der Universitätsklinik Dresden stand eine Reihe von Gewebeproben von Mammakarzinomen zur Verfügung. Für die vorliegende Arbeit wurden uns 39 cDNAs zur Verfügung gestellt (Herstellung vgl. [Luther et al. 2003]).

3.1.4 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- (1) MDA-MB 231: triple-negatives Adenokarzinom der Mamma, Zellen aus dem Pleuraerguss einer 51 jährigen Patientin isoliert [Cailleau et al. 1978]
- (2) MCF-7: Die Zellen wurden aus dem Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin mit rezidivierendem invasiv-duktales Mammakarzinom isoliert, es ist eine Hormonrezeptor-positive Zelllinie [Brooks et al. 1973, Levenson et al. 1997]
- (3) HEY: Diese Zelllinien stellte uns Prof. Dr. rer. nat. N. Arnold im Rahmen einer Kooperation mit dem Universitätsklinikum Kiel zur Verfügung. Ursprünglich stammen die Zellen aus einer Peritonealmetastase eines mäßig differenzierten Zystadenokarzinoms des Ovars und können sich in Mäusen mit geschwächtem Immunsystem vermehren. Aus einem solchen Xenograft, HX-62, wurde die Zelllinie etabliert. Eine gewisse Cisplatin-Resistenz ist bekannt [Buick et al. 1985]. Zusätzlich zum Wildtyp (WT) stand eine durch wiederholte Cisplatin-Behandlung völlig Cisplatin-resistente Variante zur Verfügung.

Die Mammakarzinom-Zelllinien wurden von American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA) erworben. Alle Zelllinien wurden von Mitarbeitern der Klinischen Forschungsgruppe (Prof. M. Schmitt) der Frauenklinik der TU München unter folgenden Bedingungen in Kultur gehalten: Zellkulturmedium RPMI 1640 mit Penicillin G (100U/ml), Streptomycin (100 mg/ml), L-Glutamin und 10% fetales Kälberserum (Invitrogen, Paisley, UK), bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre von 5% CO₂. Die Zellen wurden regelmäßig auf Mykoplasmen-Befall überprüft.

3.2 Geräte, Chemikalien und Kits

3.2.1 Geräte

- Taqman ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, Darmstadt
- Peltier Thermal Cycler PTC-200, Roche, Mannheim
- Vortex-Mixer 72020, neoLab, Heidelberg
- Sequenziergerät Genetic Analyser 3130x1, Hitachi, Applied Biosystems, Darmstadt

- Eppendor fzentrifuge Biofuge pico, Hereaus, Newport Pagnell, England
- Captair-bio, erlab, Köln
- Elektrophoresekammer GNA-100, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
- Elektrophoresekammer Compact XS/S, Biometra, Göttingen
- Foto-Dokumentations-System: UVsolo, Biometra, Göttingen
- Heraeus Multifuge 3 L-R, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
- Nanodrop ND3300, PeqLab, Erlangen

3.2.2 Labormaterial

- Pipetten Rainin, Giessen
- Biozym Safeseal tips premium 2,5µl, 10µl, 100µl, 1ml, Biozym, Wien, Österreich
- Multiscreen PCR Plate 96 wells, Millipore, Cork, Irland
- LightCycler 480Mutiweel Plate96 und Sealing Foil,Roche, Mannheim
- ABSolute QPCR Seal, ABgene, Epsom,UK
- 96 Weel QPCR Plate, peqlab, Erlangen
- PCR-Softstrips 0.2 ml, farblos, Biozym, Wien, Österreich
- PCR-Softtubes, 0.2 ml, einzeln, Biozym, Wien, Österreich
- EppendorgefäÙe 0,5 und 1,5ml
- Falcon tubes, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA

3.2.3 Chemikalien

- Soweit nicht anders angegeben wurde als H₂O verwendet: Aqua ad iniectabilia Diaco, Laborati Diaco Biomedical, Triest, Italien
- 10x TBE-Puffer:
 - 892 mM Tris 108 g (Roth, Karlsruhe)
 - 899 mM Borsäure 55 g (Serva, Heidelberg)
 - 25 mM EDTA 9,3 g (Sigma, Steinheim)
 - add 1 Liter Aqua bidest, pH 8,0
- Ethanol (Merck, Darmstadt)

-
- Agar zum Ausplattieren:
5g Trypton, 2,5g Hefeextrakt, 5g NaCl add 500ml Aqua bidest

3.2.4 Kits

- 1st Strand Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), Roche®, Diagnostics corp, Indianapolis, USA
- AmpliTaq Gold, PCR Puffer und Mg²⁺, Applied Biosystems®, Darmstadt
- Puregene – Genomic DNA Purification Kit, Qiagen®, Maryland, USA
- EpiTect Bisulfite Kit (48), Qiagen®, Hilden
- RNeasy RNA Isolation Kit, Qiagen®, Hilden
- Taqman® Universal PCR Master Mix, TaqMan® Gene Expression Assay; Applied Biosystems®, Darmstadt
- TOPO TA Cloning® Kit mit Vektor pCR®2.1-TOPO® und OneShot®TOP10' Chemically Competent *E. coli*, invitrogen®, Paisley, UK
- Hyper-Lader V, Bionline®, Luckenwalde

3.2.5 Software

- SPSS 17.0, SPSS GmbH Software, München
- Sequencing Analysis 5.3.1, Applied Biosystems®, Darmstadt
- Microsoft Excel 2007®
- Light Cycler® 480 Software release 1.5.0 SPR3, Roche®, Mannheim
- Genorm [Vandesompele et al. 2002]
- MethPrimer, online unter <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html> [Li et al. 2002]
- Abi Prism 7000 SDS Software, Applied Biosystems®, Darmstadt
- R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.)

3.3 Methoden

3.3.1 Agarose-Gele

Es wurden 1% und 2%ige Agarose-Gele hergestellt. Dann wurde 0,6g bzw. 1,2g Agarose(peqGOLD Universal Agarose, peqlab®, Erlangen) wurde mit 60ml TBE-Puffer(siehe 3.2.3, S. 24) für 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde zum Anfärben der DNA 20 µl Ethidiumbromid(1mg/ml, Carl Roth GmbH, Erlangen) hinzugefügt. In das gegossene Gel wurden 1 oder 2 Kämme mit 6 oder 11 Zinken gesteckt, je nach Bedarf. Die Gelelektrophorese wurde durchgeführt mit den unter Geräte genannten Elektrophoresekammern und den folgenden Einstellungen: 200mA, 90V, max. 300W. Zur Auswertung und Dokumentation wurden mit dem UVsolo digitale Photographien angefertigt.

3.3.2 RNA- und DNA-Konzentrationsbestimmungen

Zur Messung der Konzentration von RNA und DNA wurde das Spektralphotometer Nanodrop 3300 (peqlab, Erlangen) verwendet. Eingesetzt wurde nach Normierung des Geräts auf die Trägerflüssigkeit der RNA oder DNA eine Menge von 1-1,5µl. Das Gerät misst die Lichtabsorption der Probe über das Spektrum von 220-750nm Wellenlänge und gibt diese als Kurve wieder. Zusätzlich berechnet es automatisch je nach gewähltem Programm die RNA bzw. DNA-Konzentration aufgrund der Absorption bei 260nm. Da alle Nukleinsäuren Licht bei einer Wellenlänge von 260nm absorbieren, wird zusätzlich die Absorption bei 280nm gemessen, die sich für RNA und DNA wegen der unterschiedlichen Eigenschaften von Uracil und Thymin unterscheidet. Um die Reinheit von RNA bzw. DNA zu quantifizieren, wird der 260/280-Quotient(Absorption bei 260nm/Absorption bei 280nm) berechnet. Für RNA sollte dieser bei ca. 2 liegen, für DNA bei ca. 1,8. Die Reinheit von Nukleinsäuren generell wird mit dem 260/230-Quotient bestimmt. Sein Wert sollte etwa im Bereich von 2,0-2,2 liegen, höhere Werte zeigen die Kontamination einer Probe an [Thermo Scientific 2009]. In Tabelle 2 sind die gemessenen Werte für die DNA-Proben aus Nijmegen angegeben.

Tabelle 2 DNA aus Nijmegen: Konzentration und Quotienten mit Nanodrop 3300(PeqLab, Erlangen) in unserem Labor bestimmt

Tumor	DNA-Konzentration [µg/µl]	Quotient 260/280	Quotient 260/230
1	172,4	1,87	1,73
2	131,7	1,88	1,72
3	12,1	1,71	0,42
4	155,1	1,90	1,70
5	193,7	1,90	1,82
6	321,3	1,89	1,95
7	256,8	1,89	1,91
8	361,4	1,89	2,06
9	325,6	1,89	1,92
10	143,8	1,82	1,08
11	361,8	1,87	1,93
12	137,5	1,85	1,33

3.3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes *in vitro* durch die PCR ist seit ihrer Erstbeschreibung [Saiki et al. 1985] zu einer Standardmethode in molekularbiologischen Laboren geworden und bildet auch das Fundament dieser Arbeit. Sie liefert in vergleichbar kurzer Zeit ohne die aufwendige Vervielfältigung von Zellen große Mengen von Kopien des gewünschten DNA-Abschnitts. Zunächst werden zwei Oligonukleotide, die Primer, so gewählt dass sie die Zielsequenz flankieren. Der Reaktionsansatz mit einer hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase, den beiden Primern, Nukleosidtriphosphaten, Puffer, Mg-Ionen und der DNA-Probe durchläuft im Thermal-Cycler die Schritte:

- **Denaturation:** Durch Erhitzen werden die beiden Einzelstränge der DNA getrennt
- **Annealing:** Abkühlen und Binden die Primer
- **Elongation:** Eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert einen komplementären Strang

Bei jedem Schritt wird der durch die Primer bestimmten DNA-Abschnitt also idealerweise verdoppelt. Durch ca. 30- bis 50-fache Wiederholung der drei Schritte kommt es zur annähernd exponentiellen Vervielfältigung der DNA. Die genauen Protokolle mit Pipettierschemata sind in den Kapiteln

Genexpressionsanalyse mit dem Taqman-System (S. 28ff.) und DNA-Methylierung (S. 35ff.) angegeben.

3.3.4 Genexpressionsanalyse mit dem Taqman-System

Ziel der Expressionsanalyse ist es, Aussagen über die Transkriptionsrate eines Gens in einer Zelle machen zu können. Das Taqman-System beruht auf der oben beschriebenen PCR, erlaubt aber bereits während der Reaktion in Echtzeit die steigende Anzahl der Amplifikate mit zu verfolgen, deshalb auch die Bezeichnung „real-time-PCR“. Dazu sind die im Folgenden beschriebenen und in Abbildung 5 dargestellten Schritte notwendig.

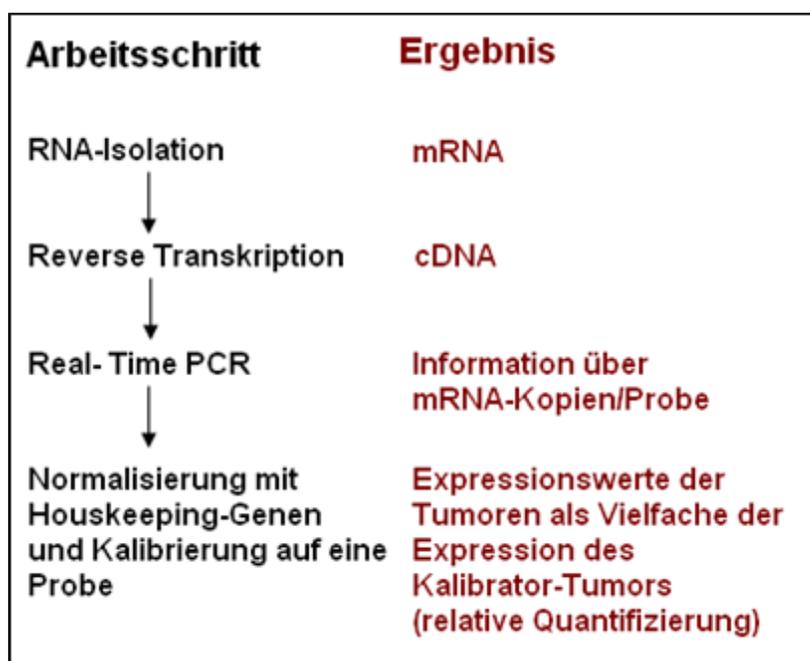


Abbildung 5 Übersicht Expressionsanalyse

3.3.4.1 RNA Isolation

In dieser Arbeit wurde aus den Zelllinien RNA selbst isoliert. Die Zellen wurden in der Neubauer-Kammer ausgezählt. Es wurden jeweils ca. 10^6 Zellen verwendet. Die folgenden Arbeiten fanden unter einer Abzugshaube, die speziell für diese Arbeiten reserviert war, statt, um die Kontamination mit den RNA-abbauenden Ribonukleasen (RNasen) so weit möglich zu vermeiden. Zur Denaturierung der zelleigenen RNasen

wurde ein Gemisch aus 1ml RLT-Puffer und 10µl β-Mercaptoethanol hergestellt. Von diesem wurde, nach Zentrifugieren der Zellen und Verwerfen des Überstands, den Zellen 350-650µl hinzugefügt. Anschließend konnten diese bei -80°C gelagert werden. Zur RNA-Gewinnung wurden die Zellen über eine QIAshredder Spin Column homogenisiert. Mit dem Qiagen RNeasy Kits wurde, dem „Protocol for Animal Cells“ [RNeasy Mini Handbook, June2001, S.31-35] folgend, die RNA isoliert und gereinigt. Dazu wurden eine Eppendorfzentrifuge und die im Kit enthaltenen Säulen und Lösungen verwendet. Die RNA wurde mit 30µl RNase-freiem H₂O ausgewaschen. Die Qualität der isolierten RNA wurde auf einem Agarose-Gel kontrolliert. Nach Messung der Konzentration mit dem Nanodrop(Peqlab, Erlangen) wurde die RNA in 1µg Mengen aliquotiert und bei -80° Grad gelagert.

3.3.4.2 Reverse Transkription

Da RNA nicht von der später eingesetzten DNA-Polymerase als Matrize erkannt wird, muss zunächst ein komplementärer DNA-Strang, die cDNA (von Englisch „*complementary DNA*“) erzeugt werden. Eingesetzt wurde jeweils 1µg RNA. Mit dem *1st Stand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR(AMV)* (Roche, Indianapolis, USA) wurde cDNA zu dem RNA-Gemisch aus den Zelllinien nach beiliegender Anleitung hergestellt. Darunter befinden sich auch jene mRNA-Moleküle, die für das Protein HTRA1 bzw. die für die spätere Normalisierung gemessenen Gene kodieren. Für die Ovarialkarzinom-Proben wurde das Pipettierschema minimal abgewandelt (siehe Tabelle 3): 1µg RNA wurde in 10µl statt 8,2µl eingesetzt, so dass auch etwas weniger konzentrierte Proben für das Experiment genutzt werden konnten.

Tabelle 3 Pipettierschema Reverse Transkription Ovarialkarzinom

<i>Substanz</i>	<i>Volumen</i>	<i>Endkonzentration</i>
10x Reaction Buffer	2µl	1x
MgCl ₂	4 µl	4,6mM
dNTP	2 µl	0.9mM
Random Primer	1 µl	0.08 A ₂₆₀ Units
RNase Inhibitor	1 µl	50 Units
AMV Reverse Transkriptase	0.8 µl	≥20 Units
RNA (1µg)	10 µl	1 µg/21,8µl
Gesamt	21,8µl	

3.3.4.3 Real-Time-PCR

Um die Menge an HTRA1 cDNA-Molekülen in den Proben vergleichen zu können, verwendet das TaqMan®-System Sonden, die während der PCR abgebaut werden und dann ein Fluoreszenz-Signal abgeben. Die Sonden aus DNA sind komplementär zu einem Teil der Zielsequenz und enthalten einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff am 5' und einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende. Letzterer unterdrückt durch Fluoreszenz-Energietransfer die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes, solange Quencher und Reporter sich räumlich nahe sind. Das 3'-Ende der Sonde ist durch einen Phosphatrest blockiert, so dass sie nicht als Primer wirken kann. Während der Elongationsphase wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase abgebaut. Dann sind Reporter-Farbstoff und Quencher nicht mehr aneinander gekoppelt und der Reporter-Farbstoff kann nun zum Fluoreszieren angeregt werden (siehe auch Abbildung 6). Mit jedem Zyklus der PCR steigt jetzt auch die Anzahl der freigesetzten Reporter-Moleküle und somit die gemessene Fluoreszenz.

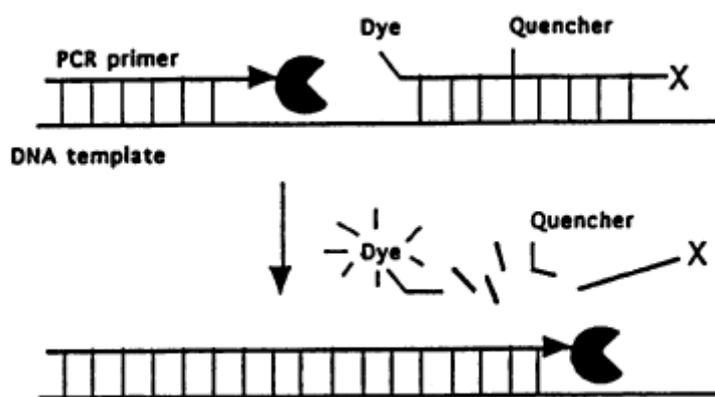


Abbildung 6 Prinzip der Sonden-Hydrolyse und Freisetzung des Reporter-Moleküls (adaptiert aus [Lee et al. 1993])

Für die Durchführung wurde die aus 1 µg RNA gewonnene cDNA in 5 µl aliquotiert und mit H₂O je nach Gewebe (siehe Ergebnisteil) verdünnt. Dann wurde in eine 96-well Platte (peqlab, Erlangen) zunächst 3 µl der verdünnten cDNA vorgelegt. Von jeder Probe wurde Duplikate oder Triplikate gemessen. Zusätzlich wurde auf jeder Platte eine Probe reines H₂O pro verwendeten Assay zur Kontrolle von Verschmutzungen oder nicht-spezifischer Amplifikation mit gemessen. Auf Eis wurde

im abgedunkelten Laborraum ein Mix aus Taqman® Universal PCR Master Mix, TaqMan® Gene Expression Assay (beides Applied Biosystems, Darmstadt), H₂O hergestellt und auf die cDNA pipettiert. Der Taqman Gene Expression Assay beinhaltet Primer und Sonde für die Real-Time-PCR und macht die Reaktion spezifisch für ein Zielgen. Die verwendeten Assays sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 Verwendete Taqman® Gene Expression Assays

Gen	Abkürzung	Sequenz der Sonde	Assay ID
HTRA serine peptidase 1	HTRA1	GACCGACAGGCCAAAGGAAAAGCCA	Hs01016151_m1
hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1	HPRT1	ATGGTCAAGGTCGCAAGCTTGCTGG	Hs99999909_m1

Von dem hergestellten Mix wurde auf jede cDNA-Probe 27 µl gegeben. Insgesamt wurde so nach folgenden Pipettierschema gearbeitet:

Tabelle 5 Pipettierschema Real-Time-PCR

Substanz	Volumen [µl]
Taqman® Universal PCR Master Mix 2x	15
Taqman® Gene Expression Assay 20x	1,5
H ₂ O	10,5
cDNA	3
Gesamt	30

Die Platte wurde mit der Folie *ABsolute QPCR Seal* (ABgene, Epsom, UK) verschlossen, durch sanftes Schütteln gemischt und mit der Heraeus Multifuge 3 L-R (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) für eine Minute bei 1000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, um blasenfreie, am Boden der Platte gesammelte Proben zu erhalten. Die Platte wurde dann in den Taqman ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) eingebracht. Das ist ein Gerät, das auf der einen Seite als Thermal Cycler arbeitet, also die PCR über Temperaturänderung (siehe Tabelle 6) ablaufen lässt, und gleichzeitig Fluoreszenz-Messungen über die gesamte PCR hinweg durchführt.

Mit Hilfe des Programms *Abi Prism 7000 SDS Software* (Applied Biosystems, Darmstadt) wurde die Probenverteilung auf der Platte, das Ziel-Gen und der Typ des

Fluoreszenz-Farbstoffes vorgegeben, das PCR-Programm definiert und gestartet. Als Reporter wurde der von Applied Biosystems empfohlene Fluoreszenz-Farbstoff 6-Carboxy-Fluorescein(FAM) und als Quencher 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin eingesetzt.

Tabelle 6 PCR-Programm Taqman®

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer
1	50	2 min
2	95	10 min
3	95	15 sec
4	60	1 min
5	Go to 3, 45 times	
6	60	1 min

3.3.4.4 Bearbeitung der Messdaten

Die Rohdaten des Taqman ABI PRISM 7700 Sequence Detection System sind Punktekurven für jede Probe auf der Platte: das Reportersignal ΔR_n im jeweiligen PCR-Zyklus (siehe auch Abbildung 7). Die gemessene Fluoreszenz wird als an die Hintergrund-Fluoreszenz angeglichenes normalisiertes Reportersignal, ΔR_n dargestellt. Dieser Wert setzt sich wie folgt zusammen:

1. Das normalisierte Reportersignal, R_n , ist der Quotient aus gemessener Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffs und der gemessenen Emissions-Intensität eines im Assay enthaltenen passiven Referenzfarbstoffs. Durch diesen Normalisierungsschritt sollen unspezifische Einflüsse, wie etwa Schwankung der Volumina durch Pipettierfehler ausgeglichen werden.
2. In den ersten Zyklen der PCR (Phase A in Abbildung 7) wird ein Hintergrundsignal erstellt, um weiter Schwankungen auszugleichen. Dieser wird von R_n abgezogen, so erhält man ΔR_n .

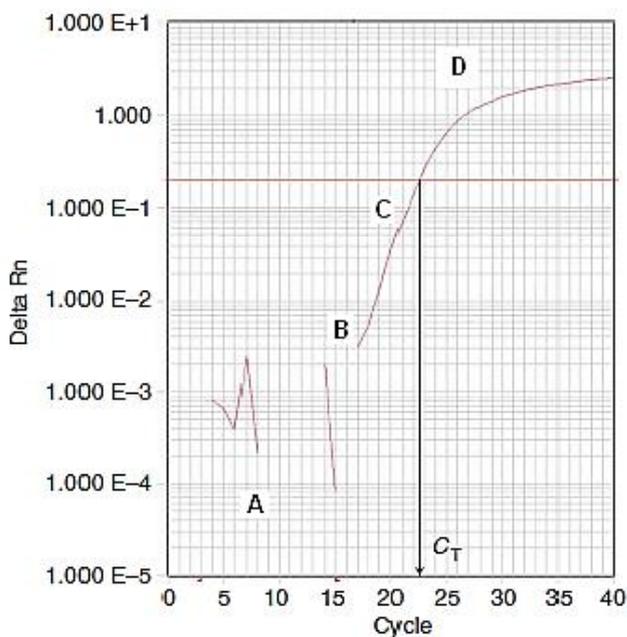


Abbildung 7 Phasen der PCR und Ct; A: Anfangsphase, B: Exponentielle Phase, Phase C: Lineare Phase, Phase D: Plateau-Phase in der sich die Reagenzien erschöpfen (Adaptiert aus [Schmittgen et al. 2008])

Diese Menge ΔR_n an gemessener Fluoreszenz entspricht einer bestimmten Menge DNA-Kopien. Um die Anfangszahl an cDNAs der Proben zu vergleichen legt man nun einen Wert für ΔR_n fest und bestimmt für jede Probe den PCR-Zyklus in dem sie diesen Wert erreichen. Dieser PCR-Zyklus heißt *threshold cycle*, C_t (vgl. Abbildung 7). Verglichen wird also, nach wie vielen PCR-Zyklen in jeder Probe eine bestimmte Menge DNA-Kopien vorliegen. Bei einer Effizienz E von 100% verdoppelt sich die Zahl der DNA-Kopien in jedem Zyklus. Somit gilt für die Anzahl der DNA-Kopien x_n im Zyklus n bei einer anfänglichen Anzahl der DNA-Kopien x_0 :

$$(1) x_n = x_0 \cdot 2^n$$

Ist die x_n nun für alle Proben gleich und C_t der zugehörige PCR-Zyklus n , so gilt für zwei Proben A und B:

$$(2) x_{0\text{ProbeA}} \cdot 2^{C_t\text{ProbeA}} = x_{0\text{ProbeB}} \cdot 2^{C_t\text{ProbeB}}$$

$$(3) x_{0\text{ProbeA}} / x_{0\text{ProbeB}} = 2^{C_t\text{ProbeB}} / 2^{C_t\text{ProbeA}} = 2^{C_t\text{ProbeB} - C_t\text{ProbeA}}$$

So gelingt über den C_t -Wert eine relative Quantifizierung: Ist der C_t -Wert der Probe A z.B. um 1 Einheit höher als der der Probe B, so waren in der Probe A halb so viele DNA-Startkopien.

3.3.4.5 Normalisierung mit Housekeeping-Gen-Expression

Für den Vergleich der Expression eines Gens zwischen verschiedenen Tumorproben wäre die Expression bezogen auf eine bestimmte Anzahl Zellen ideal, technisch ist dies aber gerade bei soliden Tumoren sehr schwierig. Für die Expressionsanalyse ist es also wichtig, die Unterschiede in ursprünglicher Zellzahl, Qualität der isolierten mRNA und mengenmäßige Schwankungen bei der Isolation der mRNA durch einen Normalisierungsschritt auszugleichen. Eine Möglichkeit hierbei ist die Normalisierung gegen die Expression von sogenannten „Housekeeping-Genen“. Dies sind Gene, die für den Grundumsatz einer Zelle wichtig sind, somit idealerweise keiner Regulation unterliegen und in allen Zellen gleich exprimiert werden. Als Housekeeping-Gen wurde die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) gemessen, die in einer Arbeit von de Kok et al. als stabilstes unter 13 Housekeeping-Genen identifiziert worden war [Kok et al. 2004]. Für die Normalisierung der Nijmegen-Proben wurde die G6PDH (Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase) als Housekeeping-Gen verwendet, das es für die Normalisierung der Gen-Expression bei Mammakarzinom-Proben als geeignet beschrieben ist [Farthmann et al. 2004]. Es gibt kein perfektes Housekeeping-Gen, das in jeder Zelle genau gleich exprimiert wird, sondern hier ist immer mit einer Fehlerquelle zu rechnen.

Nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode [Livak et al. 2001] werden für jede Probe Ct-Werte von Zielgen und Housekeeping-Gen (HG) bestimmt.

$$(4) \quad X_{0\text{ProbeA}} / X_{0\text{ProbeB}} = 2^{(C_t \text{ Zielgen B} - C_t \text{ HG B}) - (C_t \text{ Zielgen A} - C_t \text{ HG A})}$$

Oder als $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formuliert:

$$(5) \quad X_{0\text{ProbeA}} / X_{0\text{ProbeB}} = 2^{-(C_t \text{ Zielgen A} - C_t \text{ HG A}) - (C_t \text{ Zielgen B} - C_t \text{ HG B})}$$

Um die relative Expression mehrere Proben auszudrücken, wird eine Probe als Kalibrator-Probe definiert, deren relative Expression gleich 1 gesetzt wird. Alle anderen werden analog zu Formel (5) in Relation zu dieser Probe gesetzt:

$$(6) \quad X_{0\text{ProbeA}} / X_{0\text{Kalibrator}} = 2^{-(C_t \text{ Zielgen A} - C_t \text{ HG A}) - (C_t \text{ Zielgen Kalibrator} - C_t \text{ HG Kalibrator})}$$

3.3.5 DNA-Methylierung

3.3.5.1 Konversion

Grundlegend für die spätere Erkennung methylierter CpG-Dinukleotiden ist die Bisulfit-Konversion. Eine Inkubation von DNA mit Natriumbisulfit führt zu einer Umwandlung der Base Cytosin zu Uracil. Ist jedoch das Cytosin methyliert, bleibt es ein Cytosin, es ist also vor einer Umwandlung „geschützt“. Die möglichst vollständige Konversion der nicht-methylierten Cytosine wird über eine hohe Konzentration von Natriumbisulfit und einen niedrigen pH erreicht. Die so behandelte DNA muss anschließend gereinigt werden, da die eingesetzten Reagenzien spätere Arbeitsschritte stören. Die DNA wird durch die Behandlung geschädigt und fragmentiert. Die zu erwartende Fragmentlänge reicht von unter 500bp, z.B. bei DNA aus Formalin-fixierten Geweben, bis zu 30kb, wenn die DNA aus frischem Material oder Blut isoliert wurde. Dies muss bei späteren Reaktionen, insbesondere bei der Primer-Auswahl für die darauffolgende PCR berücksichtigt werden. Es wurden jeweils 500ng DNA pro Umwandlung eingesetzt. Mit dem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden) wurde dem zugehörigen Manual folgend die DNA behandelt und über Waschsäulen gereinigt. Die gereinigte DNA wurde mit 40µl TRIS-basiertem Puffer ausgewaschen.

3.3.5.2 Untersuchte DNA-Abschnitte, PCR

Es wurden drei Abschnitte um den mRNA-Anfang von HTRA1 sequenziert: UP, mRNAstart und DOWN, wie in der folgenden Abbildung gezeigt:

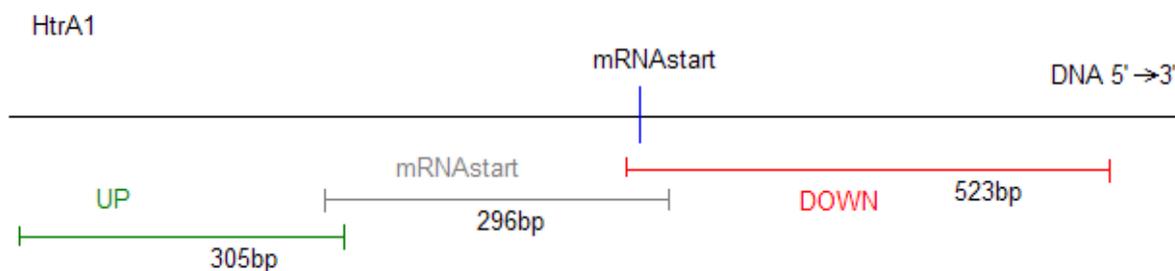


Abbildung 8 Schematische Darstellung der untersuchten DNA-Abschnitte

Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, um die entsprechenden Bereiche zu amplifizieren. Die Primer wurden mit Hilfe des Programms MethPrimer [Li et. al 2002] so gelegt, das CpG-Dinukleotide höchstens am 5'-Ende zu liegen kamen, um ein

Binden der Primer unabhängig der Cytosin-Methylierung zu gewährleisten. Selbstverständlich muss bei der Primerwahl berücksichtigt werden, dass alle Cytosine außerhalb CpG-Dinukleotiden mit hoher Wahrscheinlichkeit in Uracil umgewandelt wurden. Als Primer eingesetzt wurden:

Tabelle 7 Primer für die Sequenzierung, die angegebene Schmelztemperatur T_m aus Herstellerangaben

<i>Amplifikat</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>	<i>T_m [°C]</i>
UP	mHTRA1upstream_for	5'-TAT TAT TTT ATT GTG GGT TTG GG-3'	56,0
	mHTRA1upstream_rev	5'-TCC TTC AAA CTA ATA AAA CTT TAC-3'	57,0
mRNAstart	mHTRA_neufor	5'-TTT GTA AAG TTT TAT TAG TTT GAA GGA-3'	58,0
	mHTRA_start rev	5'-GAC CCA ACC CAT TAA CCT C-3'	57,0
DOWN	mHTRA_start for	5'-CGA GGT TAA TGG GTT GGG T-3'	57,0
	mHTRAdown_rev	5'-CGC AAC TAA CAC AAA TTA AC-3'	52,0

Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 8 Pipettierschema PCR vor der Sequenzierung

<i>Substanz</i>	<i>Volumen [µl]</i>	<i>Stockkonzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>
Puffer 10x	5	10x	1x
MgCl ₂	2	25mM	1mM
dNTP	5	2mM	0,2mM
Primer forward	2	10pmol/µl	0,4pmol/µl
Primer reverse	2	10pmol/µl	0,4pmol/µl
H ₂ O	30,6		
AmpliTaQ Gold	0,4	>5Units/µl	>0,04Units/ µl
DNA	3		
Gesamt	50		

Die PCR für die Bereiche „UP“ und „mRNA“ Start wurde nach dem Protokolle einer Touchdown-PCR (vgl. Tabelle 9) durchgeführt, bei der zunächst durch eine hohe Annealing-Temperatur die Spezifität der Primer-Bindung an die DNA erhöht wird. Diese wird zunächst schrittweise erniedrigt. In einem zweiten Abschnitt werden die gewonnenen Produkte weiter amplifiziert. Da man davon ausgeht, dass die

Polymerase die bereits entstandenen Amplifikate der eingesetzten DNA vorzieht und so die Spezifität ein geringeres Problem darstellt, kann eine niedrige Annealing-Temperatur zur Verbesserung der Ausbeute verwendet werden.

Tabelle 9 PCR-Protokoll für die Bereiche "UP" und "mRNA-START"

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer
1	95	10 min
2	95	30 sec
3	68, -1°C pro Zyklus	30 sec
4	72	45 sec
5	Go to 2, 13 times	
6	95	30 sec
7	52	30 sec
8	72	45 sec
9	Go to 6, 35 times	
10	72	10 min
11	10	10 min

Für den Bereich „DOWN“ wurde das Programm wie in Tabelle 10 dargestellt abgewandelt, da die Primer niedrigere Schmelztemperaturen T_m (siehe Tabelle 7) aufwiesen. Trotz dieser Anpassung entstand bei der PCR aber immer noch ein zweites, kürzeres Produkt.

Tabelle 10 PCR-Protokoll für den Bereich "DOWN"

Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer
1	94	10 min
2	94	30 sec
3	53	30 sec
4	72	1 min
5	Go to 2, 45 times	
6	72	10 min
7	4	“For ever”

Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel (TBE-Puffer, 2% Agarose) überprüft. Dazu wurden 3µl des PCR-Produkts verwendet. Die restlichen 47µl wurden über eine *Multiscreen PCR Plate 96 wells* (Millipore, Cork, Irland) gereinigt. Dazu wurde auf eine solche Platte 120µl H₂O vorgelegt, die 47µl PCR-Produkt hinzugefügt und ein für 8 min mit einer Vakuumpumpe das PCR-Gemisch durch die *Millipore*-Platte gezogen. Im Gegensatz zu den viel kleineren Primern und PCR-

Reagenzien werden die DNA-Kopien an der Membran dieser speziellen Filter-Platten zurück gehalten und konnten so in 30µl H₂O wieder aufgenommen werden. Eine zweite Gelelektrophorese kontrollierte diesen Schritt, wobei die Intensivität der einzelnen Banden zusätzlich als Anhalt dafür diente, wie viel Material später in der Kapillarelektrophorese zur Sequenzierung eingesetzt werden musste.

3.3.5.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Fragmente erfolgte mit Hilfe der Kettenabbruchmethode nach Sanger [Sanger et al. 1977]. Grundlage bildet die PCR, allerdings wird nur ein Primer verwendet, so dass alle Amplifikate die gleiche Syntheserichtung aufweisen. Zusätzlich werden Didesoxynukleotide verwendet, um an einer zufälligen Stelle in dem von der DNA-Polymerase synthetisierten Strang einen Abbruch der Verlängerung herbeizuführen. In der verwendeten Version sind die Didesoxynukleotide mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Fragmente werden in der Kapillarelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt. Das jeweils letzte Nukleotid gibt durch die Fluoreszenz-Markierung den Typ der Base an. Die Sequenz kann vom kürzesten zum längsten Fragment oder umgekehrt abgelesen werden.

Für die Kettenabbruch-PCR wurde 8µl des gereinigten PCR-Produkts mit 1,7µl Big Dye(Applied Biosystems, Darmstadt) und 0,4µl Primer versetzt. Nach dieser modifizierten PCR mussten die Fragmente über eine Ethanol-fällung gereinigt werden. Dazu wurde 125µl Ethanol 77% zum Produkt gegeben und nach 15min für 10 min bei 13x10³rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene Pellet erneut mit 125µl Ethanol 77% gewaschen und wieder für 10 min bei 13x10³rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit Hilfe eines Vakuumzentrifugationssystems wurde das Pellet getrocknet und dann die Fragmente in 80µl H₂O resuspendiert. Davon wurden je nach Bandenintensität nach Aufreinigung der DNA (siehe 3.3.5.2, S.35) 2-25µl mit H₂O auf 25µl ergänzt. Die Kapillarelektrophorese erfolgte schließlich automatisiert im Genetic Analyser 3130x1(Hitachi/Applied Biosystems, Darmstadt). Für das Auslesen und die Darstellung der Daten wurde die Software Sequencing Analysis 5.3.1(Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet.

3.3.5.4 Klonierung

Klonierung ist die Vermehrung von DNA-Kopien in Wirtszellen. Diese Methode ist sehr viel aufwendiger als eine PCR, hat aber für die Untersuchung von DNA-Methylierung einen wesentlichen Vorteil: Die aus dem Tumor isolierte DNA stammt von verschiedenen Tumor- und auch Stromazellen, die verschiedene Methylierungsmuster der DNA aufweisen. Durch das Einbringen einer Kopie in eine Wirtszelle und Vermehren dieser Wirtszelle gelingt es, die DNA einer einzigen Zelle zu betrachten. Durch die Analyse mehrerer solcher Wirtszellen lassen sich im Tumor häufiger vorkommende Muster erkennen und der Anteil von Zellen im Tumor mit DNA-Methylierung an einer definierten Stelle in der Sequenz abschätzen.

Für die Methylierungsanalyse wurde zunächst, wie unter 3.3.5.1 und 3.3.5.2 (S. 35 bzw. 35) beschrieben, die Bisulfit-Konversion der DNA und die PCR des entsprechenden DNA-Abschnitts durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde wie dort beschrieben über eine *Multiscreen PCR Plate 96 wells* (Millipore, Cork, Irland) gereinigt, aber in nur 20 µl H₂O wieder aufgenommen, um die Konzentration an DNA zu erhöhen. Es ist essentiell bei dieser PCR eine Taq-DNA-Polymerase zu verwenden, da diese an das 3'-Ende einer DNA-Kopie ein zusätzliches Adenosin anhängt. Dieser 3'-A-Überhang ist komplementär zu beiden Enden des Vektors pCR®2.1-TOPO®. Über den Ligationsprozess entsteht ein DNA-Ring, ein Plasmid, das bei Prokaryonten als extrachromosomale DNA vorliegt und bei der Zellteilung gewöhnlich mit repliziert wird. Der Ligationsansatz wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 11 Pipettierschema Ligationsansatz

<i>Substanz</i>	<i>Volumen[µl]</i>
Gereinigtes PCR-Produkt	4
Salzlösung(1.2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)	1
pCR®2.1-TOPO®	1
Gesamt	6

Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ligationsansatz auf Eis gestellt. Über den Ligationsprozess sind die Plasmide entstanden, von denen einige die zugegebene DNA enthalten. Parallel dazu wurden die kompetenten Zellen *One*

Shot® Top10F' Competent Cells(invitrogen™, Paisley, UK) auf Eis aufgetaut. Diesen Zellen wurde dann 3µl der Plasmid-Lösung hinzugefügt. Für das Gelingen der Transformation (der Aufnahme der Plasmide) wurde nach 20 min Inkubation auf Eis den Zellen im 42°C warmen Wasserbad ein Hitzeschock versetzt. Danach wurden die Zellen sofort zurück auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in 250µl des Nährmediums S.O.C.-Medium(invitrogen™, Paisly, UK) gelöst und mit einer großen, unten abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig in ein Falcon Tube überführt. Eine Stunde Inkubation bei 37°C und ständigen Schütteln(220rpm) diente zur Regenerierung der Zellen. In dieser Zeit begannen auch die Bakterien, die ein Plasmid mit dem Resistenzgen aufgenommen hatten, das für die Ampicillin-Resistenz verantwortliche Enzym zu produzieren. Die Bakterienkultur wurde anschließend auf zwei vorgewärmte Agar-Platten 200µl bzw. 50µl der Bakterienkultur ausplattiert und diese ca. 12h bei 37°C inkubiert. Die Agarplatten enthalten Ampicillin, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid(IPTG) und X-Gal(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosid). Ampicillin selektiert Bakterien, die ein Plasmid mit Resistenzgen aufgenommen haben. IPTG induziert in den Bakterien das Enzym β-Galaktosidase, das X-Gal spaltet, eines der Produkte ist ein blauer Farbstoff. Das Gen für die β-Galaktosidase enthält die Stelle an der das PCR-Produkt in das Plasmid eingebaut wird. Bei einer erfolgreichen Ligation des PCR-Produkts in das Plasmid wird das Gen zerstört. Diese Klone bleiben weiß, während Klone die zwar ein Plasmid aufgenommen haben und so Ampicillin-resistent sind, aber deren Plasmid kein PCR-Produkt enthält, sich blau verfärben. Von den weißen Klonen wurden 20-25 mit Hilfe einer Pipettenspitze in je ein Eppendorfgefäß mit 200µl H₂O überführt. Nach 10 min bei 95°C im Thermal Cycler (Peltier Thermal Cycler PTC-200, Roche, Mannheim) zur Denaturierung der Zellen wurde eine PCR nach folgendem Pipettierschema und Temperaturprotokoll angesetzt:

Tabelle 12 Pipettierschema der PCR nach Klonierung

<i>Substanz</i>	<i>Volumen[µl]</i>	<i>Stockkonzentration</i>	<i>Endkonzentration</i>
Puffer 10x	3	10x	1x
MgCl ₂	1,2	25mM	1mM
M13 Primer forward	1,2	10pmol/µl	0,4pmol/µl
M13 Primer reverse	1,2	10pmol/µl	0,4pmol/µl
dNTP	3	2mM	0,2mM
AmpliTaQ Gold	0,1	>5Units/µl	>0,04Units/ µl
Denaturierte Zellen	3		
H ₂ O	17,3		
Gesamt	30		

Tabelle 13 Protokoll der PCR nach Klonierung

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur [°C]</i>	<i>Zeitdauer</i>
1	95	10 min
2	95	30 sec
3	58	30 sec
4	72	45 sec
5	Go to 2, 38 times	
6	72	10 min
7	10	10 min

Mit dem Produkt dieser PCR wurde, wie unter 3.3.5.3 (S.38) beschrieben, eine Sequenzierung vorgenommen. Als Primer bei der Kettenabbruch-PCR wurde der M13-forward-Primer verwendet.

3.4 Statistische Auswertung

3.4.1 Auswertung des experimentellen Teils

Zur Berechnung der relativen mRNA-Expressionswerte für HTRA1 mittels Normalisierung gegen das entsprechende Housekeeping-Gen, HPRT oder G6PDH, wurde Microsoft Excel 2003 und 2007 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Softwarepaketen SPSS für Windows Version 17.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA) und R (R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>). Korrelationen der Messung der HPRT-Werte mit dem Taqman- und Lightcycler-System sowie die Korrelation der Expression von HTRA1 und PAI1, uPA und uPA-Rezeptor wurden nach der Methode von Spearman berechnet, da nicht von einer Normalverteilung der verschiedenen Variablen ausgegangen werden konnte. Die Normalverteilungsannahme wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. In durch klinisch-pathologische Parameter definierten Gruppen wurde der Unterschied der HTRA1-Expression mit dem Mann-Whitney-U-Test und dem Kruskal-Wallis-Test, je nach Anzahl der zu vergleichenden Gruppen, geprüft. Cox-Regressionsmodelle wurden verwendet um den multivariablen Einfluss von potentiellen Erklärungsvariablen hinsichtlich des Sterbe- bzw. Rezidivrisikos zu untersuchen. Im Zuge dieser Analysen wurden Schätzungen für das relative Risiko (Hazard Ratio) mit 95% Konfidenzintervall berichtet. Mit der Methode nach Kaplan-Meier wurden die univariaten Sterberaten von Patienten in Abhängigkeit von hoher oder niedriger HTRA1-Expression berechnet und dargestellt. Um auf statistisch signifikante Unterschiede von Überlebenskurven unabhängiger Patientengruppen zu prüfen, wurde der Log-Rank-Test verwendet. Um optimale Cut-off Werte für die HTRA1-mRNA-Expression als quantitative Prädiktorvariable hinsichtlich der Patientenprognose (Sterbe- bzw. Rezidivrisiko) zu erlangen, wurde die R-Funktion `maxstat.test` [Hothorn et al. 2002] verwendet. Diese Funktion berücksichtigt die Problematik des multiplen Testens und gibt entsprechend adjustierte p-Werte aus. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig zu einem Signifikanzniveau von 5% vorgenommen, eine Korrektur von p-Werten für multiples Testen wurde zumindest im Rahmen der Cut-off Bestimmung berücksichtigt.

3.4.2 Auswertung der GEO-Daten

Die GEO (*Gene Expression Omnibus*) Datenbank sammelt Expressionsdaten aus Array- und Sequenz-Analysen gekoppelt an klinische Information. Für die Datenauswahl und -analyse in diese Arbeit wurde die Anwendung KM-Plotter eingesetzt. Sie basiert auf Daten aus der GEO-Datenbank von zwei Affymetrix-Microarrays (HGU133A und HGU133 plus 2.0). Die Anwendung verwendet einen Grunddatensatz aus klinischer Information zu 2887 Mammakarzinom-Patienten und den zugehörigen Microarray-mRNA-Expressionsdaten. Die Microarray-Daten wurden auf Qualität geprüft und normalisiert. Von den 22277 Sonden, die auf beiden verwendeten Microarrays zu finden sind, kann nach Gen-Name oder Affymetrix-ID ausgewählt werden. Die Patienten werden nach der Höhe der mRNA-Expression in zwei Gruppen geteilt und es wird eine Kaplan-Meier Analyse zu Sterberate, Rezidivrate oder Fernmetastasierungsrate erstellt. Dabei werden auch relatives Risiko (Hazard Ratio, HR) mit 95%-Konfidenzintervall (95%KI) und das Signifikanzniveau logrank p berechnet [Györfy et al. 2010]. Die Affymetrix-ID der HTRA1 Sonde ist 201185_at. Es wurden Daten der Version 2012 verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse HTRA1

4.1.1 Methodenetablierung der mRNA-Expressionsanalyse

4.1.1.1 Standardkurven

Für die verwendeten Taqman-Assays wurden Standardkurven zur Berechnung der PCR-Effizienz erstellt. Die Standardkurven belegen auch eine Konstanz der Messergebnisse bei unterschiedlicher cDNA-Konzentration. Dafür wurden Verdünnungen der cDNA von jeweils zwei Tumorproben hergestellt: für die Ovarialkarzinom-cDNA waren diese 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:2000; für die Mammakarzinom-cDNA aus dem Kollektiv Dresden waren sie 1:20, 1:200, 1:2000 und 1:4000. Alle Proben wurden in Triplikaten mit den entsprechenden Taqman-Assays, wie in 3.3.4.3 beschrieben (vgl. S.30ff.), gemessen. Die aus den Werten mit Microsoft Excel erstellten Standardkurven sind für jeweils ein Ovarial- und ein Mammakarzinom in Abbildung 9 und Abbildung 10 nach logarithmischer Transformierung zur Basis 10 der Verdünnung dargestellt.

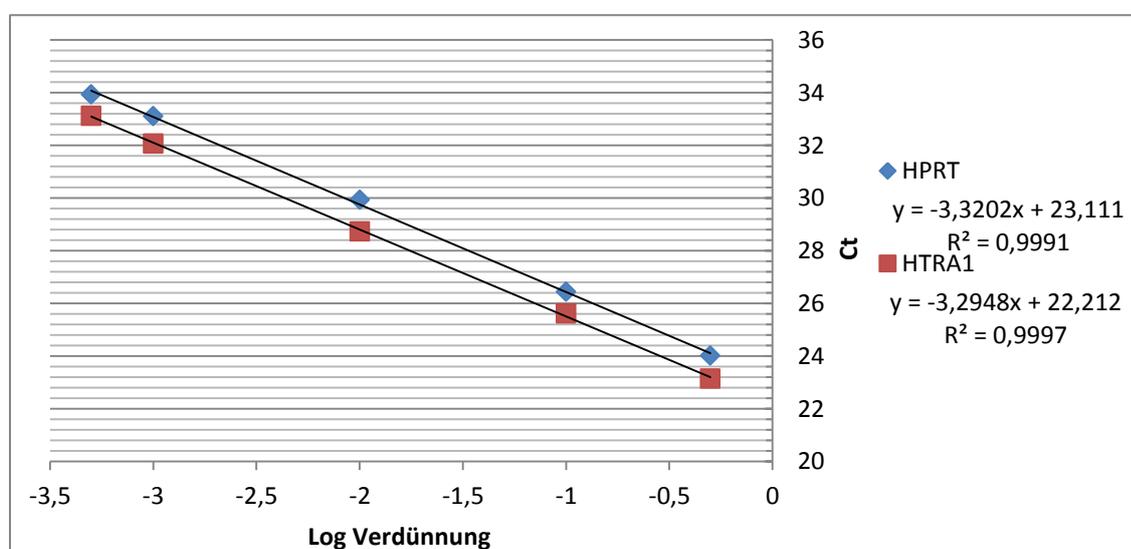


Abbildung 9 Standardkurve für Ovarialkarzinom-Probe 29984

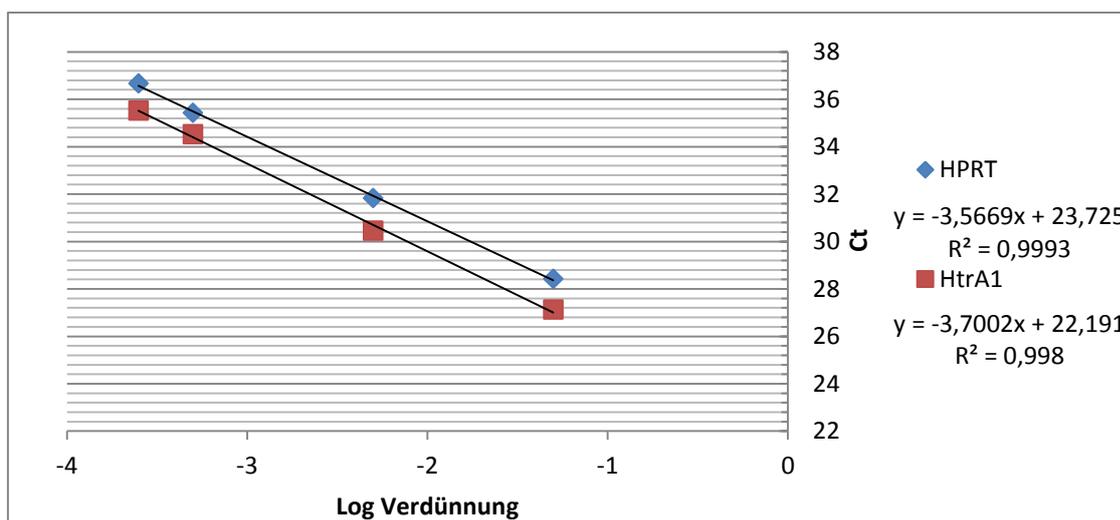


Abbildung 10 Standardkurve für Mammakarzinom-Probe 131

Eine lineare Funktion der Verdünnungskurven über einen weiten Konzentrationsbereich spricht für eine gute Vergleichbarkeit von Proben mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen, wie sie für ein Tumorsuppressor-Gen in verschiedenen Tumorproben zu erwarten ist. Aus der Steigung s der sich ergebenden Geraden lässt sich die Effizienz E über folgende Formel [Wong et al. 2005] berechnen:

$$(7) E = 10^{(-1/s)} - 1$$

Für die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode zur Berechnung der relativen Expressionswerte ist es wichtig, dass die PCR-Effizienz von Zielgen und Housekeeping-Gen in einem ähnlichen Bereich liegen. Dies konnte durch die Effizienzberechnung (Tabelle 14) gezeigt werden.

Tabelle 14 PCR-Effizienzen: Für je zwei Mamma- und Ovarkarzinomproben aus Verdünnungskurven berechnet

Gewebe	Zielgen	Gewebenr.	Effizienz [%]
Ovarialkarzinom	HTRA1	29984	101
		30492	94
	HPRT	29984	100
		30492	97
Mammakarzinom	HTRA1	131	86
		135	90
	HPRT	131	91
		135	114

4.1.1.2 Ovarialkarzinom-Proben

Im Hinblick auf die malignen Erkrankungen liegen zum Ovarialkarzinom die meisten Untersuchungen zu HTRA1 vor [Chien et al. 2006; Chien et al. 2004; He et al. 2010; He et al. 2011; Narkiewicz et al. 2009]. Aus der Tumorbank der Frauenklinik München stammende Ovarialkarzinom-Proben wurden zur Assay-Etablierung untersucht. Hierbei wurden Taqman-Assays für HTRA1 und das Houskeeping-Gen HPRT wie unter 3.3.4 (S. 28ff.) beschrieben verwendet. Die Messungen wurden in Duplikaten mit einer cDNA-Verdünnung 1:10 durchgeführt. Die Auswertung (vgl. Abbildung 11) zeigt die Herab-Regulation der HTRA1-mRNA-Expression in 16 der 17 untersuchten Tumorproben im Vergleich zum einem Borderline-Tumor. Der Borderline-Tumor weist dabei die knapp 18-fache HTRA1-Expression der Tumorprobe mit der geringsten HTRA1-Wert auf.

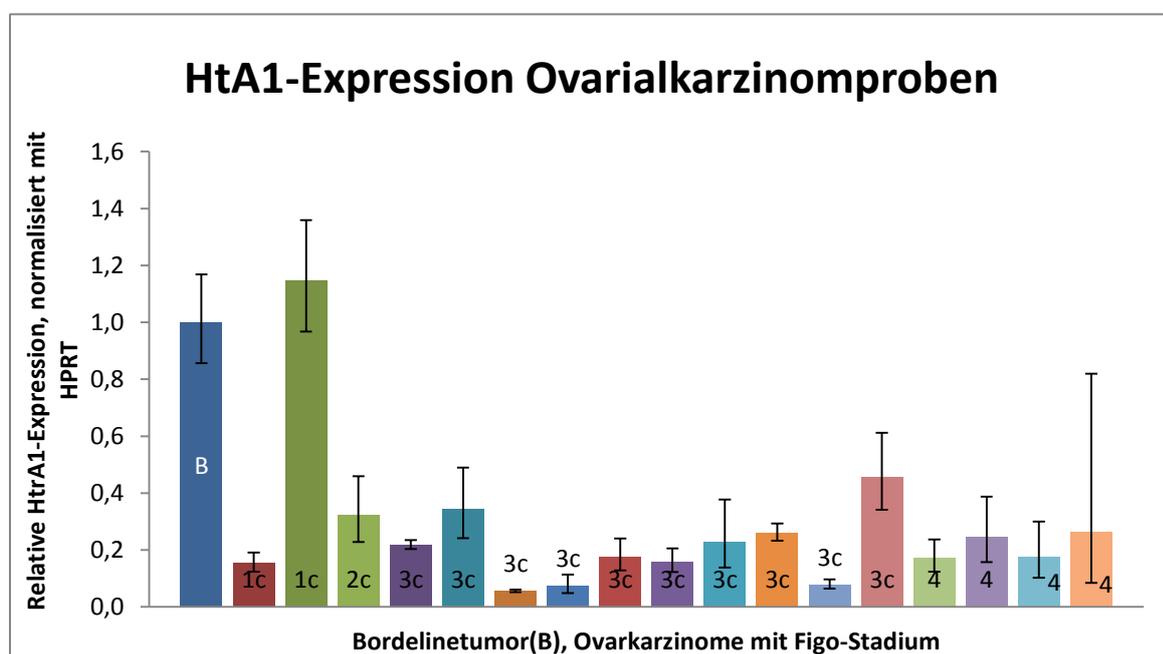


Abbildung 11 HTRA1 Expression der Ovarialkarzinomproben relativ zum Borderline-Tumor (B) (relative Expression= 1), bei den Proben der malignen Tumoren ist das Figo-Stadium angegeben. Es zeigt sich die Herab-Regulation der HTRA1-Expression im Vergleich zum Borderline-Tumor(B) in 16 der 17 untersuchten Tumorproben. Die Fehlerindikatoren stellen die, durch die Abi Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgrund der Abweichungen der in Triplikaten gemessenen Ct-Werte berechnete, minimalen und maximale relative Expression dar.

Um die Intra-Assay-Variabilität, d.h. die Schwankungen bei wiederholter Messung zu prüfen, wurden sieben Tumorproben und der Borderline-Tumor in einem zweiten Lauf erneut gemessen. Wie in Abbildung 12 dargestellt, ergeben die Messungen vergleichbare Werte.

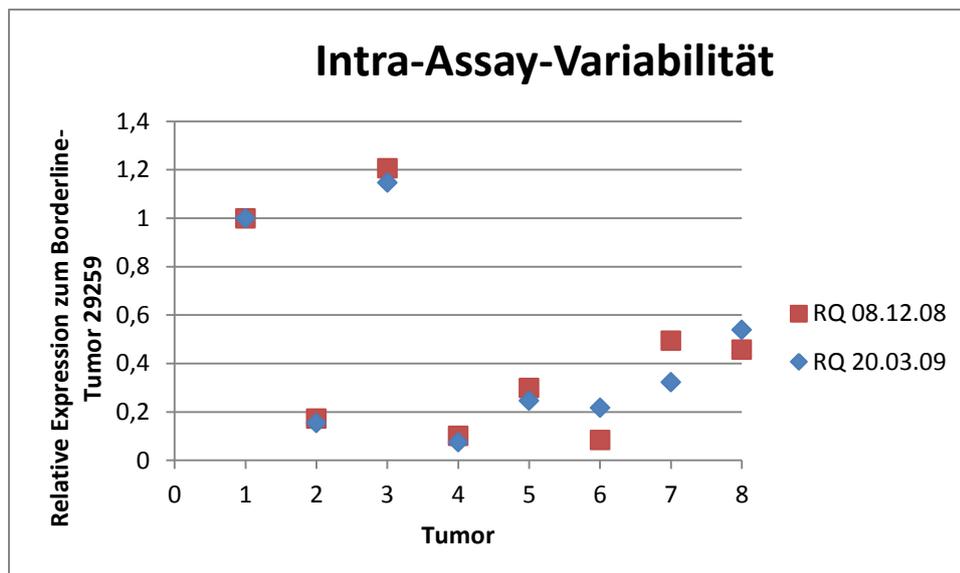


Abbildung 12 Intra-Assay-Variabilität des Taqman-Systems; RQ ist die relative Expression im Vergleich zum Borderline-Tumor (Tumor 1)

4.1.1.3 Housekeeping-Gen HPRT: Vergleich der Taqman- und Lightcycler-Messung

Aus vorangegangenen Lightcycler-Versuchen lagen für die Mammakarzinom-Proben der Kollektive Dresden und Nijmegen bereits Messungen der mRNA-Expression verschiedener Housekeeper-Gene vor. HPRT-Werte gemessen mit dem Taqman-System wurde an 16 Proben aus dem Kollektiv der Mammakarzinom-Proben aus dem Universitätsklinikum Dresden (vgl. 3.1.3, S.22) auf Vergleichbarkeit zu Messungen mit dem Lightcycler-System evaluiert. Aus den im Taqman in Duplikaten bei einer cDNA-Verdünnung von 1:30 gemessenen Ct-Werten wurden für alle Proben zunächst nach der Formel

$$(3) \quad X_{0\text{ProbeA}} / X_{0\text{ProbeB}} = 2^{\text{CtProbeB}} / 2^{\text{CtProbeA}} = 2^{\text{CtProbeB} - \text{CtProbeA}} \quad (\text{vgl. Seite 33})$$

das Vielfache der Expression einer Probe (Nr. 115) berechnet.

Die Daten aus der Lightcycler-Messung lagen als absolute Zahlen an Molekülen vor, die über in jeden Lauf der Messung integrierte Standardproben generiert wurden. Diese absoluten Werte wurden durch Division in Vielfache der Probe 115 überführt. Wie in Abbildung 13 zu sehen, waren für die meisten Proben die Werte vergleichbar.

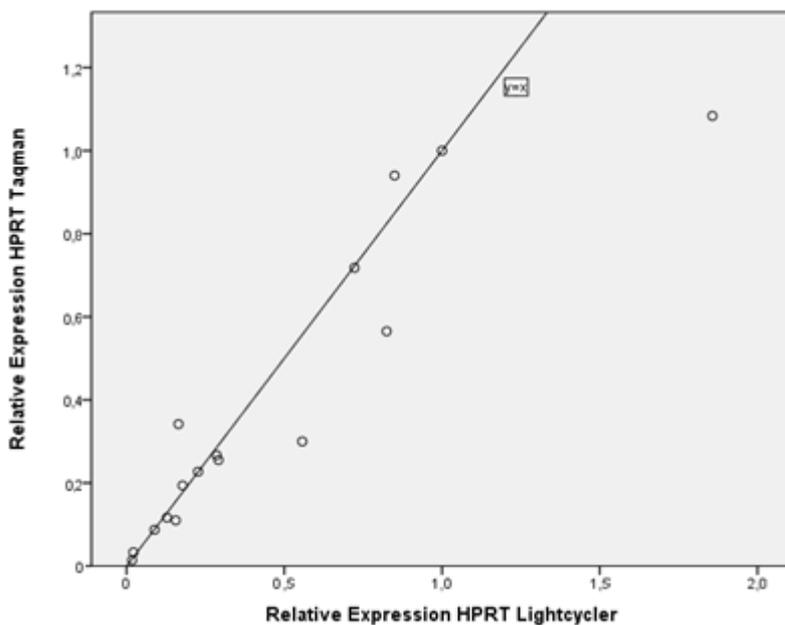


Abbildung 13 Vergleich der HPRT-Messwerte aus dem Taqman- und dem Lightcycler-System

Im Spearman-Rank-Test ergab sich eine signifikante ($p = 0,01$) starke Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,947. Auf dem Grund dieser Beobachtung wurde die Entscheidung getroffen, für die Expressionsanalyse des Nijmegen-Kollektivs die bereits vorhandenen Housekeeping-Gen-Werte aus der Lightcycler-Messung zu verwenden, da hiermit große materielle Einsparungen verbunden waren. Für die Proben aus dem Kollektiv Nijmegen lagen Daten zu den Housekeeping-Genen β -Actin und G6PDH vor. Im Folgenden wurde G6PDH als Housekeeping-Gen gewählt, da es in bisherigen Publikationen, die auf den Light-Cycler-Daten zu den Mammakarzinom-Proben aus Nijmegen und Dresden beruhen, als besonders geeignet evaluiert worden war [Biermann et al. 2008; Holzscheiter et al. 2006]. Für G6PDH war ein ähnlicher Vergleich von Taqman- und Lightcycler-Messung leider nicht möglich, da der von Applied Biosystems erworbene Taqman-Assay keine verwertbaren Aussagen erbrachte.

4.1.2 Expressionsanalyse des Nijmegen-Kollektives

Mit dem Taqman-System wurden von 131 Proben von primären Mammakarzinomen aus dem Kollektiv Nijmegen (siehe 3.1.1, S.20) in 3 Läufen die Ct-Werte für HTRA1 bei einer cDNA-Verdünnung von 1:30 in Duplikaten gemessen. Die Werte einzelner Proben in verschiedenen Läufen können hierbei erheblich schwanken, zumal der Schwellenwert zur Bestimmung der Ct-Werte für jeden Lauf einzeln von der Software Abi Prism 7000 SDS festgelegt wird. Um die Läufe anzugleichen wurden zwei Kalibrator-Proben auf jeder Platte gemessen:

Tabelle 15 Kalibratorproben: Ct-Werte in verschiedenen Taqman-Versuchen und ihre Differenz

Kalibrator	Ct 1.Lauf	Ct 2.Lauf	Ct 3.Lauf	Differenz 1.-2.Lauf	Differenz 1.-3.Lauf
Ovariakarzinom- Probe	27,776	27,256	27,037	0,52	0,739
173	30,677	30,274	30,318	0,403	0,359
Mittelwert				0,4615	0,549

Der jeweilige Mittelwert der Differenzen der Ct-Werte zum ersten Lauf wurde von den Ct-Werten des zweiten bzw. dritten Laufs abgezogen. Diese so angeglichenen Ct-Werte wurden relativ auf eine Probe B nach der Formel

$$(3) \quad x_{0\text{ProbeA}} / x_{0\text{ProbeB}} = 2^{\text{CtProbeB}} / 2^{\text{CtProbeA}} = 2^{\text{CtProbeB} - \text{CtProbeA}}$$

bezogen. Für die Normalisierung mit einem Housekeeping-Gen standen Daten zum Housekeeping-Gen G6PDH zu aus vorangegangenen Light-Cycler Messungen zur Verfügung [Farthmann et al. 2004; Holzscheiter et al. 2006]. Diese absoluten G6PDH-Werte aus der Light-Cycler-Messung wurden durch Division durch den G6PDH-Wert der Probe B in relative Werte überführt. Jeder Probe war nun je ein relativer Wert für HTRA1 und für die G6PDH zugeordnet. So konnte durch Division eine Normalisierung auf das Housekeeper-Gen G6PDH vorgenommen werden. Die Kalibratorprobe wurde so gewählt, dass die Probe mit der geringsten relativen Expression nach Normalisierung auf G6PDH den Wert 1 erhielt. Es ergaben sich

relative Expressionswerte für HTRA1, normalisiert mit G6PDH, von 1 bis 308, der Median lag bei 38.

4.1.2.1 HTRA1-mRNA und PAI-1/uPA-mRNA

Für die Proben des Nijmegen-Kollektivs waren mRNA-Expressionswerte für uPA, PAI-1 und uPA-Rezeptor, normalisiert mit dem Housekeeping-Gen G6PDH, bekannt [Biermann et al. 2008]. Die Korrelation mit den mRNA-Expressionswerten für HTRA1, ebenfalls mit G6PDH normalisiert, ist hoch signifikant ($p < 0,001$) zeigt aber für PAI-1 einen niedrigen Korrelationskoeffizienten (siehe Tabelle 16). Sie ist somit als positive Assoziation zu werten. Die in der Literatur bei Neuronen beschriebene abnehmende Expression von PAI-1 bei vermehrter HTRA1 Expression und die Überexpression von PAI-1 durch Blockade der HTRA1-Proteasenfunktion [Launay et al. 2008] hatte eine inverse Korrelation erwarten lassen, diese konnte im vorliegenden Mammakarzinom-Kollektiv nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 16 Korrelation von HTRA1 mit PAI-1, uPA-Rezeptor und uPA; mRNA-Expressionswerte, jeweils mit G6PDH normalisiert

			HTRA1
Spearman-Rho	PAI-1	Korrelationskoeffizient	,371
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	131
	uPA-Rezeptor	Korrelationskoeffizient	,471
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	131
	uPA	Korrelationskoeffizient	,531
		Sig. (2-seitig)	,000
		N	131

4.1.2.2 HTRA1-Expression und klinisch-pathologische Merkmale

Die relativen Expressionswerte für HTRA1, normalisiert mit G6PDH, wurden auf eine Assoziation mit klinischen und pathologischen Merkmalen (Alter, Menopausenstatus, Nodalstatus, Tumorgröße, Tumorgrading, Östrogen-rezeptor-Status ER, Progesteronrezeptor-Status PR und Operations-Methode) der 131 Patientinnen des Nijmegen-Kollektiv untersucht (Tabelle 17). Dabei fand sich nur für die Tumorgröße ein signifikante ($p = 0,025$) Assoziation mit signifikant niedrigeren relativen HTRA1-

Expressionswerten in größeren Tumoren. Tendenziell exprimierten auch Tumore mit geringerem Differenzierungsgrad und einer höheren Anzahl an befallenen Lymphknoten weniger HTRA1-mRNA, passend zu einer Rolle als Tumorsuppressor-Gen.

Bei der genaueren Betrachtung von HTRA1-Expression und Hormonrezeptor - Konzentration fiel auf, dass sehr hohe Östrogenrezeptor-Konzentrationen (>400 fmol/mg Protein; n=18) keine sehr hohen HTRA1-Expressionswerten zugeordnet waren (vgl. Abbildung 14). Der Östrogenrezeptor-Status wird allerdings bereits ab einer Konzentration von 10 fmol Östrogenrezeptor pro 1 mg Protein als positiv gewertet.

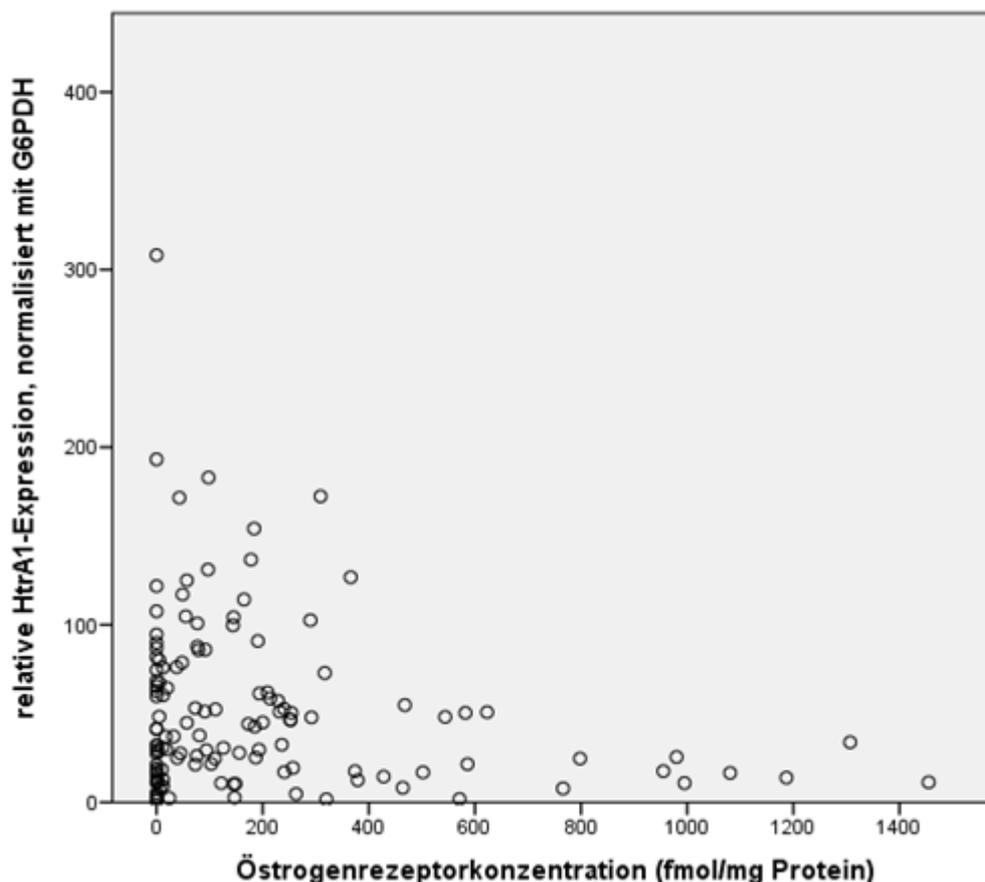


Abbildung 14 Relative HTRA1-Expression und Östrogenrezeptor-Konzentration (bestimmt durch einen Ligandenbindungsassay)

Tabelle 17 HTRA1 und klinisch-pathologische Merkmale im Nijmegen-Kollektiv

Variable	n=131 ^a	HTRA1-Expression Median (IR ^d)	p
Alter			0,271 ^b
<50 Jahre	23	48(54)	
>50 Jahre	108	37(51)	
Menopausenstatus			0,337 ^b
prämenopausal	28	45(47)	
postmenopausal	103	37(56)	
Nodalstatus			0,995 ^b
negativ	52	41(47)	
positiv	60	45(60)	
Nodalstatus			0,439 ^c
negativ	52	41(47)	
1-3 Lymphknoten	43	48(63)	
4-9 Lymphknoten	10	34(41)	
>9 Lymphknoten	6	19(45)	
Tumorgröße (pT)			0,025^c
1	39	53(58)	
2	72	40(49)	
3+4	18	20(26)	
Tumorgrading			0,587 ^b
1/2	49	45(60)	
3	46	30(49)	
ER-Status			0,672 ^b
negativ	37	32(65)	
positiv	91	43(54)	
PR-Status			0,219 ^b
negativ	51	31(56)	
positiv	77	45(56)	
Operation			0,320 ^b
Brusterhaltende Therapie	38	47(60)	
Mastektomie	93	32(49)	
a: Wegen fehlender Angaben kann die Summe der Untergruppen der Merkmale kleiner als 131 sein b: Mann-Whitney U Test c: Kruskal-Wallis Test d: IR: <i>Interquartile range</i> ; Inter-Quartilen-Abstand			

4.1.2.3 HTRA1 als prädiktiver Faktor im Brustkrebs

Der Höhe der HTRA1-Protein-Expression ist als prädiktiver Faktor für Mesotheliome [Baldi et al. 2008] und für hepatozelluläre Karzinome [Zhu et al. 2010] beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der HTRA1-mRNA-Expression im Tumor auf den Krankheitsverlauf bei Mammakarzinom-Patientinnen anhand der Daten aus dem Nijmegen-Kollektiv untersucht. Als Endpunkte wurden Tod, Rezidiv und das kombinierte krankheitsfreie Überleben betrachtet. Letzteres definiert als Endpunkt Krankheitsrezidive und zusätzlich Todesfälle, die nicht vorher als Rezidiv erfasst wurden. Für die Analyse wurden die Patientinnen nach relativer HTRA1-mRNA-Expression, normalisiert auf G6PDH, in eine Gruppe mit niedriger und eine Gruppe mit hoher Expression geteilt.

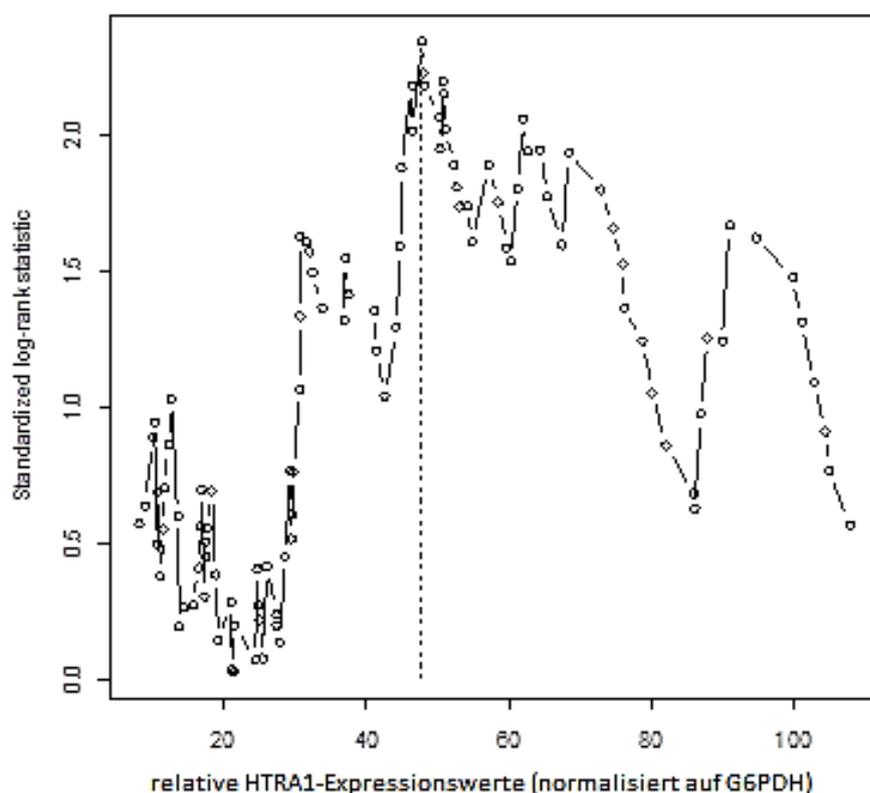


Abbildung 15 LOG-RANK-Test im Gesamtkollektiv für den besten Cut-off-Wert zum Gesamtüberleben: Testergebnis bildlich dargestellt, gestrichelte senkrechte Linie zeigt den von Programm berechneten optimalen Cut-off-Wert an (eine relative HTRA1-Expression von 47.8525)

Um stabile Gruppen zu erhalten wurde der Cut-off-Wert für die Kaplan-Meier-Analysen mit dem Programm `maxstat.test` in R errechnet. Hier ergab sich für das

Gesamtkollektiv und Gesamtüberleben eine relative HTRA1-Expression von 48 als idealer Cut-off (siehe auch Abbildung 15). Dieser Wert wurde für alle Analysen angewendet, da sich in den untersuchten Subgruppen auch in getrennter Berechnung mit maxstat.test sehr ähnliche optimale Cut-off-Werte (46,50362 für den Endpunkt Rezidiv und 47,8525 für die beiden anderen Endpunkte in der Nodal-positiven Subgruppe) ergaben. Im Gesamtkollektiv umfasste die relative HTRA1-Expression, normalisiert auf G6PDH, Werte von 1 bis 308 (Median 38), in der nodal-positiven Subgruppe umfasste sie ebenfalls Werte von 1 bis 308 (Median 45).

4.1.2.3.1 Gesamtkollektiv Nijmegen

Auf der Basis der Cut-off-Berechnung ergab sich für das Gesamtkollektiv mit 131 Patientinnen eine Gruppe mit höheren HTRA1-Expressionswerten von 56 Patientinnen(43%) gegenüber einer Gruppe mit geringerer HTRA1-Expression von 75 Patientinnen(57%). Die Charakterisierung des Kollektivs nach klinischen und pathologischen Faktoren und der Einfluss dieser Merkmale auf das kombinierte krankheitsfreie Überleben ist in Tabelle 18 dargestellt. Im Hinblick auf das Gesamtüberleben konnten wegen fehlender Daten zum genauen Todeszeitpunkt nur 129 Patientinnen betrachtet werden (73 mit geringerer und 56 mit höherer HTRA1-Expression). Wie auf den folgenden Seiten in den Abbildung 16 bis 18 dargestellt, ergab sich eine signifikante bessere Krankheitsprognose für die Gruppe mit hoher HTRA1-Expression für Gesamt- und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Unter Berücksichtigung des multiplen Testens zur Cut-off-Bestimmung konnte dieser Unterschied allerdings nicht mehr als signifikant nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Rezidiv-Rate war lediglich ein tendenzieller Vorteil für die Gruppe mit hoher HTRA1-Expression zu erkennen.

Tabelle 18 Univariate Cox-Regression: Charakterisierung des Gesamtkollektivs Nijmegen; kombiniertes krankheitsfreies Überleben

Variable	n=131 ^a	Ereignishäufigkeit n (%)	Hazard Ratio (95%CI ^b)	p
HTRA1-Expression				0,028
hoch	56	21 (38%)	0,547 (0,319-0,938)	
niedrig	75	37 (49%)		
Alter				0,398
<50	23	11 (48%)	0,751 (0,387-1,458)	
>50	108	47 (44%)		
Menopausenstatus				0,221
prämenopausal	28	14 (50%)	0,678 (0,368-1,247)	
postmenopausal	103	44 (43%)		
Nodalstatus				0,021
negativ	52	20 (39%)	1,215 (0,653-2,260)	
1-3 Lymphknoten	43	20 (47%)		
3-9 Lymphknoten	10	4 (40%)		
>9 Lymphknoten	6	4 (83%)		
Tumorgröße				0,091
pT1	39	16 (41%)	1,110 (0,604-2,039)	
pT2	72	31 (43%)		
pT3+pT4	18	11 (61%)		
Tumorgrading				0,623
1/2	49	22 (45%)	1,160 (0,641-2,101)	
3	46	23 (50%)		
ER				0,392
Negativ	37	17 (46%)	1,305 (0,709-2,401)	
Positiv	91	40 (44%)		
PR				0,258
Negativ	51	21 (41%)	1,383 (0,789-2,423)	
Positiv	77	36 (47%)		
Therapie				0,654
Keine	61	25 (41%)	1,005 (0,598-1,860)	
Endokrin	50	23 (46%)		
Chemotherapie, ggf. mit endokrin	20	10 (50%)		
a: Wegen fehlender Angaben kann die Summe der Untergruppen der Variablen kleiner als 131 sein				
b: 95%-Konfidenzintervall				

Gesamtkollektiv Nijmegen: Gesamtüberleben bei hoher/niedriger HTRA1-Expression

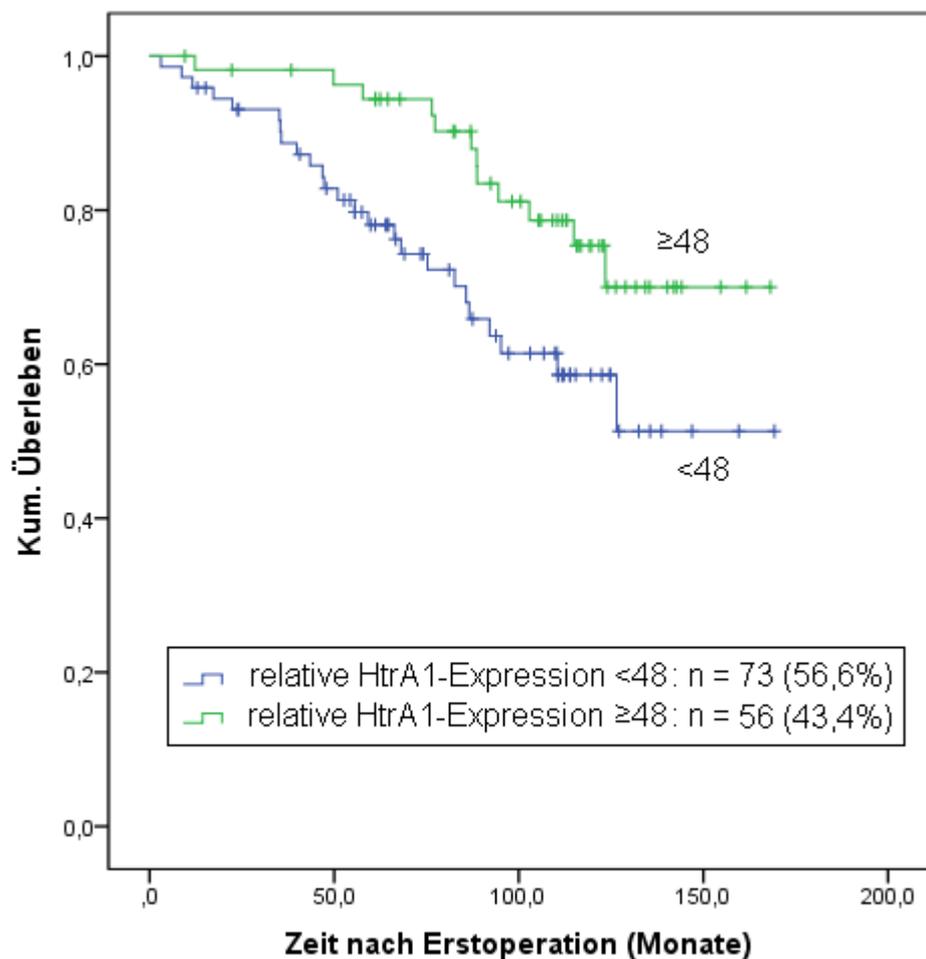


Abbildung 16 Kaplan-Meier-Analyse Überleben im Gesamtkollektiv nach relativer HTRA1-Expression: niedrige HTRA1-Expression <48 (n=73; 25 Ereignisse; Ereignishäufigkeit EF 34,2%) bzw. hohe HTRA1-Expression ≥ 48 (n= 56; 12 Ereignisse; EF 21,5%)

Hazard Ratio (HTRA1 ≥48 versus <48)	0,448
95%-Konfidenzintervall	0,225-0,896
Log-Rank-Test (standard)	p = 0,023
Log-Rank-Test (multiples Testen berücksichtigt)	p = 0,2047

Gesamtkollektiv Nijmegen: Rezidiv-freies Überleben bei hoher/niedriger HTRA1-Expression

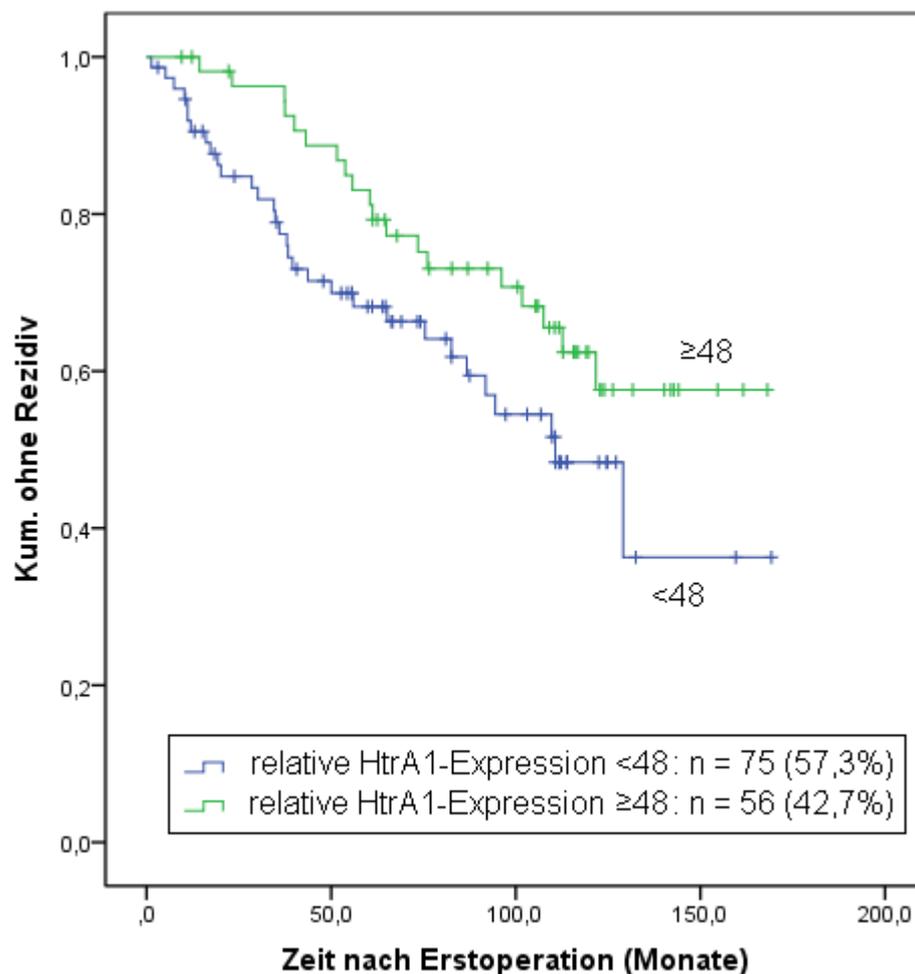


Abbildung 17 Kaplan-Meier-Analyse: Rezidiv-freies Überleben im Gesamtkollektiv nach relativer HTRA1-Expression: niedrige HTRA1-Expression <48 (n=75; 31 Ereignisse; EF 41,3%) bzw. hohe HTRA1-Expression ≥48 (n=56, 19 Ereignisse; EF 33,9%)

Hazard Ratio (HTRA1 ≥48 versus <48)	0,583
95%-Konfidenzintervall	0,328-1,036
Log-Rank-Test (standard)	p = 0,066

Gesamtkollektiv Nijmegen: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben bei hoher/niedriger HTRA1-Expression

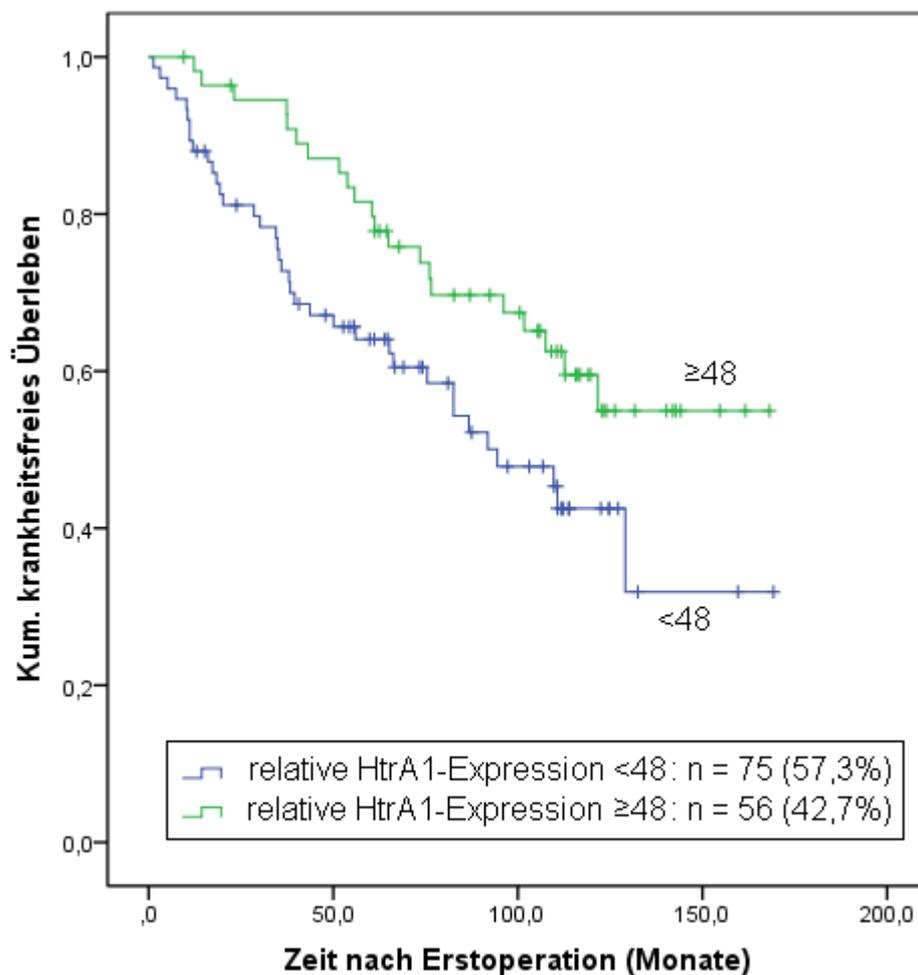


Abbildung 18 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben im Gesamtkollektiv nach relativer HTRA1-Expression: niedrige HTRA1-Expression <48 (n=75; 37 Ereignisse; EF 49,3%) bzw. hohe HTRA1-Expression ≥48 (n=56, 21 Ereignisse; EF 37,5%)

Hazard Ratio (HTRA1 ≥48 versus <48)	0,547
95%-Konfidenzintervall	0,319-0,938
Log-Rank-Test (standard)	p = 0,028
Log-Rank-Test (multiples Testen berücksichtigt)	p = 0,2509

4.1.2.3.2 Nodal-positive Patientinnen aus dem Kollektiv Nijmegen

Der Befall der axillaren Lymphknoten und dessen Ausmaß stellen einen der wichtigsten prognostischen Faktoren beim Mammakarzinom dar (vgl. Tabelle 18, Nodalstatus $p=0,021$). Für HTRA1 wird eine Rolle bei der Progression von Tumorerkrankungen [ESPOSITO et al. 2006; He et al. 2010] diskutiert. Daher erschien es interessant, den Einfluss der HTRA1-Expression auf Überleben und Rezidiv-Risiko bei den Patientinnen mit positiven Nodalstatus und somit höherem Rezidiv- und Sterberisiko gesondert zu untersuchen. In der Untergruppe von 60 Patientinnen mit positiven Nodalstatus wurden, mittels des Cut-off-Werts von 48 für die relative HTRA1-Expression, eine Gruppe mit 33 Patientinnen (55%) mit niedriger HTRA1-Expression und eine Gruppe mit 27 Patientinnen (45%) mit hoher HTRA1-Expression definiert. Zur genaueren Charakterisierung der klinischen und pathologischen Parameter des nodal-positiven Patientinnenkollektivs und ihrer Auswirkung auf das kombinierte krankheitsfreie Überleben siehe Tabelle 19. Auch hier ergab die Auswertung der Daten eine signifikant bessere Krankheitsprognose für die Gruppe mit hoher HTRA1-Expression im Hinblick auf Gesamtüberleben, Rezidiv-freies Intervall und kombiniertes krankheitsfreies Überleben. Die geringere Rezidiv-Rate in der Gruppe mit hoher HTRA1-Expression konnte unter Berücksichtigung des multiplen Testens allerdings nur noch als grenzwertig signifikant ($p=0,0529$) angesehen werden.

Tabelle 19 Univariate Cox-Regression: Charakterisierung der Subgruppe der Nodal-positiven Patientinnen des Kollektivs Nijmegen, kombiniertes krankheitsfreies Überleben

Variable	n=60 ^a	Ereignishäufigkeit n (%)	Hazard Ratio (95%CI)	p
HTRA1-Expression				0,002
Hoch	27	9 (33%)	0,228 (0,129-0,645)	
Niedrig	33	20 (62%)		
Alter				0,210
<50	14	7 (50%)	0,576 (0,244-1,364)	
>50	46	22 (48%)		
Menopausenstatus				0,114
prämenopausal	18	10 (56%)	0,536 (0,248-1,161)	
postmenopausal	42	19 (45%)		
Nodalstatus				0,045
1-3 Lymphknoten	43	20 (47%)	1,206 (0,409-3,559)	
3-9 Lymphknoten	10	4 (40%)		
>9 Lymphknoten	6	5 (83%)		
Nodalstatus				0,013
1-9 Lymphknoten	53	24 (45%)	3,544 (1,300-9,660)	
>9 Lymphknoten	6	5 (83%)		
Tumorgröße				0,050
pT1	13	5 (39%)	1,358 (0,493-3,745)	
pT2	34	15 (69%)		
pT3+pT4	13	9 (31%)		
Tumorgrading				0,317
1/2	22	11 (50%)	1,507 (0,674-3,367)	
3	21	13 (54%)		
ER				0,705
Negativ	19	10 (53%)	0,861 (0,395-1,873)	
Positiv	39	18 (64%)		
PR				0,857
Negativ	24	12 (50%)	0,933 (0,441-1,976)	
Positiv	34	16 (57%)		
Therapie				0,267
Keine	7	5 (71%)	0,438 (0,159-1,213)	
nur endokrin	35	16 (46%)		
Chemotherapie, ggf. mit endokrin	18	8 (28%)		
a: Wegen fehlender Angaben kann die Summe der Untergruppen der Variablen kleiner als 60 sein				
b: 95%-Konfidenzintervall				

Mit den Daten von 59 nodal-positiven Patientinnen, für die die erforderlichen pathologischen Angaben komplett vorlagen, wurde eine multivariate Cox-Regression durchgeführt. Als Endpunkt wurde das kombinierte krankheitsfreie Überleben ausgewählt, da hier die meisten Ereignisse (n = 29) vorlagen. In die Analyse wurden folgende bivalente Variablen aufgenommen: HTRA1-Expression (hoch/niedrig), Tumorgröße pT (1/2 verglichen mit 3/4) und Durchführung einer adjuvanten Therapie (ja/nein). Der Einfluss von HTRA1-Expression auf das kombinierte krankheitsfreie Überleben blieb auch in der multivariaten Analyse bestehen (Tabelle 20).

Tabelle 20 Multivariate Cox-Regression: kombiniertes krankheitsfreies Überleben, nodal-positive Patientinnen (n=60; Anzahl der Ereignisse Rezidiv und/oder Tod: 29, 95%CI: 95%-Konfidenzintervall)

Variable	Univariate Cox-Regression		Multivariate Cox-Regression	
	Hazard Ratio (95%CI)	<i>p</i>	Hazard Ratio (95%CI)	<i>p</i>
HTRA1 niedrig hoch	0,29 (0,13-0,65)	0,002	0,34 (0,15-0,79)	0,012
Tumorgroße pT1+pT2 pT3+pT4	2,56 (1,15-5,71)	0,021	1,81 (0,79-4,18)	0,162
Adjuvante Therapie Nein Ja	0,47 (0,18-1,24)	0,127	0,70 (0,26-1,90)	0,480

Kollektiv Nijmegen - Positiver Nodalstatus: Gesamtüberleben bei hoher/niedriger HTRA1-Expression

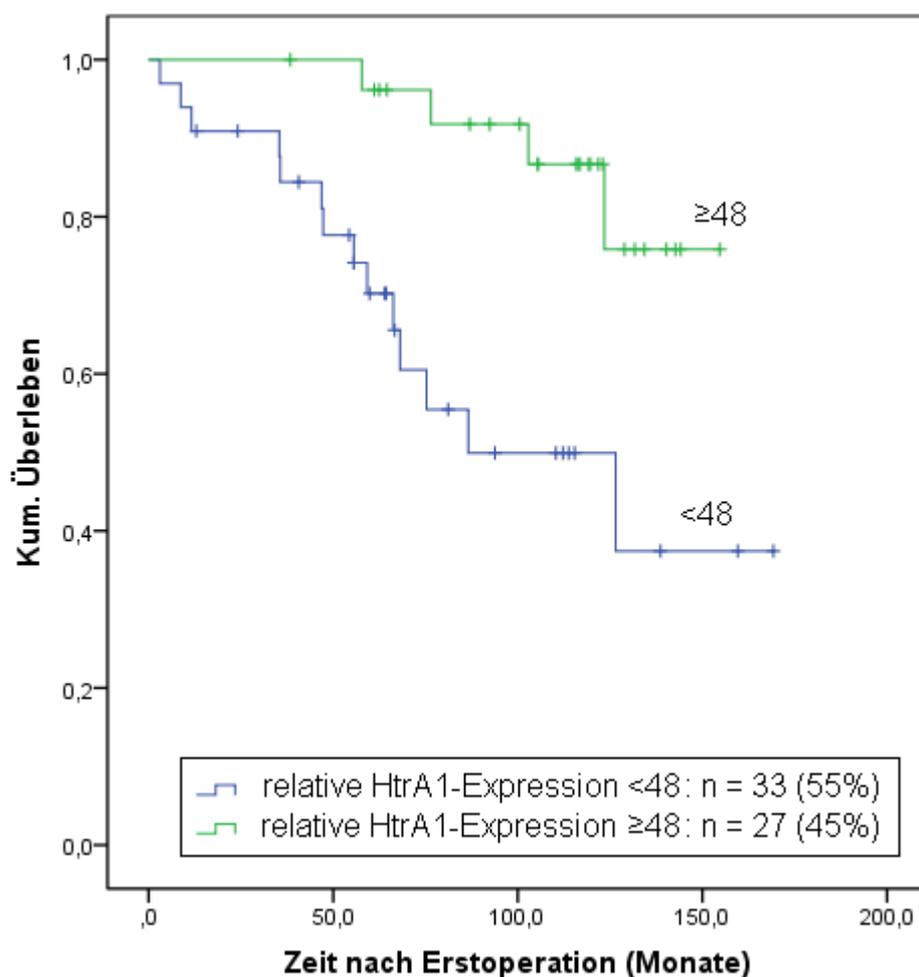


Abbildung 19 Kaplan-Meier-Analyse: Überleben der nodal-positiven Patientinnen nach HTRA1-Expression: niedrige relativer HTRA1-Expression < 48 (n=33; 14 Ereignisse; EF 42,4%) bzw. höherer HTRA1-Expression ≥ 48 (n=27, 4 Ereignisse; EF 14,8%)

Hazard Ratio (HTRA1 ≥ 48 versus < 48)	0,206
95%-Konfidenzintervall	0,067-0,632
Log-Rank-Test (standard)	0,006
Log-Rank-Test (multiples Testen berücksichtigt)	0,02840

Kollektiv Nijmegen - Positiver Nodalstatus: Rezidiv-freies Überleben bei hoher/niedriger HTRA1-Expression

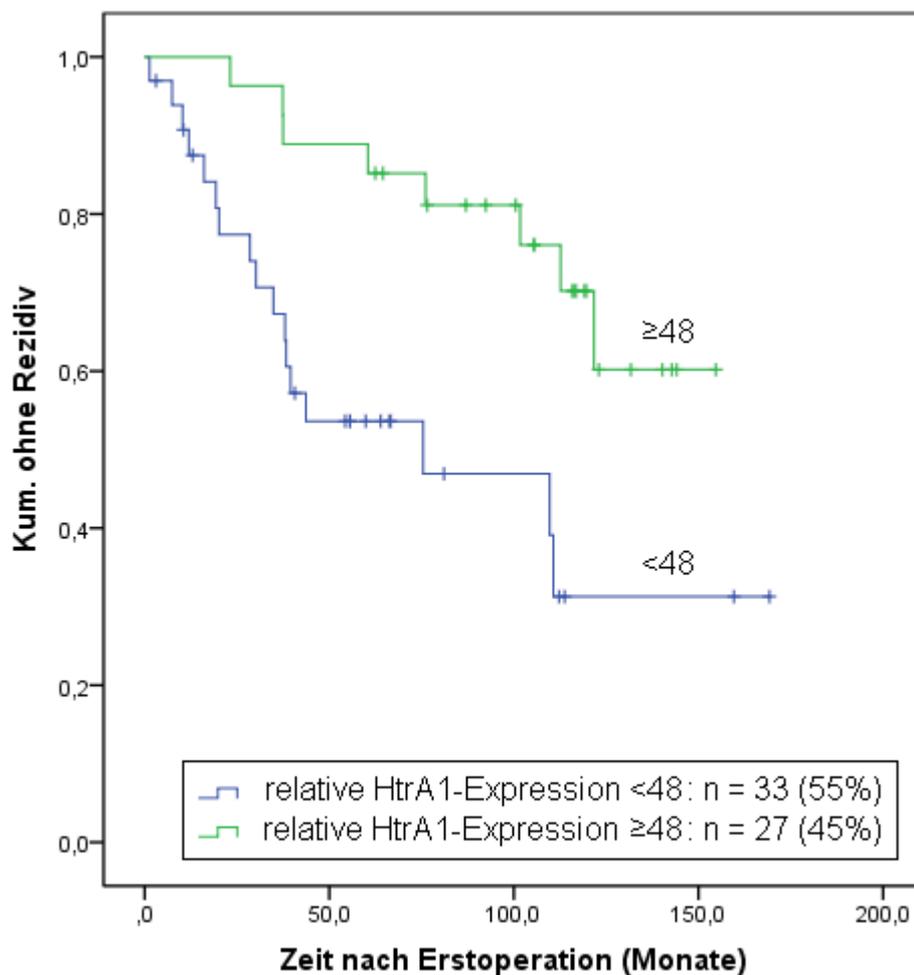


Abbildung 20 Kaplan-Meier-Analyse: Rezidiv-freies Überleben der nodal-positiven Patientinnen nach HTRA1-Expression: niedrige relative HTRA1-Expression <48 (n=33; 17 Ereignisse; EF 51,5%) bzw. hohe HTRA1-Expression ≥48 (n=27, 8 Ereignisse; EF 29,6%)

Hazard Ratio (HTRA1 ≥48 versus <48)	0,301
95%-Konfidenzintervall	0,127-0,714
Log-Rank-Test (standard)	p = 0,006
Log-Rank-Test (multiples Testen berücksichtigt)	p = 0,0529

Kollektiv Nijmegen - Positiver Nodalstatus: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben bei hoher/niedriger HTRA1-Expression

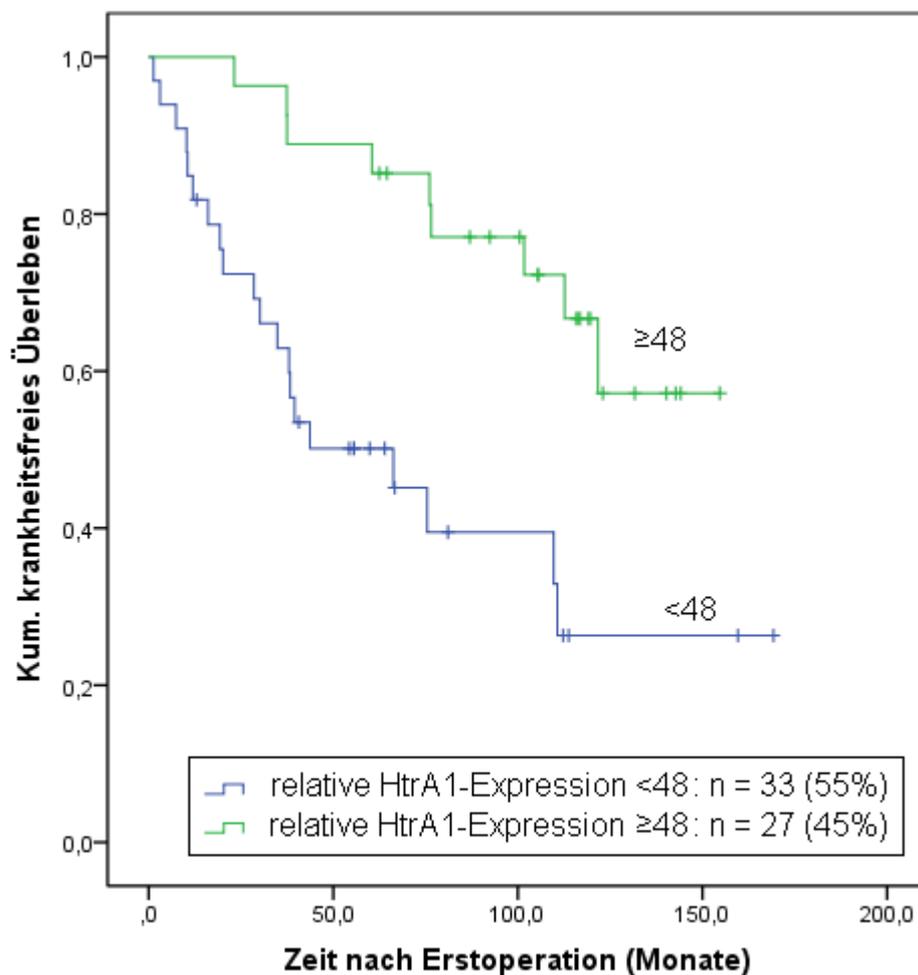


Abbildung 21 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben der nodal-positiven Patientinnen: niedrige HTRA1-Expression <48 (n=33; 20 Ereignisse; EF 61,6%) bzw. hohe HTRA1-Expression ≥ 48 (n=27, 9 Ereignisse; EF 33,3%)

Hazard Ratio (HTRA1 ≥48 versus <48)	0,228
95%-Konfidenzintervall	0,129-0,645
Log-Rank-Test (standard)	p = 0,002
Log-Rank-Test (multiples Testen berücksichtigt)	p = 0,0224

4.1.2.4 HTRA1-Expression und Ansprechen auf Chemotherapie

Hohe HTRA1-Expression war in einigen Studien mit einer höheren Ansprechrate auf Chemotherapie beim Mamma-, Magen- und Ovarialkarzinom assoziiert [Barros Filho et al. 2010; Catalano et al. 2011; Chien et al. 2006]. In der vorliegenden Arbeit erhielten 18 der 60 Patientinnen aus der nodal-positiven Subgruppe des Kollektivs Nijmegen eine Chemotherapie. Der positive Effekt einer hohen HTRA1-Expression auf das kombinierte krankheitsfreie Überleben lässt sich aber sowohl in der Gruppe ohne Chemotherapie (n=42, 70%, Abbildung 22) als auch in der Gruppe mit Chemotherapie (n=18, 30%, Abbildung 23) erkennen. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurden nur Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt und keine Anpassung des p-Wertes auf multiples Testen vorgenommen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die HTRA1-Expression eine generelle prognostische Bedeutung im Brustkrebs hat, die nicht ausschließlich auf eine Chemotherapie-Resistenz durch eine Herabregulation der HTRA1-Expression zu erklären ist.

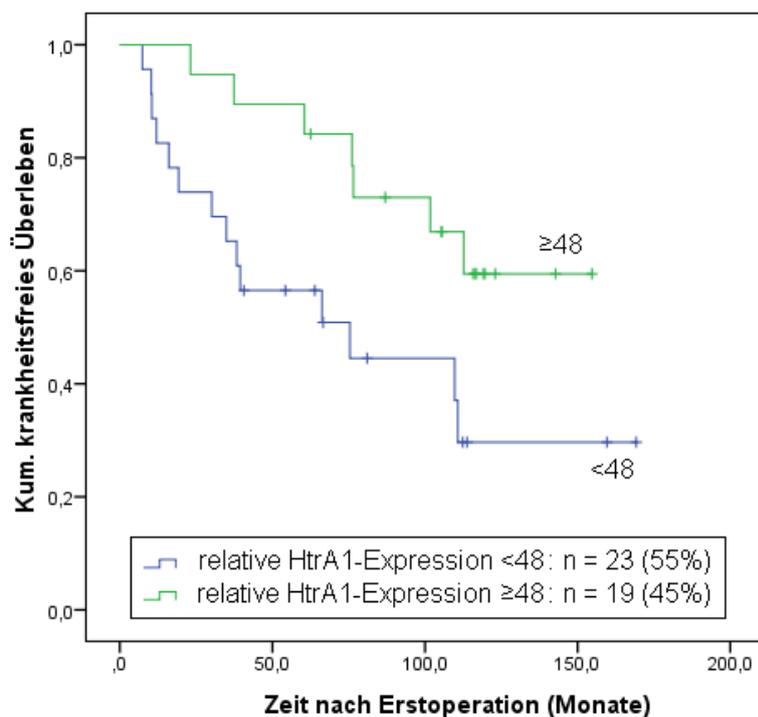


Abbildung 22 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben der Nodal-positiven Patientinnen ohne Chemotherapie nach HTRA1-Expression: niedrigen HTRA1-Expression <48 (n=23, 14 Ereignisse, EF 54%) und hohe HTRA1-Expression ≥48 (n=19, 7 Ereignisse, EF 37%), Log-Rank-Test: p=0,027

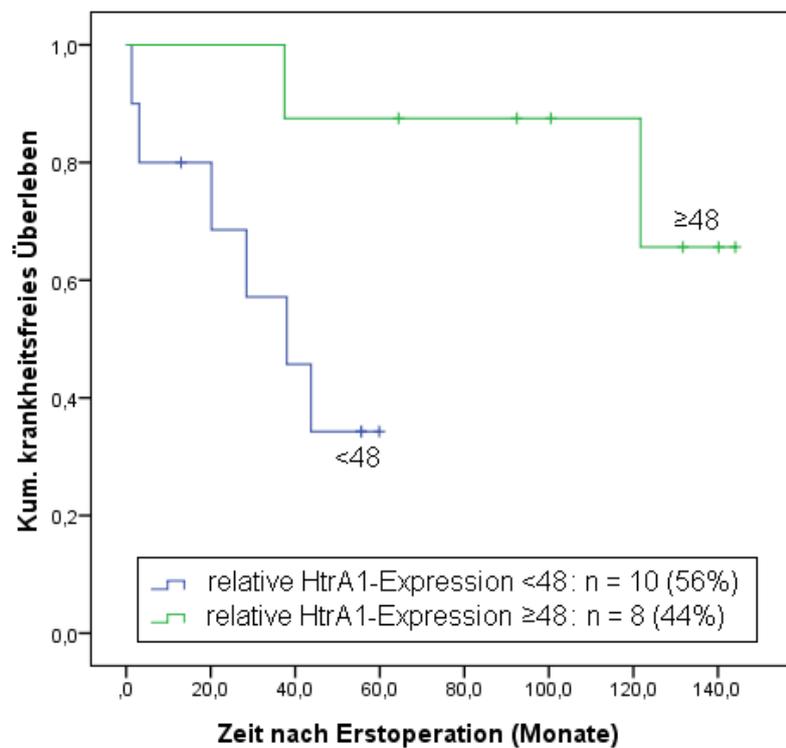


Abbildung 23 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben der Nodal-positiven Patientinnen mit Chemotherapie nach HTRA1-Expression: niedrigen HTRA1-Expression <48 (n=10, 6 Ereignisse, EF 60%) und hohe HTRA1-Expression ≥48 (n=8, 2 Ereignisse, EF 25%), Log-Rank-Test: p=0,029

4.1.3 HTRA1-Expression aus GEO-Datenbank

Zur Bestätigung des Zusammenhangs der HTRA1-mRNA-Expression im Tumor und des Krankheitsverlaufs wurden mit Hilfe des online-Programms „Kaplan-Meier-Plotter“ von Györfy et al. [Györfy et al. 2010] Expressionsdaten aus Affymetrix-Microarrays (Typ HG-U133A und HG-U133 plus 2.0) gekoppelt mit klinischen Informationen ausgewertet. Diese Microarrays lassen die Analyse der Expression von bis zu 47000 verschiedenen RNAs gleichzeitig zu [Affymetrix Inc. 2004], so entstehen in wenigen Versuchen große Datenvolumen, aus denen dann einzelne Gene zur Analyse ausgewählt werden können, oder nach Expressionsmustern gesucht werden kann. Ähnlich der Taqman-Untersuchung werden relative Expressionswerte bestimmt und durch verschiedene Kontrollschritte, insbesondere auch die Normalisierung auf mehrere Houskeeping-Gene, die Vergleichbarkeit der Expressionswerte in verschiedenen Proben erreicht. Für diese Arbeit wurde die Expression von HTRA1 in bis zu 2809 Mammakarzinom-Proben analysiert. Die Daten stammen aus der öffentlich zugänglichen GEO(Gene Expression Omnibus)-Datenbank.

4.1.3.1 Gesamtkollektiv

Wurden alle verfügbaren Daten ohne weitere Unterteilung der Patientinnen in Gruppen verwendet, zeigten sich signifikant bessere Überlebensdaten bei hoher HTRA1-Expression sowohl für Gesamtüberleben (overall-survival, OS) als auch Rezidiv-freies Überleben (RFS). Für einen Beobachtungszeitraum von 15 Jahren waren Daten zu Rezidiv-Ereignissen von 2809 Patientinnen vorhanden. Die HTRA1-Expression in dieser Gruppe erreichte Werte von 30 bis 19421, das heißt die Probe mit der höchsten Expression zeigte einen 647-fachen Wert der niedrigsten Expression. Es zeigte sich ein Hazard Ratio (HR) für Rezidiv-Ereignisse von 0,79 [95%-Konfidenzintervall 0,7-0,9], auf einem Signifikanzniveau von log-rank $p=0,00035$ für den besten cut-off-Wert, dieser lag bei 4411 (vgl. Abbildung 24). Für 15-Jahres-Gesamtüberleben waren Daten zu 971 Patientinnen verfügbar, hier ergab sich eine HTRA1-Expression im Bereich von 330-18047. Das Hazard Ratio war $HR = 0,63$ [95%-Konfidenzintervall 0,48-0,83], auf einem Signifikanzniveau von log-rank $p=0,0009$. Als bester Cut-off-Wert wurde eine HTRA1-Expression von 5190 gewählt (vgl. Abbildung 25).

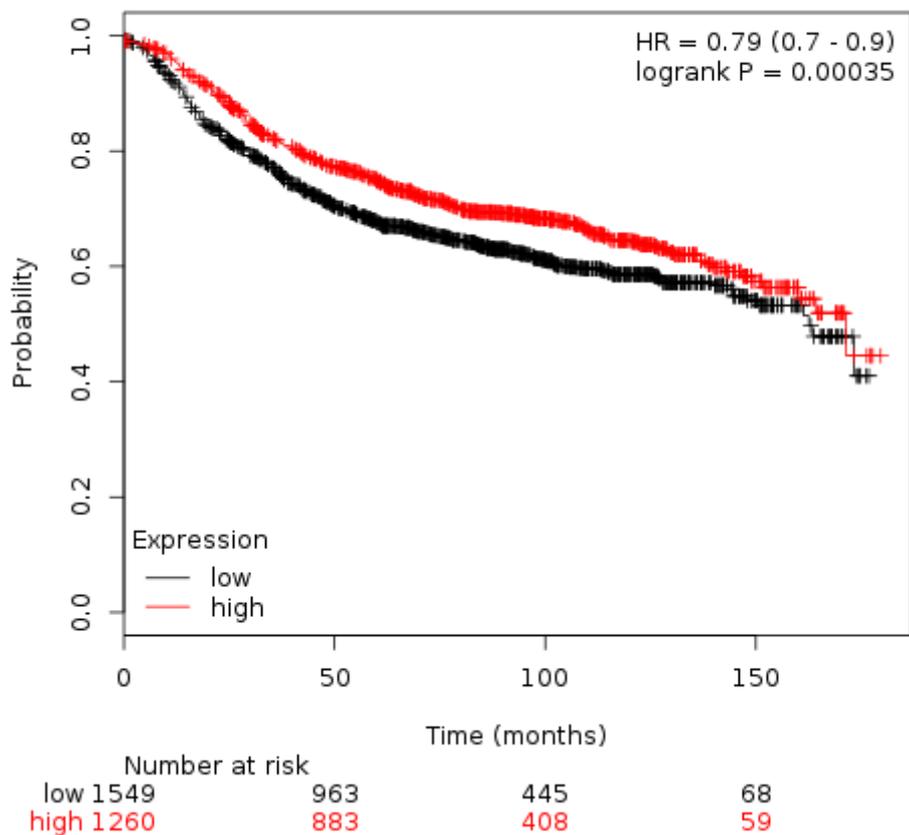


Abbildung 24 Kaplan-Meier-Analyse der Rezidiv-Rate in den Gruppen der Mammakarzinom-Patientinnen mit hoher(rot) und niedriger(schwarz) HTRA1-Expression aus der GEO-Datenbank

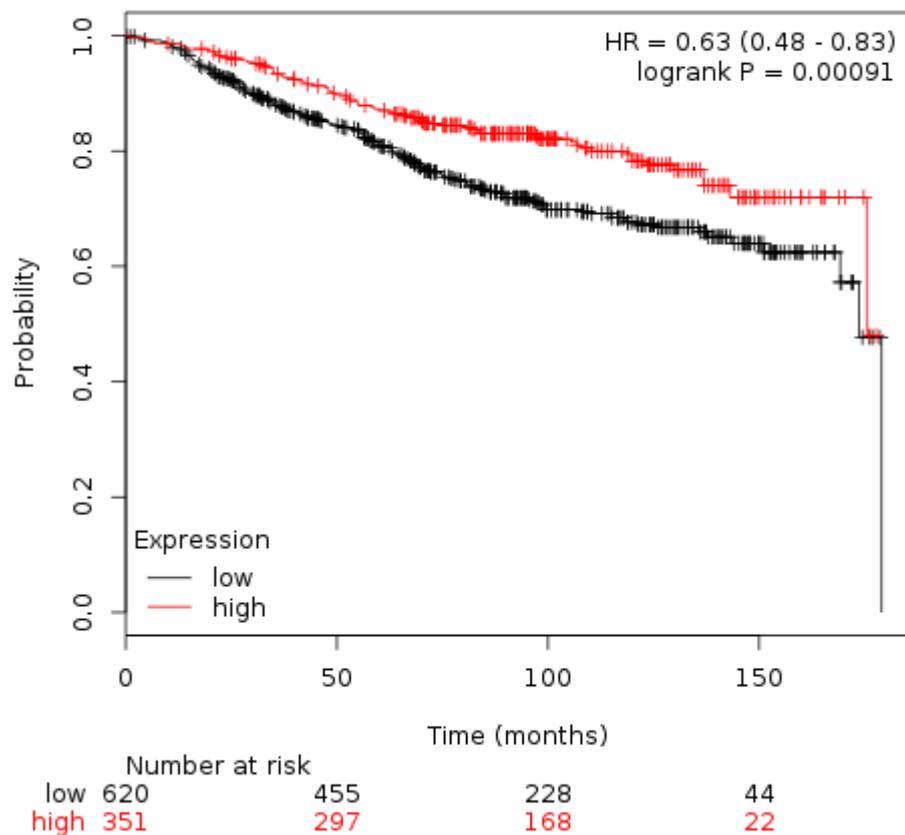


Abbildung 25 Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in den Gruppen von Mammakarzinom-Patientinnen mit hoher(rot) und niedriger(schwarz) HTRA1-Expression aus der GEO-Datenbank

4.1.3.2 Subgruppen aus der GEO-Datenbank

Die Daten aus dem Nijmegen-Kollektiv zeigten in der Subgruppe der Patientinnen mit positiven Nodalstatus einen stärkeren Effekt der Höhe der HTRA1-Expression auf die Prognose. Entsprechende Kaplan-Meier-Analysen der Daten aus der GEO-Datenbank sind in Tabelle 21 zusammen gefasst. Hier zeigen die Patientinnen, die eine adjuvante Therapie erhalten haben, ein signifikant besseres Gesamtüberleben und geringeres Rezidivrisiko bei höherer HTRA1-Expression. Für Patientinnen, die eine endokrine Therapie erhalten haben, ergeben sich bessere Ergebnisse zu Gesamtüberleben als auch zu Rezidivraten bei hoher HTRA1-Expression. Bessere Überlebensdaten bei hoher HTRA1-Expression in der Nodal-positiven Untergruppe oder bei Behandlung mit Chemotherapie konnten dagegen nicht gezeigt werden. Zu beachten ist bei diesen Ergebnissen, dass die Autoren des Auswertungsprogramms eine Mindestanzahl von 500 Patienten für eine als „hoch zuverlässige“ Analyse fordern. Dies wird für den Endpunkt Gesamtüberleben in keiner Subgruppe erreicht. Patientenzahlen unter 200 gelten als „vorläufige“ Analysen, dies trifft auf die Subgruppen der Patienten mit positiven Nodalstatus und der Patienten, die nur eine Chemotherapie oder eine endokrine Therapie erhalten haben, für den Endpunkt Gesamtüberleben zu [Györffy et al. 2010].

Tabelle 21 Übersicht über HTRA1 als prädiktiven Marker in den verschiedenen Subgruppen aus der GEO-Datenbank

Gruppe		n	Mediane Expression (Range)	Cut-off	HR	p
Gesamt	RFS	2809	3980 (30 - 19421)	3979	0,79 (0,7-0,9)	0,00032
	OS	971	4069 (330 - 18047)	5190	0,63 (0,48-0,83)	0,00091
Nodal positive Subgruppe	RFS	569	4221 (330 – 14791)	2892	1,24(0,89-1,73)	0,20
	OS	137	3560 (330 – 11950)	2823	1,97 (0,9-4,3)	0,08
Nodal negative Subgruppe	RFS	1468	4070 (30 - 19421)	3439	0,87 (0,72-1,05)	0,14
	OS	339	3897 (471 – 13850)	5199	0,48 (0,29-0,8)	0,00037
Chemo-therapie	RFS	385	4229 (333 – 14791)	5040	1,44 (1-2,09)	0,051
	OS	69	3609 (629 - 12004)	4500	0,66 (0,31-1,43)	0,29
Endokrine Therapie	RFS	752	4144 (30 - 17660)	4565	0,67 (0,5-0,9)	0,0076
	OS	128	4494 (636 – 12877)	6132	0,2 (0,08-0,52)	0,00026
Adjuvante Therapie	RFS	1440	3819 (30 - 29643)	2421	0,7 (0,58-0,84)	0,00011
	OS	305	3616 (330 - 12877)	5228	0,48 (0,29-0,8)	0,004
Keine adjuvante Therapie	RFS	933	4324 (450 – 19421)	4411	0,84(0,68-1,05)	0,12
	OS	319	4724 (471-18047)	5199	0,51 (0,31-0,84)	0,0071

4.1.3.3 HTRA1 als prognostischer Faktor

Prognostische Faktoren sind Einflussgrößen auf den Krankheitsverlauf, die unabhängig von einer Therapie sind. Eine Gruppe von 311 Patientinnen aus der GEO-Datenbank hatte keine adjuvante Therapie erhalten. Hier wurde die Zeit ohne Fernmetastasen in den Armen mit hoher und niedriger HTRA1-Expression verglichen. Als Schwellenwert wurde die mediane HTRA1-Expression in dieser Gruppe, 4619 gewählt. Dieser Endpunkt ist spezifischer für die Erkrankung als das Gesamtüberleben, das auch andere Todesursachen beinhaltet. Gleichzeitig besteht bei Fernmetastasierung des Mammakarzinoms eine unheilbare Erkrankung. Wie die Kaplan-Meier-Kurve in Abbildung 26 illustriert, waren in der Gruppe mit hoher HTRA1-Expression Fernmetastasen signifikant (Signifikanzniveau $p=0,00061$) und beträchtlich (Hazard ratio $HR=0,53$ 95%-Konfidenzintervall: 0,36-0,76) seltener als bei niedriger HTRA1-Expression in den betrachteten 10 Jahren nach Diagnosestellung.

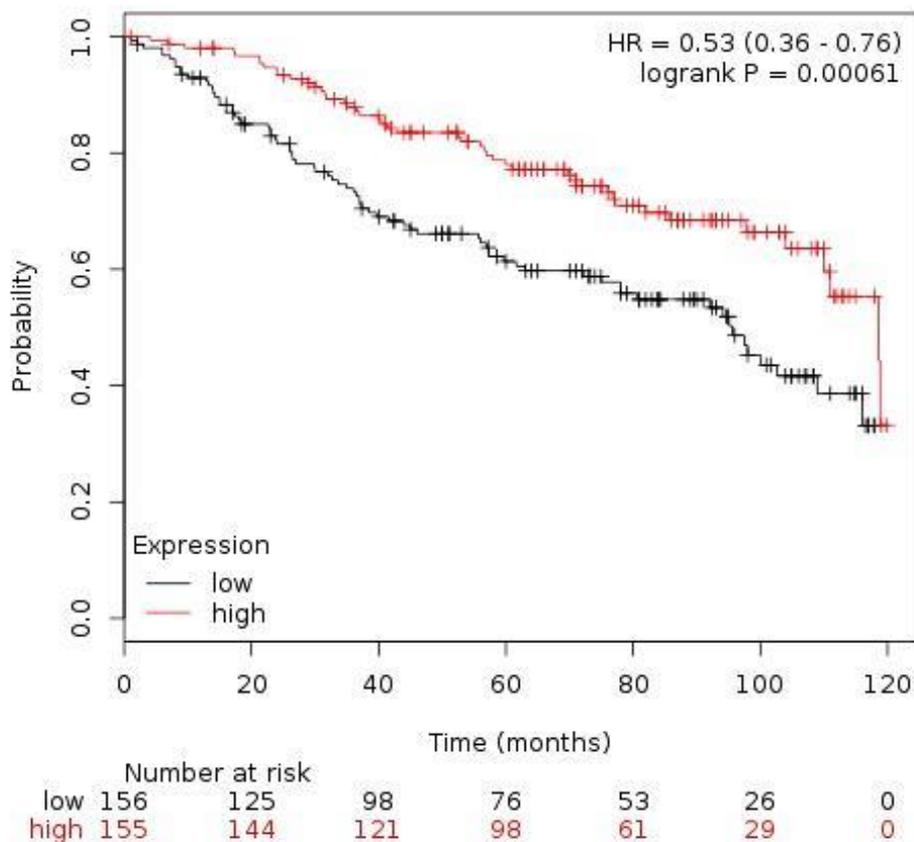


Abbildung 26 HTRA1-Expression als prognostischer Faktor: Zeit bis zur Fernmetastasierung in der Untergruppe von Patientinnen, die nach Operation keine adjuvante Therapie erhalten hatten. Analyse von Fällen aus der GEO-Datenbank.

4.1.4 HTRA1-Expression in den Zelllinien

Die HTRA1-Expression der Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-231 und MCF7 sowie von zwei Varianten der Ovarialkarzinom-Zelllinie HEY (Wildtyp(WT) und Cisplatin-resistent) wurde bestimmt. Die Normalisierung erfolgte über das Housekeeping-Gen HPRT, das im selben Taqman-Lauf mitbestimmt wurde. Die Ovarialkarzinom-Zelllinien wurden in die Arbeit aufgenommen, da es Hinweise für eine Rolle von HTRA1 bei der Cisplatin-Resistenz gibt [Chien et al. 2006; Catalano et al. 2011; Spugnini et al. 2006]. Für die Mammakarzinom-Zelllinien wurde neben RNA auch DNA für die spätere DNA-Methylierungs-Analyse isoliert. RNA wurde wie unter 3.3.4.1(S.28) beschrieben isoliert und in cDNA umgewandelt (vgl. 3.3.4.2, S.29). Es wurden die Ct-Werte für HTRA1 und HPRT in Proben mit zwei cDNA-Verdünnungen (1:5 und 1:20) jeweils in Triplikaten gemessen. Mit dem Programm ABI Prism SDS Software wurde die relative HTRA1-Expression gegenüber der Kalibrator-Probe, einem Ovarialkarzinomgewebe, errechnet.

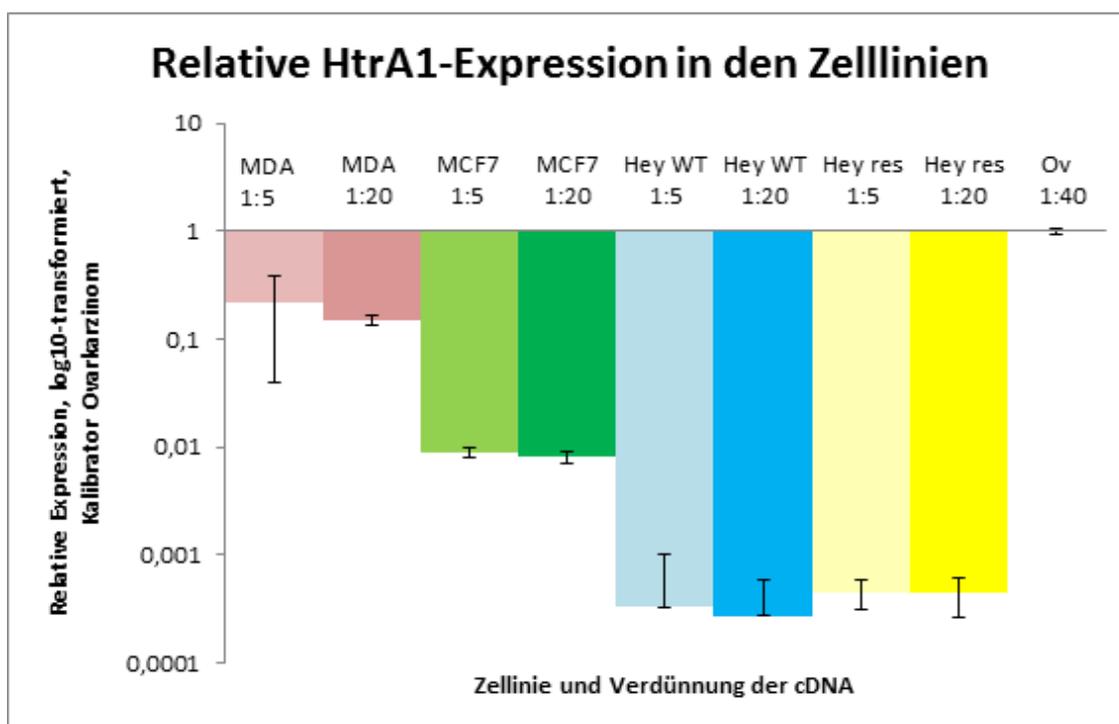


Abbildung 27 HTRA1-Expression der Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB231(MDA) und MCF7 sowie der Ovarialkarzinom-Zelllinien HEY-WT und HEY-Cisplatin-resistent(Hey res), mit Housekeeping-Gen HPRT normalisiert. Als Kalibrator wurde eine Ovarialkarzinom-Probe(Ov) benutzt. Y-Achse ist zur Darstellbarkeit logarithmisch skaliert.

Die Ergebnisse wurden zur besseren Darstellbarkeit Log-transformiert (Basis 10) und sind in Abbildung 27 dargestellt. Die Expressionswerte der verschiedenen Verdünnungen entsprechen sich gut, dies spricht für eine adäquate Normalisierung über das Housekeeping-Gen HPRT. Die Zelllinien weisen eine geringere HTRA1-Expression als das Ovarialkarzinom-Gewebe auf. HEY-Untertypen zeigten eine stark verminderte Expression gegenüber den Mammakarzinom-Zelllinien, ein Unterschied der HTRA1-Expression zwischen den beiden Varianten war nicht festzustellen. Zur Expression der Mammakarzinom-Zelllinien ist im Hinblick auf die spätere DNA-Methylierungs-Analyse festzuhalten, dass MDA-MB-231 Zellen eine ca. 19-fach höhere HTRA1-Expression als MCF-7 Zellen zeigten (berechnet aus Expressionswerten der cDNA-Verdünnung 1:20).

4.2 DNA-Methylierung

Experimente mit der Ovarialkarzinom-Zelllinie OV207 in einer Arbeit von Chien et al. [Chien et al. 2004] zeigten eine dosisabhängige Steigerung der HTRA1-Expression bei Behandlung der Zellen mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-aza-2'-Deoxycytidin. Dies weist auf eine Rolle der DNA-Methylierung bei der Expressionsregulation von HTRA1 hin. Da diese hauptsächlich an der DNA-Base Cytosin mit nach 3' benachbarten Guanosen (CpG) geschieht, wurde mit Hilfe des Programms *Meth Primer* [Li et al. 2002] ein DNA-Abschnitt mit einem hohen Guanosen-/Cytosin-Anteil und vielen CpG-Dinukleotiden für die Untersuchung ausgewählt (Abbildung 28). Über Bisulfit-Sequenzierung wurde das Ausmaß der DNA-Methylierung in diesem Bereich um das Startcodon der HTRA1-mRNA untersucht.

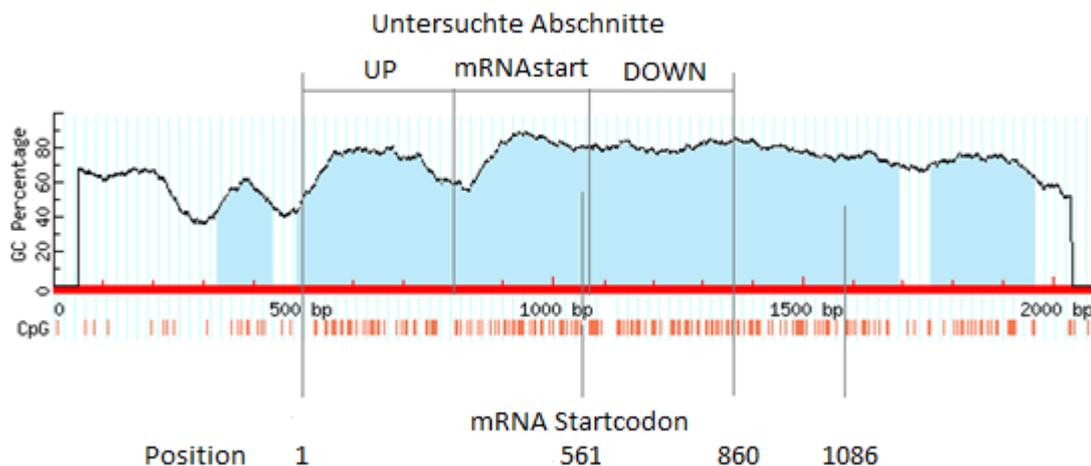


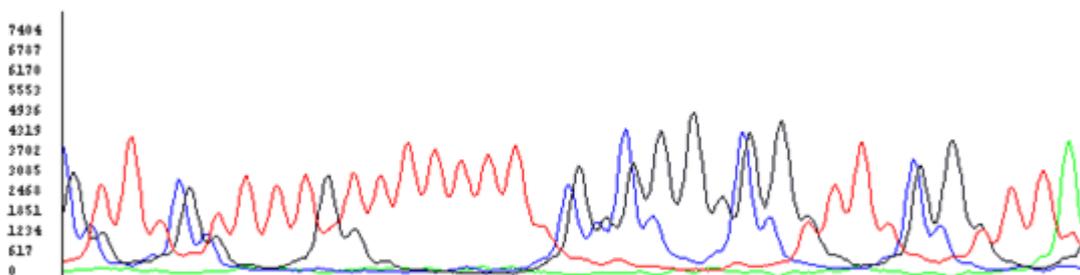
Abbildung 28 G-/C-Gehalt der DNA um das HTRA1-Startcodon; blau eingefärbt sind Regionen mit einem G-/C-Gehalt über 50% und mindestens 100bp Länge; CpG-Basenabfolgen sind unter dem Diagramm als rote Striche aufgetragen. Erstellt in *Meth Primer* [Li et al. 2002] und adaptiert.

Aufgrund der starken Fragmentierung der DNA während der Bisulfittreaktion wurde die Sequenzierung des DNA-Abschnittes (Position 1-1086 in Abbildung 28) in drei Teilen UP, mRNAstart und DOWN durchgeführt. Die letzten ca. 220bp des Teils DOWN waren aufgrund von Überlagerung des Sequenzierungsabschnitts durch ein zweites PCR-Fragment nicht auswertbar, deswegen umfasst der untersuchte Bereich nur insgesamt 860bp.

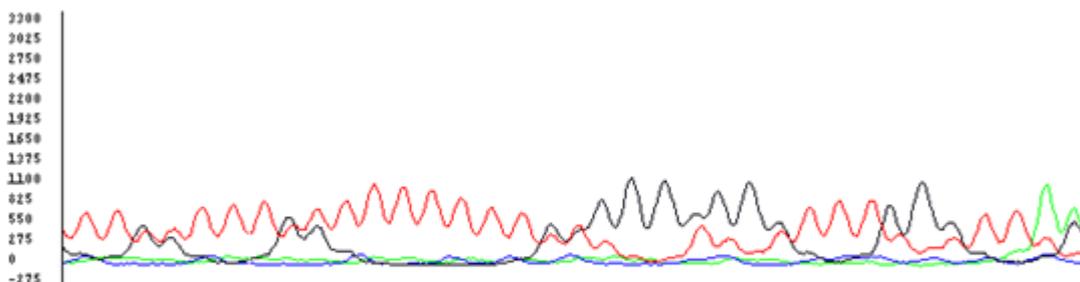
4.2.1 Leukozyten-DNA und Positivkontrolle

Aus den Leukozyten einer gesunden Frau isolierte DNA (Probe 82 aus dem Labor-Bestand) wurde mittels Bisulfitt-Sequenzierung in den drei Abschnitten untersucht, hierbei konnte keine relevante DNA-Methylierung festgestellt werden. DNA derselben Probe wurde mit dem M.Sss1-Methylase Kit (New England Biolabs Inc., Ipswich, Massachusetts) behandelt, um eine Positivkontrolle zu erhalten. Die Methyltransferase Sss1 fügt jedem Cytosin innerhalb von einem CpG-Dinukleotid eine Methylgruppe an. Als Donor dient dabei S-adenosylmethionin(SAM). Es wurde 1 µg DNA (Konz 0,525 µg/µl) mit 1µl Methyltransferase (Stocklösung 1:10 verdünnt), 3µl SAM (Stocklösung 1:10 verdünnt), dem Substrat der Methylase, und 2µl 2xNE-Puffer in einem Ansatz von insgesamt 20µl bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach 4 und 8 Stunden wurden je 3 µl SAM und nach 8 Stunden 1µl Methylase zugegeben. Die Positivkontrolle wurde für den Abschnitt mRNAstart sequenziert, dabei zeigte sich eine sehr starke Methylierung aller CpG-Dinukleotide (Abbildung 29).

Positiv-Kontrolle



Unbehandelte Leukozyten-DNA



CC **CG** CCCTG CCC CCTC **CGCG** GG **CG** GTCC **CGG** TCC A

Abbildung 29 Bisulfite-Sequenzierung, Beispiel aus Abschnitt mRNAstart; Oben Positiv-Kontrolle nach DNA-Methylierung durch MSs1: Alle CpG-Dinukleotide zeigen jetzt ein Cytosin-Signal(blau), darunter unbehandelte Leukozyten-DNA, unten original DNA-Sequenz vor Bisulfitebehandlung

4.2.2 Ergebnisse der genomischen Bisulfite-Sequenzierung von Tumor- und Zelllinien DNA ohne vorherige Klonierung

Um einen direkten Vergleich von Expression und DNA-Methylierung zu ermöglichen, wurden 12 Tumoren aus dem Kollektiv Nijmegen ausgewählt, die eine sehr niedrige oder eine sehr hohe relative HTRA1-Expression zeigten (siehe auch Tabelle 2). Aus den Zelllinien MCF7 und MDA-MB 231 wurde neben DNA auch RNA isoliert. Die Expressionsanalyse der mRNA ergab eine ca. 20-fache HTRA1-Expression in MDA-MB 231-Zellen im Vergleich zu den MCF7-Zellen (vgl. 4.1.4). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 22 aufgeführt. Untersucht wurden für alle Proben der Abschnitt „UP“. Der Abschnitt „mRNAstart“ war für die Probe 3 nicht auswertbar, sehr wahrscheinlich aufgrund der geringen DNA-Konzentration dieser Probe. Der Abschnitt „DOWN“ wurde nur an der Zelllinien-DNA und fünf der Tumorproben untersucht, es zeigte sich kein Hinweis auf Methylierung.

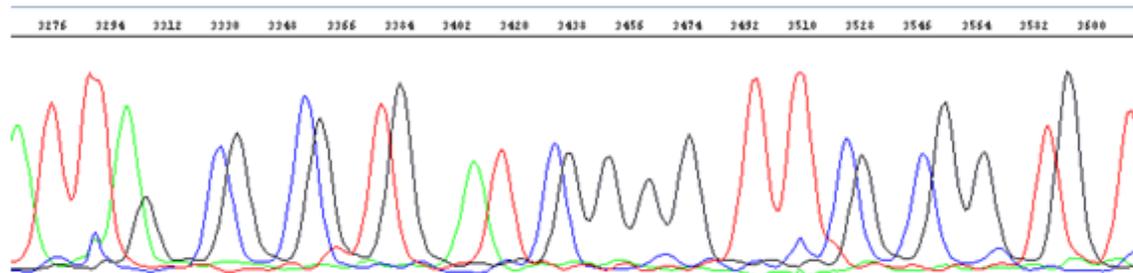
Tabelle 22 Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung: ++ starke Methylierung, + Methylierung deutlich sichtbar, (-)minimale Methylierung kann vorhanden sein, - kein Hinweis auf Methylierung; n.u. nicht untersucht

Teilabschnitt	UP	mRNASTart	DOWN	HTRA1 Expression ^a
MCF7	++	+	-	niedrig
MDA MB 231	(-)	-	-	ca. 20-fach zu MCF7
Tumor 1	-	-	-	niedrig (1,9)
Tumor 2	(-)	-	-	hoch (102,6)
Tumor 3	(-)	n.u.	n.u.	Hoch (121,8)
Tumor 4	-	-	-	hoch (117,1)
Tumor 5	-	-	n.u.	hoch (104,3)
Tumor 6	(-)	-	-	hoch (100,9)
Tumor 7	(-)	-	-	hoch (126,8)
Tumor 8	+	-	n.u.	niedrig (2,6)
Tumor 9	+	-	n.u.	niedrig (2,7)
Tumor 10	(-)	-	n.u.	niedrig (9,0)
Tumor 11	-	-	n.u.	niedrig (10,4)
Tumor 12	(-)	-	n.u.	niedrig (2,3)

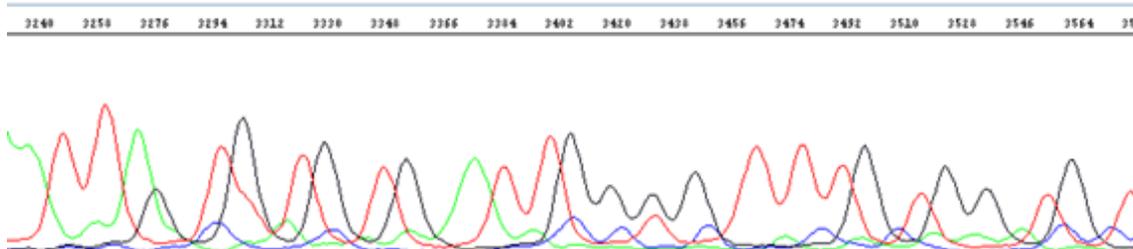
a: bei den Tumorproben sind die HTRA1-mRNA-Werte, normalisiert mit G6PDH, relativ zur Kallibratorprobe in Klammern angegeben (vgl. 4.1.2, S. 53ff.)

Die DNA der Zelllinie MCF-7 zeigt die stärkste CpG-Methylierung. Alle 35 CpG-Dinukleotide des Abschnitts UP sowie die ersten fünf CpG-Dinukleotide des Abschnittes mRNASTart zeigten in der Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung ausschließlich ein Signal für Cytosin. Dies bedeutet, dass vor der Behandlung mit Bisulfit eine Methylierung des Cytosin vorgelegen haben muss. Dagegen zeigte die Zelllinie MDA-MB 231 allenfalls minimale CpG-Methylierung (vgl. Abbildung 30).

MCF 7 - UP



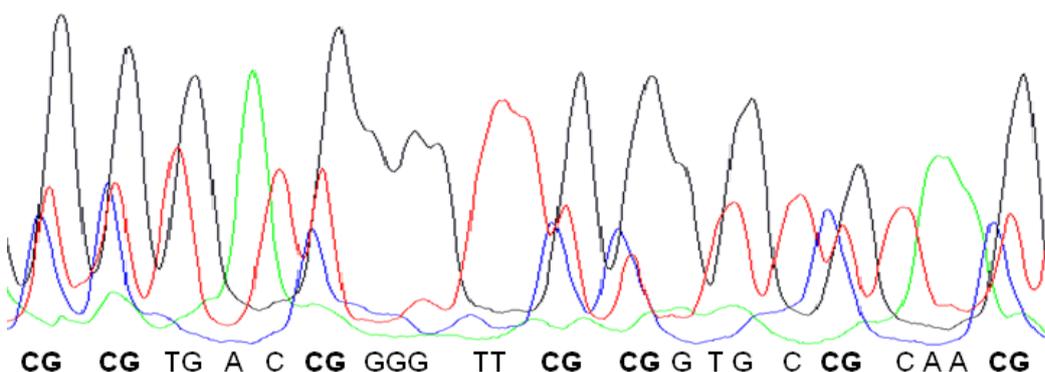
MDA MB 231 - UP



ACCAG **CG** **CG** TGAT **CG** GGG TC **CG** **CG** GTGT

Abbildung 30 Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung, Beispiel aus dem Abschnitt UP: MCF7 zeigt kein Signal für Thymin(rot) in CpG-Dinukleotiden, aber zu Thymin konvertierte Cytosine außerhalb der CpG-Inseln. MDA MB 231 zeigt Cytosin-Signal(blau) kaum über dem Hintergrundrauschen, dies spricht für eine DNA-Methylierung allenfalls in einem geringen Prozentsatz der Zellen. Unten ist die Originalsequenz angegeben, CpG-Dinukleotide sind fettgedruckt.

Nur zwei der untersuchten Tumorproben zeigten nach Bisulfit-Behandlung deutlich erhaltene Cytosin-Signale an den CpG-Dinukleotiden in der Sequenzierung. Es handelte sich hierbei um die Tumorproben 8 und 9, die zu den Tumorproben mit einer sehr geringen HTRA1-Expression gehörten (Beispiel in Abbildung 31). Sie waren nicht so ausgeprägt wie bei der Zelllinie MCF7 und auch nicht an allen CpG-Dinukleotiden vorhanden. Zur genaueren Quantifizierung wurde die Klonierung der Bisulfit-behandelten DNA dieser beiden Proben mit anschließender Sequenzierung vorgenommen (siehe 4.2.3, S.79).

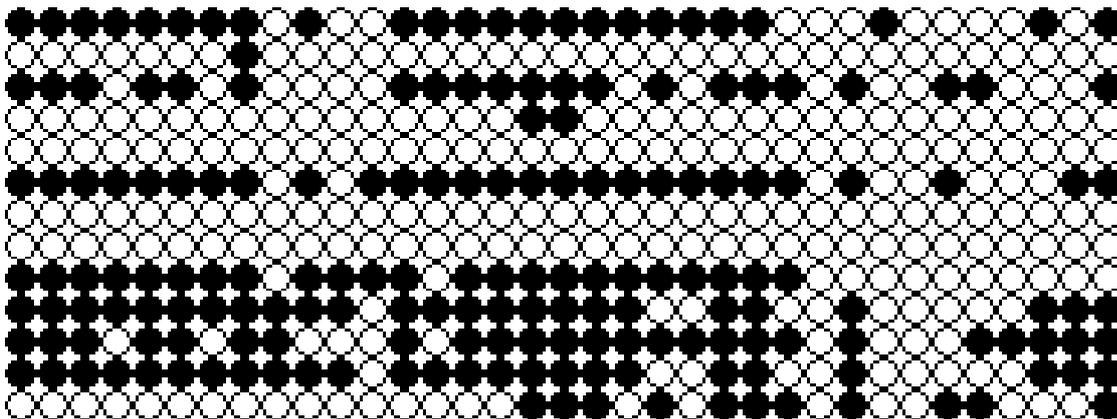


CG **CG** TG A C **CG** GGG TT **CG** **CG** G TG C **CG** CAA **CG**

Abbildung 31 Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung, Tumor 8, Beispiel aus dem Abschnitt UP

4.2.3 Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung mit vorheriger Klonierung

Der Teilabschnitt UP zeigte in der Bisulfit-Sequenzierung der genomischen DNA deutliche DNA-Methylierung bei den Tumoren 8 und 9, die beide eine niedrige HTRA1-Expression aufweisen. Diese Ergebnisse wurden durch Klonierung der Tumor-DNA und anschließende Bisulfit-Sequenzierung genauer quantifiziert. Wie in Abbildung 32 und 33 dargestellt, zeigten von den untersuchten Klonen die des Tumors 8 häufiger methylierte CpG-Dinukleotide. Hierbei waren 15 der 35 CpG-Dinukleotide im Tumor 8 bei mehr als 50% der Klone methyliert, während im Tumor 9 nur vier CpG-Dinukleotide bei mehr als 30% der Klone methyliert waren.



54 54 54 38 54 54 38 54 31 38 23 15 54 38 54 54 69 69 62 46 46 31 62 62 38 0 46 7,7 0 23 23 7,7 31 31 54

Abbildung 32 CpG-Methylierung des Tumor 8, die Spalten zeigen die CpG-Dinukleotide 1-35 des Abschnitts UP, die Zeilen die Klone 1-13, unter der Abbildung ist die Anzahl der Klone mit Methylierung am entsprechenden CpG-Dinukleotid in Prozent angegeben

Der Vergleich der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung mit und ohne vorherige Klonierung (Beispiel Abbildung 34) zeigte, dass auch ohne Klonierung alle wesentlichen Methylierungen erkannt wurden. Somit war nicht davon auszugehen, dass eine Klonierung der DNA der restlichen Tumoren, die in der Bisulfit-Sequenzierung höchstens eine minimale Methylierung gezeigt hatten, positive Resultate liefern würde.

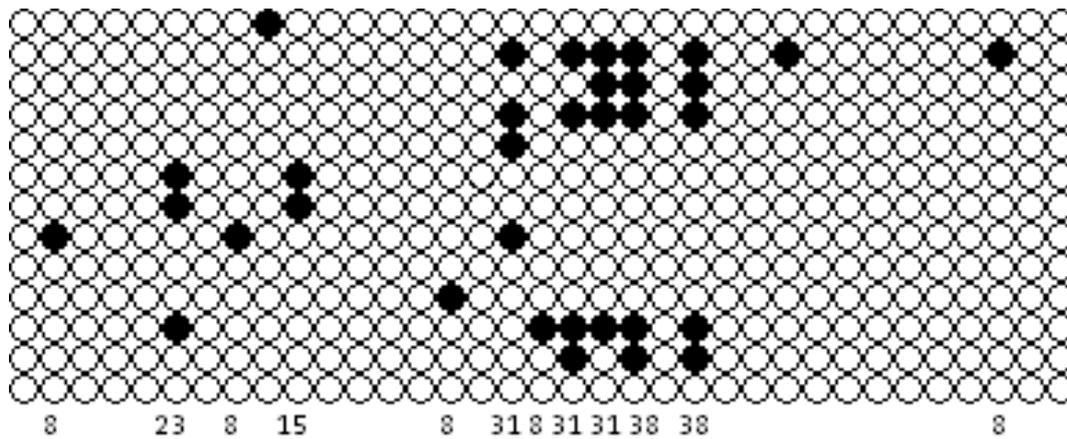


Abbildung 33 CpG-Methylierung des Tumors 9, Die Spalten zeigen die CpG-Dinukleotide 1-35 des Abschnitts UP, die Zeilen die Klone 1-13, unter der Abbildung ist die Anzahl der Klone mit Methylierung am entsprechenden CpG-Dinukleotid in Prozent angegeben

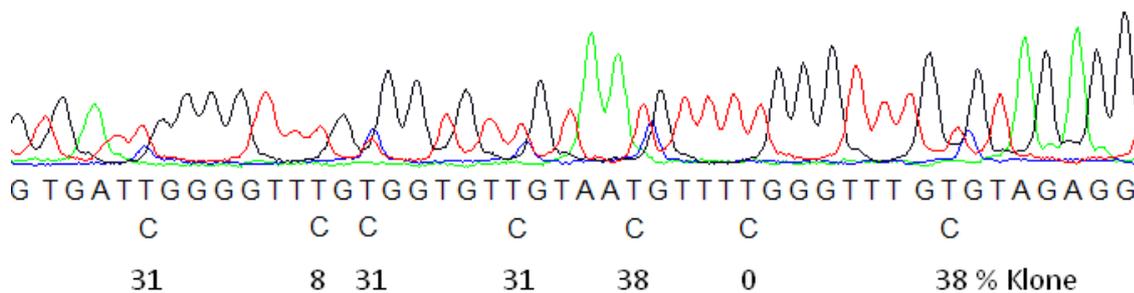


Abbildung 34 Vergleich der Ergebnisse der Bisulfid-Sequenzierung ohne vorheriges Klonieren und dem Prozent der Klone, bei dem das entsprechende Cytosin Methylierung zeigte; Beispiel Tumor 9, es ist die Sequenz um die CpG-Dinukleotide 17-23 dargestellt

5 Diskussion

Eine niedrige HTRA1-mRNA-Expression im Primärtumor ist mit einer schlechteren Gesamtüberlebensrate und einer höheren Rezidiv-Wahrscheinlichkeit bei Patientinnen mit primärem Mammakarzinom assoziiert. Das zeigte sich in der Analyse von Proben aus dem Kollektiv Nijmegen (131 Patientinnen) sowie auch in den Daten aus der öffentlich zugänglichen GEO-Datenbank (2809 Patientinnen). Durch die Untersuchung der DNA von zwei Zelllinien und zwölf Tumorproben konnte zudem DNA-Methylierung als ein möglicher Regulationsmechanismus der HTRA1-Expression bestätigt werden.

5.1 Analyse der mRNA-Expression von HTRA1

5.1.1 Methodenetablierung anhand von Ovarialkarzinom-Proben und Mammakarzinom-Proben aus dem Kollektiv Dresden

Zur Etablierung der Methodik wurde zunächst die relative HTRA1-mRNA-Expression von 17 malignen Ovarialkarzinomen und einem Borderline-Tumor sowie von 39 Mammakarzinomen aus dem Kollektiv Dresden mit Hilfe der Taqman-Methode bestimmt. Durch die Erstellung von Standardkurven mittels Verdünnung der cDNA (im Bereich von 1:2 bis 1:2000 für die Ovarialkarzinom-Proben bzw. 1:20 bis 1:4000 für die Mammakarzinom-Proben) konnte die Stabilität der Messung über einen großen Konzentrationsbereich hinweg sowie eine adäquate PCR-Effizienz gezeigt werden. Die wiederholte Messung einiger Ovarialkarzinom-Proben ergab zusätzlich, dass nur eine geringe Intra-Assay-Variabilität vorlag. Die HTRA1-Messungen an Ovarialkarzinom-Proben, normalisiert mit HPRT, ergab für 16 der Tumoren eine niedrigere HTRA1-Expression als der Borderline-Tumor. Die Probe, die ähnliche HTRA1-Level wie der Borderline-Tumor aufwies, stammte von einem gut differenzierten (G1) Tumor einer Patientin mit Stadium Figo Ic. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus der Literatur. Über eine stufenweise Erniedrigung der HTRA1-mRNA Expression von Ovar-Normalgewebe zu benignen Tumoren, Borderline-Tumoren und Ovarialkarzinom ist berichtet worden [Narkiewicz et al. 2008]. Ein

Light-Cycler-Experiment von Chien et al. [Chien et al. 2004], bei dem die relative HTRA1-mRNA-Expression von zwei Borderline-Tumoren und elf fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen, normalisiert mit RPS9F (ribosomales Protein S9F) gemessen wurde, zeigte eine ca. 1,5- bis 60-fache Expression von HTRA1 in Borderline-Tumoren in Vergleich zu Ovarialkarzinom-Proben. Ebenso zeigte der Borderline-Tumor in dieser Arbeit eine ca. 0,9- bis 18-fache Expression im Vergleich zu den Ovarialkarzinom-Proben. Als Housekeeping-Gen wurde zunächst ein Enzym des Purin-Stoffwechsels, die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet. Die im Taqman-System gemessenen HPRT-Werte an Mammakarzinom-Proben aus dem Kollektiv Dresden korrelierten gut mit den Werten aus vorausgehenden Lightcycler-Experimenten, so dass für die Normalisierung des Kollektivs Nijmegen Housekeeping-Gen-Expressionswerte aus den Lightcycler-Experimenten verwendet werden konnten. Statt HPRT wurde hier die Guucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) verwendet, ein Enzym das hauptsächlich der Regeneration des Kofaktors NADPH dient. G6PDH ist ein häufig verwendetes Housekeeping-Gen bei Experimenten mit Mammakarzinom-Proben ist [Biermann et al. 2008; Ribeiro-Silva et al. 2007]. Ein Housekeeping-Gen, das in jeder Zelle immer stabil exprimiert wird, konnte bisher nicht gefunden werden [Lee et al. 2002], die Normalisierung mit Housekeeping-Genen bringt daher immer einen gewissen Fehler mit sich. Ein Ansatz zur Korrektur dieses Fehlers ist die Verwendung von mehr als einem Housekeeping-Gen, wie z.B. die Affymetrix HGU133A und HGU133+2 Microarrays, die drei Housekeeping-Gene (GAPDH, beta-Actin, ISGF-3) verwenden. Auf diesen Microarrays basieren die Daten des zweiten Kollektivs, das zur Validierung der Ergebnisse verwendet wurde.

5.1.2 HTRA-1-mRNA-Expression in Mammakarzinom-Proben des Kollektivs Nijmegen

5.1.2.1 Spannweite der HTRA1-Expression und Assoziation mit der Tumorbilologie

Einen Schwerpunkt der Arbeit bildete die Bestimmung der relativen HTRA1-mRNA-Expression, normalisiert mit dem Housekeeper-Gen G6PDH, in 131 Mammakarzinom-Proben aus dem Kollektiv Nijmegen. Über eine stark erniedrigte

oder fehlende Expression des HTRA1-Proteins in Mammakarzinom-Gewebe im Vergleich zu gesunden Brustgewebe berichteten Wang et. al. [Wang et al. 2012]. In der vorliegenden Arbeit fanden sich große Unterschiede in der HTRA1-mRNA-Expression der Mammakarzinom-Proben. Die Probe mit der höchsten Expression hatte eine 308-fache HTRA1-Expression im Vergleich zur Probe mit der niedrigsten Expression, die gleich 1 gesetzt wurde. Es gibt keine vergleichbaren Studien zur HTRA1-mRNA-Expression im Mammakarzinom. Unsere Analysen der Affimetrix-Daten aus der öffentlich zugänglichen GEO-Datenbank bestätigten aber das höchst unterschiedliche Ausmaß der HTRA1-Expression in 2809 Mammakarzinom-Proben, hier ergab der höchste relative HTRA1-mRNA-Expressionswert das 647-fache des niedrigsten Werts (vgl. 4.1.3.1, S.67).

Für Endometriumkarzinome ist eine Assoziation von aggressiveren klinischen Charakteristika wie Entdifferenzierung und HTRA1-Verlust beschrieben [Mullany et al. 2011]. Ebenso zeigten Mammakarzinom-Proben aus Nijmegen mit aggressiverem klinischem Charakter, wie G3-Tumoren und Tumoren von Patientinnen mit einer höheren Anzahl von befallenen Lymphknoten, tendenziell niedrigere HTRA1-Expressionwerte. Eine signifikante Assoziation wurde zwischen niedriger HTRA1-Expression und größerem Tumordurchmesser beobachtet. Betrachtet man außerdem Tumor-Proben mit sehr hohen Östrogenrezeptor-Konzentrationen, so fand sich darunter keine mit hoher HTRA1-Expression. Eine signifikante Reduktion der HTRA1-mRNA- und Protein-Expression wurde in der Niere von männlichen Goldhamstern nach längerer Östrogen-Gabe gezeigt, in Folge derer sich Nierenzellkarzinome im Hamster entwickeln [Zurawa-Janicka et al. 2008]. Ein mit der Überstimulierung des Östrogen-Signalwegs einhergehender HTRA1-Verlust könnte somit auch zur Entstehung und/oder Fortschreiten eines Mammakarzinoms beitragen. Allerdings wurden in dieser Arbeit extrem hohe Östrogenrezeptor-Werte nur in 18 Fällen beobachtet.

5.1.2.2 HTRA1, TGF- β und uPA/uPA-Rezeptor/PAI-1

Ein inverser Zusammenhang ist für HTRA1 und PAI-1 während der Differenzierung von Neuronen *in vitro* und im Mausmodell gezeigt worden [Launay et al. 2008] und wäre auch in malignen Zellen vorstellbar, da eine niedrige HTRA1-Expression genau wie eine hohe PAI-1/uPA-Expression für eine höhere Aggressivität der Erkrankung

spricht. Komponenten des TGF- β -Signalwegs könnten die Verbindung zwischen beiden Proteinen darstellen. In Neuronen ist eine zunehmende HTRA1-Expression mit einem Verlust der Aktivität im TGF- β -Signalweg und einer reduzierten PAI-1-Expression verbunden [Launay et al. 2008]. Bei der Untersuchung der Mammakarzinom-Proben aus dem Kollektiv Nijmegen wurde eine inverse Korrelation von HTRA1- und uPA-/PAI-1-mRNA Expression erwartet. Diese konnte nicht bestätigt werden. Es bestand eine signifikante, positive Assoziation. Wichtig ist allerdings, dass genau gegensätzlich zu den Vorgängen in malignen Zellen, Neuronen mit niedriger HTRA1-Expression Apoptose zeigten, während eine hohe Expression zum Überleben der ausdifferenzierten Zellen beitrug [Launay et al. 2008]. In Studien zu malignen Erkrankungen existieren verschiedene Ergebnisse: So fanden Narkiewicz et. al eine signifikante negative Korrelation zwischen der HTRA1- und der TGF- β -Protein-Expression im Endometriumkarzinom, diese konnte aber in einer anderen Studie zum Ovarialkarzinom nicht nachgewiesen werden [Hudis et al. 2011; Narkiewicz et al. 2008]. Bei CARASIL, einer Erbkrankheit, die mit dem Verlust der HTRA1-Aktivität einhergeht, werden erhöhte extrazellulären TGF- β -Spiegel beobachtet [Shiga et al. 2011; Hara et al. 2009]. Daher ist trotz der widersprüchlichen Ergebnisse ein Einfluss von HTRA1 auf den TGF- β -Signalweg denkbar.

5.1.2.3 HTRA1-mRNA-Expression und Überleben- bzw. Rezidiv-Wahrscheinlichkeit

In der Literatur liegen zwei Studien vor, in denen über einen Einfluss der HTRA1-Expression auf den Krankheitsverlauf maligner Erkrankungen berichtet wird. Die höhere HTRA1-Protein-Expression war in einer Studie mit 70 Mesotheliom-Patienten mit einem signifikant besseren Überleben verbunden [Baldi et al. 2008]. Auch hatten Patienten mit hepatozellulären Karzinom bei positiver immunhistochemischer Färbung des Tumors für HTRA1 bessere Überlebensraten als bei fehlendem HTRA1-Protein im Tumor [Zhu et al. 2010]. Über das Rezidiv-freie Intervall sagen beide Publikationen nichts aus. Über HTRA1-mRNA-Expression und Rezidiv- bzw. Überlebensraten beim Mammakarzinom gab es bisher keine Studien. Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv aus dem Universitätsklinikum Nijmegen enthielt Proben von Patientinnen mit loko-regionär begrenztem Mammakarzinom, d.h. ohne Fernmetastasen bei Diagnosestellung. Die 131 Patientinnen (Gesamtkollektiv) wurden nach der HTRA1-mRNA-Expression im Tumor in eine Gruppe mit hoher und eine Gruppe mit niedriger HTRA1-mRNA-Expression geteilt. Die Gruppe mit hoher

HTRA1-mRNA-Expression zeigte ein signifikant besseres Gesamtüberleben (HR=0,448; 95%KI=0,225-0,896) und kombiniertes krankheitsfreies Überleben (HR=0,547; 95%KI=0,319-0,938). Bei Patientinnen mit nachgewiesenem Lymphknotenbefall war der Unterschied noch stärker ausgeprägt. Hier blieben die Unterschiede der Gruppen mit hoher und niedriger HTRA1-Expression auch nach Anpassung der p-Werte wegen des vorangegangenen multiplen Testen zur Bestimmung des Trennwerts in Hinblick auf Gesamtüberleben und kombiniertes krankheitsfreies Überleben signifikant. Auch bezüglich des Rezidiv-freien-Überlebens zeigte sich ein Vorteil bei hoher HTRA1-Expression im Tumor (HR=0,301; 95%KI=0.127-0.714, p=0,006). Nach Anpassung der p-Werte nach multiplen Testen konnte in der nodal-positiven Gruppe das geringere Rezidivrisiko bei höherer HTRA1-Expression (HR=0,301; 95%KI=0.127-0.714) als grenzwertig signifikant (p=0.0529) nachgewiesen werden. Für die multivariate Analyse wurde das kombinierte krankheitsfreie Überleben herangezogen. Hierbei wird ein Todesfall ohne vorheriges Rezidiv einem Rezidiv gleichgesetzt. Dadurch erhält man eine maximale Anzahl von Ereignissen. Das kombinierte krankheitsfreie Überleben hatte univariat einen signifikanten Unterschied in den Gruppen mit höherer bzw. niedriger HTRA1-Expression gezeigt, bei Berücksichtigung des multiplen Testens blieb es in der nodal-positiven Subgruppe signifikant. Der Vorteil einer höheren HTRA1-Expression blieb auch in der multivariaten Cox-Regression (HTRA1-Expression, Tumorgröße, adjuvante Therapie) bestehen. Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für einen aggressiveren Krankheitsverlauf bei niedrigerem HTRA1, passend zu der *in vitro* beschriebenen Steigerung der Zellinvasivität, des Zellwachstums und der Migration bei HTRA1-Expressionsverlust [Chien et al. 2009b; Baldi et al. 2002; Chien et al. 2004; Mullany et al. 2011].

5.1.3 HTRA1-Expressionsanalyse in der GEO-Datenbank

Die Ergebnisse der HTRA1-Expression im Kollektiv Nijmegen konnten mit Hilfe einer Online-Datenbankanalyse bestätigt werden. Die verwendeten Daten basieren auf Expressionsdaten aus den Affymetrix HGU133A und HGU133+2 Microarrays [Györfy et al. 2010]. Zugehörige klinische Daten, mit einer Nachbeobachtungszeit begrenzt auf 15 Jahre, waren für 2809 Mammakarzinom-Patientinnen zum Rezidiv-freien Überleben und für 735 Patientinnen zum Gesamtüberleben vorhanden. Übereinstimmend mit den eigenen Daten zeigte sich ein besseres Gesamt- und

Rezidiv-freies Überleben bei hoher HTRA1-Expression (HR=0,6; 95%KI=0,48-0,83; p=0,00091 bzw. HR=0,8; 95%KI=0,7-0,9; p=0,00043).

Einen Unterschied gab es jedoch bezüglich der Ergebnisse zur Analyse in der Nodal-positiven Subgruppe. Im Gegensatz zu unseren experimentellen Daten, zeigte die online-Analyse der GEO-Datenbank keinen speziellen Nutzen für die Nodal-positive Untergruppe. Eine Erklärung könnte die größere Heterogenität bei der erheblich größeren Fallzahl sein. Dennoch gibt es Gründe für die Annahme, dass auch für Patientinnen der Nodal-positiven Subgruppe eine höhere HTRA1-Expression einen größeren Benefit hat. Lymphknotenmetastasen von Bronchialkarzinomen [Esposito et al. 2006] und malignen Melanomen [Baldi et al. 2002] zeigten eine niedrigere HTRA1-Expression im Vergleich zum jeweiligen Primärtumor. Auch zeigte eine Zelllinie, die von einer Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms abstammte, eine Herab-Regulation sowohl der HTRA1-mRNA-Expression als auch der Protein-Expression im Vergleich zu der vom Primärtumor abstammenden Zelllinie [Baldi et al. 2002]. So muss bei befallenen Lymphknoten davon ausgegangen werden, dass im Körper disseminierte Tumorzellen mit niedrigerer HTRA1-Expression vorhanden sind als im Primärtumor. Der Verlust der HTRA1-Expression ist wiederum mit aggressiveren Tumormerkmalen wie rascheres Wachstum, verminderte Apoptose, erleichterte Migration und Invasion verbunden [He et al. 2010; Chien et al. 2004; Chien et al. 2009a; Mullany et al. 2011]. Außerdem ist der positive Nodalstatus mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert, daher erhalten diese Patientinnen besonders häufig eine adjuvante Chemotherapie [Gnant et al. 2011]. Ein besseres Ansprechen auf Chemotherapie hat sich in Studien zum Ovar-, Mamma- und Magenkarzinom bei hoher HTRA1-Expression gezeigt [Chien et al. 2006; Barros Filho et al. 2010; Catalano et al. 2011]. 18 der 60 Patientinnen mit positiven Nodalstatus im Nijmegen-Kollektiv erhielten eine Chemotherapie. Eine, aufgrund der geringen Fallzahl mit Vorsicht zu betrachtende Kaplan-Meier-Analyse der Chemotherapie-Patientinnen zeigte zwar ein besseres Gesamtüberleben bei hoher HTRA1-Expression, es ergab sich jedoch ein ähnlicher Effekt in der Gruppe der nicht mit Chemotherapie behandelten nodal-positiven Patientinnen. Die Analyse der Untergruppe der Patientinnen aus der GEO-Datenbank, die Chemotherapie erhalten hatten, zeigte keinen Vorteil einer hohen HTRA1-Expression auf Rezidiv oder Gesamtüberleben. Es zeigte sich allerdings ein hoch signifikanter Vorteil einer

hohen HTRA1-Expression im Hinblick auf das Gesamtüberleben und die Rezidiv-Freiheit für Patientinnen, die überhaupt adjuvante oder nur eine endokrine Therapie erhalten hatten. In der Tat erhielten von den 52 Patientinnen mit negativen Nodalstatus im Nijmegen-Kollektiv nur drei eine adjuvante Therapie, verglichen mit 53 der 60 nodal-positiven Patientinnen. Östrogen-Gabe über längere Zeit führte in der Goldhamster-Niere zur Suppression von HTRA1-Expression [Zurawa-Janicka et al. 2008], weswegen eine Hemmung der Östrogen-Wirkung durch endokrine Therapie besonders wirksam zu sein scheint.

Die HTRA1-Herabregulation in einer Brustkrebszelllinie führte zur epithelial-mesenchymalen Transition, d.h. zum Verlust epithelialer Merkmale [Wang et al. 2012], was vielfach mit verminderten Ansprechen auf medikamentöse Therapie assoziiert ist [Marchini et al. 2012]. Der Zusammenhang von epithelial-mesenchymaler Transition und Therapie-Resistenz ist auch für die endokrine Therapie an der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 gezeigt worden [Lombardo et al. 2014]. Die epithelial-mesenchymale Transition begünstigt darüber hinaus den Vorgang der Metastasierung [Sheridan et al. 2006]. Teilt man die Patientengruppe ohne adjuvante Therapie aus der GEO-Datenbank nach dem Grad der HTRA1-Expression auf, um eine Aussage über HTRA1 als Prognose-Faktor zu erhalten, wiesen die Patientinnen mit hoher HTRA1-Expression tatsächlich signifikant weniger Fernmetastasierungen in den ersten zehn Jahren nach Erstdiagnose auf. In vitro ist eine vermehrte Invasion, Migration [Chien et al. 2009a; He et al. 2010] und Verminderung der Apoptose [He et al. 2010; Chien et al. 2004] bei einer verminderten HTRA1-Expression bereits gezeigt worden. Auch ein Mausmodell untermauert die These, dass die HTRA1-Expression im Tumor einen Rückschluss auf das Risiko einer Metastasierung und somit die Prognose zulässt: Nach der Injektion von Endometriumkarzinom-Zellen entstand eine größere Anzahl von Mikrometastasen in der Lunge von Mäusen, wenn diese Zellen HTRA1 nicht mehr exprimierten [Mullany et al. 2011]. Somit kann HTRA1 sowohl das Ansprechen auf eine adjuvante Therapie beeinflussen, als auch unabhängig von einer Therapie als Prognosefaktor beitragen.

5.1.4 HTRA1-mRNA-Expression von Zelllinien

Die HTRA1-mRNA-Expression in verschiedenen Zelllinien zeigte analog der HTRA1-Messung in Tumorproben erhebliche Unterschiede: So zeigte sich eine ca. 19-22fach höhere Expression in MDA-MB-231-Zellen im Vergleich zu MCF7-Zellen. Beide Zelllinien stammen aus malignen Pleuraergüssen, so dass von der Fähigkeit zur Metastasierung ausgegangen werden kann. Eine Erklärung für die relativ hohe HTRA1-mRNA-Expression in MDA-MB-231-Zellen ist die fehlende DNA-Methylierung, wie im nächsten Kapitel näher diskutiert wird. Dennoch ist laut Wang et al. trotz vorhandener mRNA-Expression nur wenig HTRA1-Protein in MDA-MB231-Zellen nachweisbar, da die Translation der mRNA zu HTRA1-Protein verhindert wird [Wang et al. 2012]. Sowohl die Cisplatin-sensitive als auch die Cisplatin-resistente Variante der Hey-Ovariakarzinom-Zelllinien wiesen eine sehr geringe HTRA1-Expression auf, so dass hier kein Unterschied bezüglich der HTRA1-Expression bei Chemotherapie-Resistenz sichtbar war.

5.2 Regulierung der HTRA1-Expression über DNA-Methylierung

Wenn die Höhe der HTRA1-Expression Einfluss auf Metastasierung, Überleben und Ansprechen auf eine Therapie hat, könnte ein Eingriff in die Regulation der HTRA1-Expression von therapeutischem Nutzen sein. In der Literatur werden außer der Östrogen-induzierten HTRA1-Suppression (vgl. 5.1.2.1, S. 82) und dem Verlust der Genregion auch epigenetische Mechanismen vermutet, die aufgrund der potentiellen Reversibilität besonders relevante Therapieansätze darstellen. Chien et al. berichteten über Re-Expression von HTRA1 nach Behandlung von Ovariakarzinom-Zellen mit der demethylierenden Substanz 5-aza-2'-Deoxycytidin [Chien et al. 2004], was auf Methylierungsereignisse in diesen Zellen hinweist. Kürzlich wurde zudem über die Methylierung des HTRA1-Promotors in vier von fünf Brustkrebszelllinien berichtet [Wang et al. 2012]. In allen Zelllinien, die diese DNA-Methylierung aufwiesen, fehlte die Expression von HTRA1-mRNA. Dagegen wurde in MDA-MB-231-Zellen, in denen die HTRA1-Promotormethylierung nicht auftrat, HTRA1-mRNA nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde ein größerer Bereich von 1000bp der Promotorregion inklusive des Transkription-Startpunktes des HTRA1-Gens auf Methylierung untersucht. Durch die Analyse von zwei Brustkrebs-Zelllinien, MCF-7

und MDA-MB-231, konnten 43 CpG-Dinukleotide (-537bp bis -203 bezogen auf den mRNA-Startpunkt) identifiziert werden, die bei MCF-7-Zellen eine fast vollständige Methylierung zeigten. MDA-MB-231-Zellen wiesen keine DNA-Methylierung in diesem Bereich auf und produzierten, verglichen mit den MCF7-Zellen, die ca. 22-fache HTRA1-mRNA-Menge. Zwei der sechs in dieser Arbeit untersuchten Mammakarzinom-Proben mit niedriger HTRA1-Expression zeigten DNA-Methylierung im HTRA1-Promotor-Bereich. Diese DNA-Methylierungen traten alle in dem Anteil der für die MCF7 beschriebenen CpG-Dinukleotide auf, der weiter vom mRNA-Start entfernt lag. Keine der sechs untersuchten Tumorproben mit hoher HTRA1-Expression zeigte Methylierung im HTRA1-Promoter, so dass DNA-Methylierung als ein möglicher Regulierungsmechanismus der HTRA1-Expression angenommen werden kann. Die Therapie mit demethylierenden Agenzien beim Mammakarzinom ist aktuell Gegenstand der präklinischen Forschung und muss noch das Problem lösen, wie eine selektive Aktivierung von Tumorsuppressorgenen, ohne die gleichzeitige Aktivierung von dem Metastasierungspotential des Tumors steigernden Genen, möglich ist [Chik et al. 2014]. Kenntnisse über durch DNA-Methylierung regulierte Tumorsuppressorgene und prätherapeutische Analyse des Methylierungsstatus dieser Gene könnten bei der Auswahl geeigneter Patienten helfen. Da bei zwei Drittel der Tumorproben mit niedriger HTRA1-mRNA-Expression keine DNA-Methylierung nachweisbar war, kann die DNA-Promotor-Methylierung aber als nur einer von mehreren Mechanismen des HTRA1-Verlusts in Tumorzellen gedeutet werden. So zeigte Wang et al. [Wang et al. 2012] eine Regulierung der HTRA1-Expression über Histone-Deacetylasen(HDAC) in der Zelllinie MDA-MB-231, die keine DNA-Methylierung aufweist. Bereits bekannt ist ebenfalls, dass HTRA1/PRSS11 in Mäusen durch HDAC1 reguliert wird [Zupkovitz et al. 2006]. HDAC-Inhibitoren könnten hier die HTRA1-Expression, falls vermindert, wieder herstellen.

6 Zusammenfassung

Deutsch: Die Analyse von 131 primären Mammakarzinom-Proben sowie von öffentlichen Datensätzen von 2809 Mammakarzinom-Fällen zeigte, dass eine erniedrigte mRNA-Expression des Tumorsuppressors HTRA1 mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert ist. Als möglicher Mechanismus des Verlusts der HTRA1-Expression wurde die DNA-Methylierung im Promoterbereich des HTRA1-Gens in zehn Tumorproben und in zwei Mammakarzinom-Zelllinien untersucht. Tatsächlich wies ein Teil der Proben mit niedriger HTRA1-mRNA-Expression eine DNA-Methylierung auf.

English: Low mRNA expression of the tumor suppressor HTRA1 in primary tumors was shown to be associated with unfavorable clinical outcome by measurement of mRNA expression in 131 breast cancer samples, as well as by analysis of 2809 breast cancer cases from the GEO database. DNA methylation in the promoter region of the gene HTRA1 was analyzed in ten tumor samples and two breast cancer cell lines for a possible role in downregulation of HTRA1 expression. In fact, part of the samples with low HTRA1 mRNA expression showed DNA methylation.

7 Literaturverzeichnis

Affymetrix Inc. 2004 **Data Sheet, GeneChip® Human Genome Arrays.**
http://media.affymetrix.com/support/technical/datasheets/human_datasheet.pdf Stand: 21.03.2014.

Ajayi, F.; Kongoasa, N.; Gaffey, T.; Asmann, Y.; Watson, W.; Baldi, A.; Lala, P.; Shridhar, V.; Brost, B.; Chien, J. **Elevated expression of serine protease HtrA1 in preeclampsia and its role in trophoblast cell migration and invasion** Am J Obstet Gynecol. 199 (2008) 557.e1.

Antoniou, A.; Pharoah, P. D. P.; Narod, S.; Risch, H. A.; Eyfjord, J. E.; Hopper, J. L.; Loman, N.; Olsson, H.; Johannsson, O.; Borg, Å.; Pasini, B.; Radice, P.; Manoukian, S.; Eccles, D. M.; Tang, N.; Olah, E.; Anton-Culver, H.; Warner, E.; Lubinski, J.; Gronwald, J.; Gorski, B.; Tulinius, H.; Thorlacius, S.; Eerola, H.; Nevanlinna, H.; Syrjäkoski, K.; Kallioniemi, O.-P.; Thompson, D.; Evans, C.; Peto, J.; Lalloo, F.; Evans, D. G.; Easton, D. F. **Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies** Am J Hum Genet. 72 (2003) 1117–1130.

Baldi, A.; Battista, T.; Luca, A. De; Santini, D.; Rossiello, L.; Baldi, F.; Natali, P. G.; Lombardi, D.; Picardo, M.; Felsani, A.; Paggi, M. G. **Identification of genes down-regulated during melanoma progression: a cDNA array study** Exp Dermatol. 12 (2003) 213–218.

Baldi, A.; LUCA, A. De; Morini, M.; Battista, T.; Felsani, A.; BALDI, F.; Catricalà, C.; Amantea, A.; Noonan, D. M.; Albin, A.; Natali, P. G.; Lombardi, D.; Paggi, M. G. **The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells** Oncogene. 21 (2002) 6684–6688.

Baldi, A.; Mottolise, M.; Vincenzi, B.; Campioni, M.; Mellone, P.; Di Marino, M.; Di Crescenzo, V. G.; Visca, P.; Menegozzo, S.; Spugnini, E. P.; Citro, G.; Ceribelli, A.; Mirri, A.; Chien, J.; Shridhar, V.; Ehrmann, M.; Santini, M.; Facciolo, F. **The serine protease HtrA1 is a novel prognostic factor for human mesothelioma** Pharmacogenomics. 9 (2008) 1069–1077.

Barros Filho, M.; Katayama, M.; Brentani, H.; Abreu, A.; Barbosa, E.; Oliveira, C.; Góes, J.; Brentani, M.; Figueira, M. **Gene trio signatures as molecular markers to predict response to doxorubicin cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients** Braz J Med Biol Res. 43 (2010) 1225–1231.

Baselga, J. **Treatment of HER2-overexpressing breast cancer** Ann Oncol. 21 (2010) vii36-40.

Baselga, J.; Perez, E. A.; Pienkowski, T.; Bell, R. Adjuvant **Trastuzumab: A Milestone in the Treatment of HER-2-Positive Early Breast Cancer Oncologist**. 11 (2006) 4–12.

Beckmann, M. W.; Blohmer, J.-U.; Costa, S.-D.; Diedrich, K.; Diel, I.; Eiermann, W.; Friese, K.; Gerber, B.; Harbeck, N.; Hilfrich, J.; Janni, W.; Jaenicke, F.; Jonat, W.; Kaufmann, M.; Kiechle, M.; Koehler, U.; Kreienberg, R.; Minckwitz, G. von; Moebus, V.; Nitz, U.; Schneeweiss, A.; Thomssen, C.; Wallwiener, D. **Zurich Consensus: German Expert Opinion on the St. Gallen Votes on 15 March 2009 (11th International Conference at St. Gallen: Primary Therapy of Early Breast Cancer)** Breast Care (Basel). 4 (2009) 109–116.

Biermann, J.; Holzscheiter, L.; Kotzsch, M.; Luther, T.; Kichle-Bahat, M.; Sweep, F.; Span, P.; Schmitt, M.; Magdolen, V. **Quantitative RT-PCR assays for the determination of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in primary tumor tissue of breast cancer patients: comparison to antigen quantification by ELISA** Int J Mol Med. (2008) 251–259.

Bloom, H. J. G.; Richardson, W. W. **Histological Grading and Prognosis in Breast Cancer** Br J Cancer. 11 (1957) 359–377.

Bowden, M. A.; Di Nezza-Cossens, L. A.; Jobling, T.; Salamonsen, L. A.; Nie, G. **Serine proteases HTRA1 and HTRA3 are down-regulated with increasing grades of human endometrial cancer** Gynecol Oncol. 103 (2006) 253–260.

Brooks, S. C.; Locke, E. R.; Soule, H. D. **Estrogen Receptor in a Human Cell Line (MCF-7) from Breast Carcinoma** J Biol Chem. 248 (1973) 6251–6253.

Buick, R. N.; Pullano, R.; Trent, J. M. **Comparative Properties of Five Human Ovarian Adenocarcinoma Cell Lines** Cancer Res. 45 (1985) 3668–3676.

Cailleau, R.; Olivé, M.; Cruciger, Q. V. J. **Long-Term Human Breast Carcinoma Cell Lines of Metastatic Origin: Preliminary Characterization** In Vitro. 14 (1978) 911–915.

Campioni, M.; Severino, A.; Manente, L.; Tuduca, I. L.; Toldo, S.; Caraglia, M.; Crispi, S.; Ehrmann, M.; He, X.; Maguire, J.; Falco, M. de; Luca, A. de; Shridhar, V.; Baldi, A. **The Serine Protease HtrA1 Specifically Interacts and Degrades the Tuberous Sclerosis Complex 2 Protein** Mol Cancer Res. 8 (2010) 1248–1260.

Carter, C. L.; Allen, C.; Henson, D. E. **Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases** Cancer. 63 (1989) 181–187.

Catalano, V.; Mellone, P.; d'Avino, A.; Shridhar, V.; Staccioli, M. P.; Graziano, F.; Giordani, P.; Rossi, D.; Baldelli, A. M.; Alessandroni, P.; Santini, D.; Lorenzon, L.; Testa, E.; D'Emidio, S.; Nictolis, M. de; Muretto, P.; Fedeli, S. L.; Baldi, A. **HtrA1, a potential predictor of response to cisplatin-based combination chemotherapy in gastric cancer** *Histopathology*. 58 (2011) 669–678.

Chamberland, A.; Wang, E.; Jones, A. R.; Collins-Racie, L. A.; LaVallie, E. R.; Huang, Y.; Liu, L.; Morris, E. A.; Flannery, C. R.; Yang, Z. **Identification of a Novel HtrA1-susceptible Cleavage Site in Human Aggrecan: Evidence For The Involvement Of Htra1 In Aggrecan Proteolysis In Vivo** *J Biol Chem*. 284 (2009) 27352–27359.

Chia, S.; Norris, B.; Speers, C.; Cheang, M.; Gilks, B.; Gown, A. M.; Huntsman, D.; Olivotto, I. A.; Nielsen, T. O.; Gelmon, K. **Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Overexpression As a Prognostic Factor in a Large Tissue Microarray Series of Node-Negative Breast Cancers** *J Clin Oncol*. 26 (2008) 5697–5704.

Chien, J.; Aletti, G.; Baldi, A.; Catalano, V.; Muretto, P.; Keeney, G.; Kalli, K.; Staub, J.; Ehrmann, M.; Cliby, W.; Lee, Y. K.; Bible, K.; Hartmann, L.; Kaufmann, S.; Shridhar, V. **Serine protease HtrA1 modulates chemotherapy-induced cytotoxicity** *J Clin Invest*. 116 (2006) 1994–2004.

Chien, J.; He, X.; Shridhar, V. **Identification of tubulins as substrates of serine protease HtrA1 by mixture-based oriented peptide library screening** *J Cell Biochem*. 107 (2009a) 253–263.

Chien, J.; Ota, T.; Aletti, G.; Shridhar, R.; Boccellino, M.; Quagliuolo, L.; Baldi, A.; Shridhar, V. **Serine Protease HtrA1 Associates with Microtubules and Inhibits Cell Migration** *Mol Cell Biol*. 29 (2009b) 4177–4187.

Chien, J.; Staub, J.; Hu, S.-I.; Erickson-Johnson, M. R.; Couch, F. J.; Smith, D. I.; Crowl, R. M.; Kaufmann, S. H.; Shridhar, V. **A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer** *Oncogene*. 23 (2004) 1636–1644.

Chik, F.; Machnes, Z.; Szyf, M. **Synergistic anti-breast cancer effect of a combined treatment with the methyl donor S-adenosyl methionine and the DNA methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine** *Carcinogenesis*. 35 (2014) 138–144.

Cho, B.; Lee, H.; Jeong, S.; Bang, Y.-J.; Lee, H. J.; Hwang, K. S.; Kim, H.-Y.; Lee, Y.-S.; Kang, G. H.; Jeoung, D.-I. **Promoter hypomethylation of a novel cancer/testis antigen gene CAGE is correlated with its aberrant expression and is seen in premalignant stage of gastric carcinoma** *Biochem Biophys Res Commun*. 307 (2003) 52–63.

Clausen, T.; Southan, C.; Ehrmann, M. **The HtrA Family of Proteases: Implications for Protein Composition and Cell Fate** *Mol Cell*. 10 (2002) 443–455.

Clawson, G. A.; Bui, V.; Xin, P.; Wang, N.; Pan, W. **Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins** *J Cell Biochem.* 105 (2008) 81–88.

Danø, K.; Behrendt, N.; Høyer-Hansen, G.; Johnsen, M.; Lund, L. R.; Ploug, M.; Rømer, J. **Plasminogen activation and cancer** *Thromb Haemost.* (2005) 676–681.

Donegan, W. **Prognostic factors: Stage and receptor status in breast cancer** *Cancer.* 70 (1992). 1755-64.

Dowsett, M.; Nielsen, T. O.; A'Hern, R.; Bartlett, J.; Coombes, R. C.; Cuzick, J.; Ellis, M.; Henry, N. L.; Hugh, J. C.; Lively, T.; McShane, L.; Paik, S.; Penault-Llorca, F.; Prudkin, L.; Regan, M.; Salter, J.; Sotiriou, C.; Smith, I. E.; Viale, G.; Zujewski, J. A.; Hayes, D. F. **Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group** *J Natl Cancer Inst.* 103 (2011). 1–9.

Eden, A.; Gaudet, F.; Waghmare, A.; Jaenisch, R. **Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation** *Science.* 300 (2003) 455.

Ellis, I. O.; Galea, M.; Broughton, N.; Locker, A.; Blamey, R. W.; Elston, C. W. **Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up** *Histopathology.* 20 (1992) 479–489.

Elston, C.; Ellis, I. **Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up** *Histopathology.* 19 (1991) 403–410.

Esposito, V.; Campioni, M.; Luca, A. De; Spugnini, E. P.; Baldi, F.; Cassandro, R.; Mancini, A.; Vincenzi, B.; Groeger, A.; Caputi, M.; Baldi, A. **Analysis of HtrA1 Serine Protease Expression in Human Lung Cancer** *Anticancer Res.* 26 (2006) 3455–3459.

Farthmann, J.; Holzscheiter, L.; Biermann, J.; Meye, A.; Luther, T.; Kotzsch, M.; Sweep, F.; Schmitt, M.; Span, P.; Magdolen, V. **Development of quantitative RT-PCR assays for wild-type urokinase receptor (uPAR-wt) and its splice variant uPAR-del5** *Radiology and Oncology* (2004) 111–119.

Feinberg, A. P.; Vogelstein, B. **Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers** *Biochem Biophys Res Commun.* 111 (1983) 47–54.

Fenaux, P.; Mufti, G. J.; Hellstrom-Lindberg, E.; Santini, V.; Finelli, C.; Giagounidis, A.; Schoch, R.; Gattermann, N.; Sanz, G.; List, A.; Gore, S. D.; Seymour, J. F.; Bennett, J. M.; Byrd, J.; Backstrom, J.; Zimmerman, L.; McKenzie, D.; Beach, C. L.; Silverman, L. R. **Efficacy of azacitidine compared with**

that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study *Lancet Oncol.* 10 (2009) 223–232.

Foulkes, W. D.; Smith, I. E.; Reis-Filho, J. S. **Triple-Negative Breast Cancer** *N Engl J Med.* 363 (2010) 1938–1948.

García, J. M.; Silva, J.; Peña, C.; Garcia, V.; Rodríguez, R.; Cruz, M. A.; Cantos, B.; Provencio, M.; España, P.; Bonilla, F. **Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer** *Genes Chromosomes Cancer.* 41 (2004) 117–124.

Gnant, M.; Harbeck, N.; Thomssen, C. **St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion Breast Care (Basel).** 6 (2011) 136–141.

Goldhirsch, A.; Wood, W. C.; Coates, A. S.; Gelber, R. D.; Thürlimann, B.; Senn, H.-J.; Panel members. **Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011** *Ann Oncol.* 22 (2011) 1736–1747.

Grau, S.; Baldi, A.; Bussani, R.; Tian, X.; Stefanescu, R.; Przybylcki, M.; Richards, P.; Jones, S. A.; Shridhar, V.; Clausen, T.; Ehrmann, M. **Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing** *Proc Natl Acad Sci USA.* 102 (2005) 6021–6026.

Grau, S.; Richards, P. J.; Kerr, B.; Hughes, C.; Caterson, B.; Williams, A. S.; Junker, U.; Jones, S. A.; Clausen, T.; Ehrmann, M. **The Role of Human HtrA1 in Arthritic Disease** *J Biol Chem.* 281 (2006) 6124–6129.

Györfy, B.; Lanczky, A.; Eklund, A.; Denkert, C.; Budczies, J.; Li, Q.; Szallasi, Z. **An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients** *Breast Cancer Res Treat.* 123 (2010) 725–731.

Hanahan, D.; Weinberg, R. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation** *Cell.* 144 (2011) 646–674.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. **The Hallmarks of Cancer** *Cell.* 100 (2000) 57–70.

Hara, K.; Shiga, A.; Fukutake, T.; Nozaki, H.; Miyashita, A.; Yokoseki, A.; Kawata, H.; Koyama, A.; Arima, K.; Takahashi, T.; Ikeda, M.; Shiota, H.; Tamura, M.; Shimoe, Y.; Hirayama, M.; Arisato, T.; Yanagawa, S.; Tanaka, A.; Nakano, I.; Ikeda, S.-i.; Yoshida, Y.; Yamamoto, T.; Ikeuchi, T.; Kuwano, R.; Nishizawa, M.; Tsuji, S.; Onodera, O. **Association of HTRA1 Mutations and Familial Ischemic Cerebral Small-Vessel Disease** *N Engl J Med.* 360 (2009) 1729–1739.

Harbeck, N.; Kates, R. E.; Look, M. P.; Meijer-van Gelder, M. E.; Klijn, J. G. M.; Krüger, A.; Kiechle, M.; Jänicke, F.; Schmitt, M.; Foekens, J. A. **Enhanced Benefit from Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients Classified High-Risk according to Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (n = 3424)** *Cancer Res.* 62 (2002) 4617–4622.

Harbeck, N.; Kates, R.; Schmitt, M.; Gauger, K.; Kiechle, M.; Jänicke, F.; Thomssen, C.; Look, M.; Foekens, J. **Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor Type 1 Predict Disease Outcome and Therapy Response in Primary Breast Cancer** *Clin Breast Cancer.* 5 (2004) 348–352.

Harbeck, N.; Schmitt, M.; Meisner, C.; Friedel, C.; Untch, M.; Schmidt, M.; Sweep, C. G. J.; Lisboa, B. W.; Lux, M. P.; Beck, T.; Hasmüller, S.; Kiechle, M.; Jänicke, F.; Thomssen, C. **Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients** *Eur J Cancer.* 49 (2013) 1825–1835.

He, X.; Ota, T.; Liu, P.; Su, C.; Chien, J.; Shridhar, V. **Downregulation of HtrA1 Promotes Resistance to Anoikis and Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells** *Cancer Res.* 70 (2010) 3109–3118.

Holzschelter, L.; Biermann, J.; Kotsch, M.; Prezas, P.; Farthmann, J.; Baretton, G.; Luther, T.; Tjan-Heijnen, V. C.; Talieri, M.; Schmitt, M.; Sweep, F.; Span, P.; Magdolen, V. **Quantitative Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of mRNA Encoding Full-Length Human Tissue Kallikrein 7: Prognostic Relevance of KLK7 mRNA Expression in Breast Cancer** *Clin Chem.* 52 (2006) 1070–1079.

Hothorn, T.; Lausen, B. **Maximal selected rank statistics in R** *R News.* 2 (2002) 3–5.

Hou, J.; Clemmons, D. R.; Smeekens, S. **Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5** *J Cell Biochem.* 94 (2005) 470–484.

Hudis, C. A.; Gianni, L. **Triple-Negative Breast Cancer: An Unmet Medical Need** *Oncologist.* 16 (2011) 1–11.

Hu, S.-I.; Carozza, M.; Klein, M.; Nantermet, P.; Luk, D.; Crowl, R. M. **Human HtrA, an Evolutionarily Conserved Serine Protease Identified as a Differentially Expressed Gene Product in Osteoarthritic Cartilage** *J Biol Chem.* 273 (1998) 34406–34412.

Kane, M. F.; Loda, M.; Gaida, G. M.; Lipman, J.; Mishra, R.; Goldman, H.; Jessup, J. M.; Kolodner, R. **Methylation of the hMLH1 Promoter Correlates with Lack of Expression of hMLH1 in Sporadic**

Colon Tumors and Mismatch Repair-defective Human Tumor Cell Lines *Cancer Res.* 57 (1997) 808–811.

Kantarjian, H.; Issa, J.-P. J.; Rosenfeld, C. S.; Bennett, J. M.; Albitar, M.; DiPersio, J.; Klimek, V.; Slack, J.; Castro, C. de; Ravandi, F.; Helmer, R.; Shen, L.; Nimer, S. D.; Leavitt, R.; Raza, A.; Saba, H. **Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes** *Cancer.* 106 (2006) 1794–1803.

Kato, M. **A Secreted Tumor-Suppressor, mac25, with Activin-Binding Activity** *Mol Med.* 6 (2000) 126–135.

Khan, S.; Kumagai, T.; Vora, J.; Bose, N.; Sehgal, I.; Koeffler, P. H.; Bose, S. **PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers** *Int J Cancer.* 112 (2004) 407–410.

Harbeck, N.; Heywang-Körbrunner, S. **Veränderungen und Tumoren der Mamma** In: *Gynäkologie und Geburtshilfe*; Kiechle, M.(Hrsg.) Elsevier Urban & Fischer. München 2007 1. Auflage. 550-576

Knudson, A. G. **Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma** *Proc Natl Acad Sci USA.* 68 (1971) 820–823.

Knudson, A. G. **Chasing The Cancer Demon** *Annu Rev Genet.* 34 (2000) 1–19.

Kok, J. B. de; Roelofs, R. W.; Giesendorf, B. A.; Pennings, J. L.; Waas, E. T.; Feuth, T.; Swinkels, D. W.; Span, P. N. **Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes** *Lab Invest.* 85 (2004) 154–159.

Kollias, J.; Elston, C. W.; Ellis, I.; Robertson, J.; Blamey, R. W. **Early-onset breast cancer - histopathological and prognostic considerations** *Br J Cancer.* 75 (1997) 1318–1323.

Kreienberg, R.; Kopp, I.; Albert, U.; Bartsch, H.; Beckmann, M.; Berg, D.; Bick, U.; Bois, A.; Budach, W.; Dunst, J.; Engel, J.; Ernst, B.; Geraedts, M.; Henschler, U.; Hölzel, D.; Jackisch, C.; König, K.; Kreipe, H.; Kühn, T.; Lebeau, A.; Leinung, S.; Link, H.; Lück, H.-J.; Madjar, H.; Maiwald, A.; Maiwald, G.; Marschner, N.; Marx, M.; Minckwitz, G.; Naß-Griegoleit, I.; Possinger, K.; Reiter, A.; Sauerbrei, W.; Schlake, W.; Schmutzler, R.; Schreer, I.; Schulte, H.; Schulz, K.-D.; Souchon, R.; Thomssen, C.; Untch, M.; Wagner, U.; Weis, J.; Zemmler, T. **Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.** W. Zuckschwerdt Verlag GmbH. Gemering 2008 1. Aktualisierung.

Krojer, T.; Sawa, J.; Schäfer, E.; Saibil, H. R.; Ehrmann, M.; Clausen, T. **Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP** *Nature.* 453 (2008) 885–890.

Launay, S.; Maubert, E.; Lebeurrier, N.; Tennstaedt, A.; Campioni, M.; Docagne, F.; Gabriel, C.; Dauphinot, L.; Potier, M. C.; Ehrmann, M.; Baldi, A.; Vivien, D. **HtrA1-dependent proteolysis of TGF- β controls both neuronal maturation and developmental survival** *Cell Death Differ.* 15 (2008) 1408–1416.

Lee, L. G.; Connell, C. R.; Bloch, W. **Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes** *Nucleic Acids Res.* 21 (1993) 3761–3766.

Lee, P. D.; Sladek, R.; Greenwood, C. M.; Hudson, T. J. **Control Genes and Variability: Absence of Ubiquitous Reference Transcripts in Diverse Mammalian Expression Studies** *Genome Res.* 12 (2002) 292–297.

Levenson, A. S.; Jordan, V. C. **MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line** *Cancer Res.* 57 (1997) 3071–3078.

Li, E.; Bestor, T. H.; Jaenisch, R. **Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality** *Cell.* 69 (1992) 915–926.

Li, L.-C.; Dahiya, R. **MethPrimer: designing primers for methylation PCRs** *Bioinformatics.* 18 (2002) 1427–1431.

Lin, S. Y.; Morrison; Phillips, D. J.; Kretser, D. M. de. **Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin** *Reproduction.* 126 (2003) 133–148.

Lister, R.; Pelizzola, M.; Downen, R. H.; Hawkins, R. D.; Hon, G.; Tonti-Filippini, J.; Nery, J. R.; Lee, L.; Ye, Z.; Ngo, Q.-M.; Edsall, L.; Antosiewicz-Bourget, J.; Stewart, R.; Ruotti, V.; Millar, A. H.; Thomson, J. A.; Ren, B.; Ecker, J. R. **Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences** *Nature.* 462 (2009) 315–322.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method** *Methods.* 25 (2001) 402–408.

Lombardo, Y.; Faronato, M.; Filipovic, A.; Virchillo, V.; Magnani, L.; Coombes, R. **Nicastrin and Notch4 drive endocrine therapy resistance and epithelial to mesenchymal transition in MCF7 breast cancer cells** *Breast Cancer Res.* 16 (2014) R62.

Lübbert, M.; Suci, S.; Baila, L.; Rüter, B. H.; Platzbecker, U.; Giagounidis, A.; Selleslag, D.; Labar, B.; Germing, U.; Salih, H. R.; Beeldens, F.; Muus, P.; Pflüger, K.-H.; Coens, C.; Hagemeyer, A.; Eckart Schaefer, H.; Ganser, A.; Aul, C.; Witte, T. de; Wijermans, P. W. **Low-Dose Decitabine Versus Best Supportive Care in Elderly Patients With Intermediate- or High-Risk Myelodysplastic Syndrome (MDS) Ineligible for Intensive Chemotherapy: Final Results of the Randomized Phase III Study**

of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS Study Group *J Clin Oncol.* 29 (2011) 1987–1996.

Luca, A. de, Falco, M. de; Fedele, V.; Cobellis, L.; Mastrogiacomo, A.; Laforgia, V.; Tuduce, I.; Campioni, M.; Giraldi, D.; Paggi, M.; Baldi, A. **The Serine Protease HtrA1 Is Upregulated in the Human Placenta During Pregnancy** *J Histochem Cytochem.* 52 (2004) 885–892.

Luther, T.; Kotsch, M.; Meye, A.; Fuessel, S.; Olbricht, N.; Albrecht, S.; Ockert, D.; Muelenweg, B.; Friedrich, K.; Grosser, M.; Schmitt, M.; Baretton, G.; Magdolen, V. **Identification of a novel urokinase receptor splice variant and its prognostic relevance in breast cancer** *Thromb Haemost.* 89 (2003) 705–717.

MacDonald T. J.; Pollack, I. F.; Okada, H.; Bhattacharya, S.; Lyons-Weiler, J. **Progression-associated genes in astrocytoma identified by novel microarray gene expression data reanalysis** *Methods Mol Biol.* 377 (2007) 203–222.

Marchini, S.; Fruscio, R.; Clivio, L.; Beltrame, L.; Porcu, L.; Nerini, I. F.; Cavalieri, D.; Chiorino, G.; Cattoretti, G.; Mangioni, C.; Milani, R.; Torri, V.; Romualdi, C.; Zambelli, A.; Romano, M.; Signorelli, M.; Di Giandomenico, S.; D'Incalci, M. **Resistance to platinum-based chemotherapy is associated with epithelial to mesenchymal transition in epithelial ovarian cancer** *Eur J Cancer.* 49 (2012) 520–530.

Mauney, J.; Olsen, B. R.; Volloch, V. **Matrix remodeling as stem cell recruitment event: A novel in vitro model for homing of human bone marrow stromal cells to the site of injury shows crucial role of extracellular collagen matrix** *Matrix Biol.* 29 (2010) 657–663.

Meindl, A.; Ditsch, N.; Kast, K.; Rhiem, K.; Schmutzler, R. K. **Hereditary Breast and Ovarian Cancer: New Genes, New Treatments, New Concepts** *Dtsch Arztebl Int.* 108 (2011) 323–330.

Miki, Y.; Swensen, J.; Shattuck-Eidens, D.; Futreal, P. A.; Harshman, K.; Tavtigian, S.; Liu, Q.; Cochran, C.; Bennett, L. M.; Ding, W.; et, a. **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1** *Science.* 266 (1994) 66–71.

Mullany, S. A.; Moslemi-Kebria, M.; Rattan, R.; Khurana, A.; Clayton, A.; Ota, T.; Mariani, A.; Podratz, K. C.; Chien, J.; Shridhar, V. **Expression and Functional Significance of HtrA1 Loss in Endometrial Cancer** *Clin Cancer Res.* 17 (2011a) 427–436.

Murwantoko; Yano, M.; Ueta, Y.; Murasaki, A.; Kanda, H.; Oka, C.; Kawaichi, M. **Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease** *Biochem J.* 381 (2004) 895–904.

Nakayama, M.; Wada, M.; Harada, T.; Nagayama, J.; Kusaba, H.; Ohshima, K.; Kozuru, M.; Komatsu, H.; Ueda, R.; Kuwano, M. **Hypomethylation Status of CpG Sites at the Promoter Region and Overexpression of the Human MDR1 Gene in Acute Myeloid Leukemias** *Blood*. 92 (1998) 4296–4307.

Narkiewicz, J.; Klasa-Mazurkiewicz, D.; Zurawa-Janicka, D.; Skorko-Glonek, J.; Emerich, J.; Lipinska, B. **Changes in mRNA and protein levels of human HtrA1, HtrA2 and HtrA3 in ovarian cancer** *Clin Biochem*. 41 (2008) 561–569.

Narkiewicz, J.; Lipinska-Szumczyk, S.; Zurawa-Janicka, D.; Skorko-Glonek, J.; Emerich, J.; Lipinska, B. **Expression of human HtrA1, HtrA2, HtrA3 and TGF- β 1 genes in primary endometrial cancer** *Oncol Rep*. 21 (2009) 1529–1537.

Neuhausen, S. L.; Brummel, S.; Chun Ding, Y.; Steele, L.; Nathanson, K. L.; Domchek, S.; Rebbeck, T. R.; Singer, C. F.; Pfeiler, G.; Lynch, H. T.; Garber, J. E.; Couch, F.; Weitzel, J. N.; Godwin, A.; Narod, S. A.; Ganz Patricia A.; Daly, M. B.; Isaacs, C.; Olopade, O. I.; Tomlinson, G. E.; Rubinstein, W. S.; Tung, N.; Blum, J. L.; Gillen, D. L. **Genetic Variation in IGF2, HTRA1, and MMP3 and Breast Cancer Risk Among BRCA1 and BRCA2 Carriers** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 20 (2011) 1690–1702.

Nie, G.; Hale, K.; Li, Y.; Manuelpillai, U.; Wallace, E. M.; Salamonsen, L. A. **Distinct expression and localization of serine protease HtrA1 in human endometrium and first-trimester placenta** *Dev Dyn*. 235 (2006) 3448-3455.

Oka, C. **HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf family proteins** *Development*. 131 (2004) 1041–1053.

Paik, S.; Shak, S.; Tang, G.; Kim, C.; Baker, J.; Cronin, M.; Baehner, F. L.; Walker, M. G.; Watson, D.; Park, T.; Hiller, W.; Fisher, E. R.; Wickerham, D. L.; Bryant, J.; Wolmark, N. **A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer** *N Engl J Med*. 351 (2004) 2817–2826.

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.; Botstein, D. **Molecular portraits of human breast tumours** *Nature*. 406 (2000) 747–752.

Rauch, T. A.; Wu, X.; Zhong, X.; Riggs, A. D.; Pfeifer, G. P. **A human B cell methylome at 100-base pair resolution** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (2009) 671–678.

Regan, M. M.; Neven, P.; Giobbie-Hurder, A.; Goldhirsch, A.; Ejlertsen, B.; Mauriac, L.; Forbes, J. F.; Smith, I.; Láng, I.; Wardley, A.; Rabaglio, M.; Price, K. N.; Gelber, R. D.; Coates, A. S.; Thürlimann, B. **Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up** *Lancet Oncol.* 12 (2011) 1101–1108.

Ribeiro-Silva, A.; Zhang, H.; Jeffrey, S. **RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies** *BMC Mol Biol.* 8 (2007) 118.

Krebs in Deutschland 2009/2010 Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin 2013. 16-17 und 68-71

Rosen, P. P.; Groshen, S.; Kinne, D. W.; Norton, L. **Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up** *J Clin Oncol.* 11 (1993) 2090–2100.

Saiki, R.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.; Horn, G.; Erlich, H.; Arnheim, N. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia** *Science.* 230 (1985) 1350–1354.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, R. **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors** *Proc Natl Acad Sci USA.* 74 (1977) 5463–5467.

Schmittgen, T. D.; Livak, K. J. **Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method** *Nat Protoc.* 3 (2008) 1101–1108.

Schmitt, M.; Mengele, K.; Gkazepis, A.; Napieralski, R.; MAGDOLEN, V.; Reuning, U.; Harbeck, N. **Assessment of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in Breast Cancer Tissue: Historical Aspects and Future Prospects** *Breast Care (Basel).* 3 (2008) 3–10.

Schrodi, S.; Engel, J.; Heywang-Köbrunner, S.H.; Schubert-Fritschle, G. **Epidemiologie** In: **Mammakarzinome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.** Bauerfeind (Bandherausgeber), Tumorzentrum München (Hrsg.) Zuckschwerdt Verlag. Gemering (2011) 13. Auflage 1-11.

Sheridan, C.; Kishimoto, H.; Fuchs, R.; Mehrotra, S.; Bhat-Nakshatri, P.; Turner, C.; Goulet, R.; Badve, S.; Nakshatri, H. **CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis** *Breast Cancer Res.* 8 (2006) R59.

Shiga, A.; Nozaki, H.; Yokoseki, A.; Nihonmatsu, M.; Kawata, H.; Kato, T.; Koyama, A.; Arima, K.; Ikeda, M.; Katada, S.; Toyoshima, Y.; Takahashi, H.; Tanaka, A.; Nakano, I.; Ikeuchi, T.; Nishizawa, M.; Onodera, O. **Cerebral small-vessel disease protein HTRA1 controls the amount of TGF- β 1 via cleavage of proTGF- β 1** Hum Mol Genet. 20 (2011) 1800–1810.

Slamon, D. J.; Clark, G. M.; Wong, S. G.; Levin, W. J.; Ullrich, A.; McGuire, W. L. **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene** Science. 235 (1987) 177–182.

Sørlie, 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.; Lønning, P. E.; Børresen-Dale, A.-L. **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications** Proc Natl Acad Sci U S A. 98 (2001) 10869–10874.

Span, P. N.; Tjan-Heijnen, V. C. G.; Manders, P.; Beex, L. V. A. M.; Sweep, C. G. J. **Cyclin-E is a strong predictor of endocrine therapy failure in human breast cancer** Oncogene. 22 (2003) 4898–4904.

Spiess, C.; Beil, A.; Ehrmann, M. **A Temperature-Dependent Switch from Chaperone to Protease in a Widely Conserved Heat Shock Protein** Cell. 97 (1999) 339–347.

Spugnini, E. P.; Cardillo, I.; Verdina, A.; Crispi, S.; Saviozzi, S.; Calogero, R.; Nebbioso, A.; Altucci, L.; Cortese, G.; Galati, R.; Chien, J.; Shridhar, V.; Vincenzi, B.; Citro, G.; Cognetti, F.; Sacchi, A.; Baldi, A. **Piroxicam and Cisplatin in a Mouse Model of Peritoneal Mesothelioma** Clin Cancer Res. 12 (2006) 6133–6143.

Statistisches Bundesamt (Destatis). **Todesursachen in Deutschland** - Fachserie 12 Reihe 4 - 2011. Seite 1

https://www.destatis.de/DE/Publikationen/Thematisch/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen2120400117004.pdf?__blob=publicationFile Stand: 15.07.2013.

Suter, R.; Marcum, J. A. **The molecular genetics of breast cancer and targeted therapy** Biologics. 1 (2007) 241–258.

Tennstaedt, A.; Pöpsel, S.; Truebestein, L.; Hauske, P.; Brockmann, A.; Schmidt, N.; Irle, I.; Sacca, B.; Niemeyer, C. M.; Brandt, R.; Ksiezak-Reding, H.; Tirniceriu, A. L.; Egensperger, R.; Baldi, A.; Dehmelt, L.; Kaiser, M.; Huber, R.; Clausen, T.; Ehrmann, M. **Human High Temperature Requirement Serine Protease A1 (HTRA1) Degrades Tau Protein Aggregates** J Biol Chem. 287 (2012) 20931–20941.

Thermo Scientific. T042-**Technical Bulletin NanoDrop-Spectrophotometers: Nucleic-Acid-Purity-Ratios**. <http://www.phenogenomics.ca/transgenics/docs/NanoDrop%20Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
Stand: 28.10.2011.

Turunen, M.; Vepsäläinen, S.; Mäkinen, P.; Helisalmi, S.; Haapasalo, A.; Soininen, H.; Hiltunen, M. **No association between high temperature requirement 1 (HTRA1) gene polymorphisms and Alzheimer's disease** *Neurobiol Aging*. 32 (2011) 547.e7.

Vandesompele, J.; Preter, K. de; Pattyn, F.; Poppe, B.; van Roy, N.; Paepe, A. de; Speleman, F. **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes** *Genome Biol*. 3 (2002) research0034.1 - research0034.11.

Venkitaraman, A. R. **Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2** *Cell*. 108 (2002) 171–182.

Vierkotten, S.; Muether, P. S.; Fauser, S. **Overexpression of HTRA1 Leads to Ultrastructural Changes in the Elastic Layer of Bruch's Membrane via Cleavage of Extracellular Matrix Components** *PLoS One*. 6 (2011) e22959

Vitolo, M. I.; Weiss, M. B.; Szmanski, M.; Tahir, K.; Waldman, T.; Park, B. H.; Martin, S. S.; Weber, D. J.; Bachman, K. E. **Deletion of PTEN Promotes Tumorigenic Signaling, Resistance to Anoikis, and Altered Response to Chemotherapeutic Agents in Human Mammary Epithelial Cells** *Cancer Res*. 69 (2009) 8275–8283.

Wang, N.; Eckert, K. A.; Zomorodi, A. R.; Xin, P.; Pan, W.; Shearer, D. A.; Weisz, J.; Maranus, C. D.; Clawson, G. A. **Down-Regulation of HtrA1 Activates the Epithelial-Mesenchymal Transition and ATM DNA Damage Response Pathways** *PLoS One*. 7 (2012) e39446.

Weaver, J.; Susiarjo, M.; Bartolomei, M. **Imprinting and epigenetic changes in the early embryo** *Mamm Genome*. 20 (2009) 532–543.

Wong, M.; Medrano, J. **Real-time PCR for mRNA quantitation** *Biotechniques*. 39 (2005) 75–85.

Wooster, R.; Bignell, G.; Lancaster, J.; Swift, S.; Seal, S.; Mangion, J.; Collins, N.; Gregory, S.; Gumbs, C.; Micklem, G.; Barfoot, R.; Hamoudi, R.; Patel, S.; Rices, C.; Biggs, P.; Hashim, Y.; Smith, A.; Connor, F.; Arason, A.; Gudmundsson, J.; Ficenec, D.; Kelsell, D.; Ford, T. D.; Timothy Bishop, D.; Spurr, N. K.; Ponder, B. A. J.; Eeles, R.; Peto, J.; Devilee, P.; Cornelisse, C.; Lynch, H.; Narod, S.; Lenoir, G.; Egilsson, V.; Bjork Barkadottir, R.; Easton, D. F.; Bentley, D. R.; Futreal, P. A.; Ashworth, A.; Stratton, M. R. **Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2** *Nature*. 378 (1995) 789–792.

Yamamura, T.; Nishimura, M.; Shirabe, T.; Fujita, M. **Subcortical vascular encephalopathy in a normotensive, young adult with premature baldness and spondylitis deformans: A clinicopathological study and review of the literature** *J Neurol Sci.* 78 (1987) 175–187.

Yanagawa, S.; Ito, N.; Arima, K.; Ikeda, S.-i. **Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy** *Neurology.* 58 (2002) 817–820.

Yang, Z.; Tong, Z.; Chen, Y.; Zeng, J.; Lu, F.; Sun, X.; Zhao, C.; Wang, K.; Davey, L.; Chen, H.; London, N.; Muramatsu, D.; Salasar, F.; Carmona, R.; Kasuga, D.; Wang, X.; Bedell, M.; Dixie, M.; Zhao, P.; Yang, R.; Gibbs, D.; Liu, X.; Li, Y.; Li, C.; Li, Y.; Campochiaro, B.; Constantine, R.; Zack, D. J.; Campochiaro, P.; Fu, Y.; Li, D. Y.; Katsanis, N.; Zhang, K. **Genetic and Functional Dissection of HTRA1 and LOC387715 in Age-Related Macular Degeneration** *PLoS Genet.* 6 (2010) e1000836.

Yu T.; Jing L.; Yuan Z.; Jing Z.; Hengyu Z.; Meng M. **LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis** *Mol Vis.* 16 (2010) 1958–1981.

Yu, Y.; Shao, W.; Hu, Y.; Zhang, J.; Song, H.; Zhu, Z.-h. **HtrA1 expression associated with the occurrence and development of esophageal cancer** *World J Surg Oncol.* 10 (2012) 179.

Zhu, F.; Jin, L.; Luo, T.; Luo, G.; Tan, Y.; Qin, X. **Serine protease HtrA1 expression in human hepatocellular carcinoma** *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 9 (2010) 508–512.

Zumbrunn, J.; Trueb, B. **Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins** *FEBS Lett.* 398 (1996) 187–192.

Zupkovitz, G.; Tischler, J.; Posch, M.; Sadzak, I.; Ramsauer, K.; Egger, G.; Grausenburger, R.; Schweifer, N.; Chiocca, S.; Decker, T.; Seiser, C. **Negative and Positive Regulation of Gene Expression by Mouse Histone Deacetylase 1** *Mol Cell Biol.* 26 (2006) 7913–7928.

Zurawa-Janicka, D.; Kobiela, J.; Stefaniak, T.; Wozniak, A.; Narkiewicz, J.; Wozniak, M.; Limon, J.; Lipinska, B. **Changes in expression of serine proteases HtrA1 and HtrA2 during estrogen-induced oxidative stress and nephrocarcinogenesis in male Syrian hamster** *Acta Biochim Pol.* 55 (2008) 9–19.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der empfohlenen adjuvanten Therapie in Abhängigkeit von Subtyp nach Konsensus St. Gallen 2011 [Goldhirsch et al. 2011].....	7
Tabelle 2 DNA aus Nijmegen: Konzentration und Quotienten mit Nanodrop 3300(PeqLab, Erlangen) in unserem Labor bestimmt.....	27
Tabelle 3 Pipettierschema Reverse Transkription Ovarialkarzinom.....	29
Tabelle 4 Verwendete Taqman® Gene Expression Assays.....	31
Tabelle 5 Pipettierschema Real-Time-PCR.....	31
Tabelle 6 PCR-Programm Taqman®.....	32
Tabelle 7 Primer für die Sequenzierung	36
Tabelle 8 Pipettierschema PCR vor der Sequenzierung	36
Tabelle 9 PCR-Protokoll für die Bereiche "UP" und "mRNA-START"	37
Tabelle 10 PCR-Protokoll für den Bereich "DOWN".....	37
Tabelle 11 Pipettierschema Ligationsansatz	39
Tabelle 12 Pipettierschema der PCR nach Klonierung	40
Tabelle 13 Protokoll der PCR nach Klonierung	41
Tabelle 14 PCR-Effizienzen: Für je zwei Mamma-und Ovarkarziomproben	45
Tabelle 15 Kalibratorproben: Ct-Werte in verschiedenen Taqman-Versuchen und ihre Differenz	49

Tabelle 16 Korrelation von HTRA1 mit PAI-1, uPA-Rezeptor und uPA; mRNA-Expressionswerte, jeweils mit G6PDH normalisiert	50
Tabelle 17 HTRA1 und klinisch-pathologische Merkmale im Nijmegen-Kollektiv	52
Tabelle 18 Univariate Cox-Regression: Charakterisierung des Gesamtkollektivs Nijmegen; kombiniertes krankheitsfreies Überleben	55
Tabelle 19 Univariate Cox-Regression: Charakterisierung der Subgruppe der Nodal-positiven Patientinnen des Kollektivs Nijmegen, kombiniertes krankheitsfreies Überleben.....	60
Tabelle 20 Multivariate Cox-Regression: kombiniertes krankheitsfreies Überleben, nodal-positive Patientinnen.....	61
Tabelle 21 Übersicht über HTRA1 als prädiktiven Marker in den verschiedenen Subgruppen aus der GEO-Datenbank	71
Tabelle 22 Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung.....	77

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen bei Frauen in Deutschland 2010.....	3
Abbildung 2 Todesursachen in Deutschland.....	4
Abbildung 3 Aufbau der Mitglieder der HTRA1-Familie bei unterschiedlichen Spezies.....	13
Abbildung 4 HTRA1 als Tumorsuppressor: mögliche Wirkungsweisen	17
Abbildung 5 Übersicht Expressionsanalyse	28
Abbildung 6 Prinzip der Sonden-Hydrolyse und Freisetzung des Reporter-Moleküls	30
Abbildung 7 Phasen der PCR und Ct	33
Abbildung 8 Schematische Darstellung der untersuchten DNA-Abschnitte	35
Abbildung 9 Standardkurve für Ovarialkarzinom-Probe 29984	44
Abbildung 10 Standardkurve für Mammakarzinom-Probe 131	45
Abbildung 11 HTRA1 Expression der Ovarialkarzinomproben relativ zum Borderline-Tumor.....	46
Abbildung 12 Intra-Assay-Variabilität des Taqman-Systems	47
Abbildung 13 Vergleich der HPRT-Messwerte aus dem Taqman- und dem Lightcycler-System	48
Abbildung 14 Relative HTRA1-Expression und Östrogenrezeptor-Konzentration	51
Abbildung 15 LOG-RANK-Test im Gesamtkollektiv für den besten Cut-off-Wert zum Gesamtüberleben	53
Abbildung 16 Kaplan-Meier-Analyse Überleben im Gesamtkollektiv nach relativer HTRA1-Expression	56
Abbildung 17 Kaplan-Meier-Analyse: Rezidiv-freies Überleben im Gesamtkollektiv nach relativer HTRA1-Expression.....	57

Abbildung 18 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben im Gesamtkollektiv nach relativer HTRA1-Expression	58
Abbildung 19 Kaplan-Meier-Analyse: Überleben der nodal-positiven Patientinnen nach HTRA1-Expression	62
Abbildung 20 Kaplan-Meier-Analyse: Rezidiv-freies Überleben der nodal-positiven Patientinnen nach HTRA1-Expression	63
Abbildung 21 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben der nodal-positiven Patientinnen	64
Abbildung 22 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben der Nodal-positiven Patientinnen ohne Chemotherapie nach HTRA1-Expression	65
Abbildung 23 Kaplan-Meier-Analyse: Kombiniertes krankheitsfreies Überleben der Nodal-positiven Patientinnen mit Chemotherapie nach HTRA1-Expression	66
Abbildung 24 Kaplan-Meier-Analyse der Rezidiv-Rate in den Gruppen der Mammakarzinom-Patientinnen mit hoher(rot) und niedriger(schwarz) HTRA1-Expression aus der GEO-Datenbank	68
Abbildung 25 Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens in den Gruppen von Mammakarzinom-Patientinnen mit hoher(rot) und niedriger(schwarz) HTRA1-Expression aus der GEO-Datenbank	69
Abbildung 26 HTRA1-Expression als prognostischer Faktor: Zeit bis zur Fernmetastasierung in der Untergruppe von Patientinnen, die nach Operation keine adjuvante Therapie erhalten hatten. Analyse von Fällen aus der GEO-Datenbank.	72
Abbildung 27 HTRA1-Expression der Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB231(MDA) und MCF7 sowie der Ovariakarzinom-Zelllinien HEY-WT und HEY-Cisplatin-resistent(Hey res)	73
Abbildung 28 G-/C-Gehalt der DNA um das HTRA1-Startcodon	75
Abbildung 29 Bisulfit-Sequenzierung, Beispiel aus Abschnitt mRNAstart	76
Abbildung 30 Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung, Beispiel aus dem Abschnitt UP: MCF7 und MDA MB 231	78
Abbildung 31 Sequenzierung nach Bisulfit-Behandlung, Tumor 8, Beispiel aus Abschnitt UP	78
Abbildung 32 CpG-Methylierung des Tumor 8, Abschnitts UP	79

Abbildung 33 CpG-Methylierung des Tumor 9, Abschnitt UP 80

Abbildung 34 Vergleich der Ergebnisse der Bisulfid-Sequenzierung ohne vorheriges Klonieren und dem Prozent der Klone, bei dem das entsprechende Cytosin Methylierung zeigte; Beispiel Tumor 9..
..... 80

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Anna Veronika Lehner
geboren am 27.04.1984 in Starnberg, ledig

Beruf und Studium

Seit 01.11.2014	Assistenzärztin an der Frauenklinik Josefinum Augsburg Chefarzt Dr. Steierl
01.12.2011-30.09.2014	Assistenzärztin an der Universitätsfrauenklinik Göttingen Chefarzt Prof. Dr. med. Emons
14.06.2011	Approbation als Ärztin
10.2004-06.2011	Studium Humanmedizin an der TU München
19.05.2011	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02.2010-01.2011	Praktisches Jahr 3. Terial: Gynäkologie an der Frauenklinik TU München, Klinikum Rechts der Isar, Chefarztin Prof. Dr. med. Kiechle 2. Terial: Innere Medizin am Rotkreuzklinikum München, Lehrkrankenhaus der TU München, I. Med. Abteilung, Chefarzt Prof. Dr. med. von Arnim 1. Terial: Chirurgie am Spital Schwyz - Lehrkrankenhaus der Universität Zürich Chefärzte Dr. med. Schlüchter, Dr. med. Lichtenhahn
	Famulaturen
09.2009	Pädiatrie - Hospital Victor Lazarte Echeagaray in Trujillo, Peru
09.2008	Kardiologie - Gemeinschaftspraxis Kardiologie im Tal, München
08.2007	Gynäkologie und Geburtshilfe - Frauenklinik der TU München
03.2007	Innere Medizin - Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München
09.2007-06.2008	Auslandsjahr Universidad del País Vasco, San Sebastián, Spanien
11.09.2006	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Schulbildung

09.2001-06.2004	Carl-Spitzweg Gymnasium Germering
02.2002-07.2002	Auslandaufenthalt USA - Coral Gabels Senior High School in Miami Abschluss: High School Diploma
09.1994-08.2001	Christoph-Probst-Gymnasium Gilching

Dissertation

Seit 10.2008	Thema: Die Serin-Protease HtrA1 im Mammakarzinom - Expressionanalyse und Epigenetik Frauenklinik TU München (Prof. Dr. med. M. Kiechle/Dr. rer. nat. E. Groß)
--------------	---

Publikation

Lehner, A.; Magdolen, V.; Schuster, T.; Kotzsch, M.; Kiechle, M.; Meindl, A.; Sweep, F.; Span, P.; Gross, E. **Downregulation of Serine Protease HTRA1 Is Associated with Poor Survival in Breast Cancer**. PLoS ONE 8 (2013) e60359.

Ausgewählte Fortbildungen und weitere Tätigkeiten

12.2014	Kolposkopiediplom
03.-12.2013	Ultraschall in der Gynäkologie und Geburtshilfe Grund-, Aufbau- und Abschlusskurs (Charité Berlin/Universität Tübingen)
05/12.09.2012	ICH/GCP-Fortbildung (Universitätsmedizin Göttingen)
03.2012-09.2014	Prüfärztin AGO-Ovar17-Studie
10.2010	Interdisziplinärer Ultraschall-Grundkurs (LMU/Rotkreuzklinikum München)
01.2009-12.2009	Tutorin im Sonographiekurs für Studenten Prof. Dr. med. Lersch/Dr. med. Stock, II. Med., Rechts der Isar

Kenntnisse

Englisch und Spanisch	sehr gute Kenntnisse
Französisch	Basiskenntnisse
EDV	Office, SPSS, Citavi, IMS (Programm zur Klausur-Erstellung)

Danksagung

Prof. Dr. med. Marion Kiechle danke ich sehr für die Überlassung des Themas der Arbeit und für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit mit Mitteln der Frauenklinik der TU München. Mein Dank gilt außerdem allen voran Dr. rer. nat. Eva Groß für die vielen Ideen und Diskussionen, die Einführung in die Labortätigkeit und die geduldige, immerzu warmherzige Unterstützung. Prof. Dr. rer. nat. Alfons Meindl danke ich sehr für die große Unterstützung, die ich während meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung erfahren habe.

Prof. Dr. rer. nat. Viktor Magdolen danke sehr ich für die Bereitstellung der Daten und cDNAs der Tumorproben aus Nijmegen und Dresden sowie für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen. Genauso möchte ich mich auch sehr bei Prof. Paul Span und Prof. Fred C.G.J. Sweep von der Radboud University Nijmegen für die Unterstützung und die zusätzliche Tumor-DNA bedanken.

Für große Unterstützung im Labor danke ich Marco, Tanja, Julie, Heide und Rudi Napiralski. Ein herzlicher Dank für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung geht an Dr. Tibor Schuster vom IMSE der TU München.

Meinen Mitdoktorandinnen Vroni, Christina und Sandra möchte ich für die gute Stimmung und Zusammenarbeit im Labor danken.

Nicht zuletzt danke ich von Herzen meinen Eltern für die riesige Unterstützung, die mein Studium und diese Arbeit ermöglicht hat. Auch bei meinen Mädels möchte ich mich sehr für die stetige Ermunterung bedanken.