

Charakterisierung und Identifizierung epigenetischer Brustkrebsbiomarker

vorgelegt von
Diplom-Ingenieur
Dimo Dietrich
aus Berlin

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. U. Stahl
Berichter: Prof. Dr. H. Görisch
Berichter: Prof. Dr. R. Lauster

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05. Februar 2008

Berlin 2008

D 83

Danksagung

Wie schon in der Danksagung meiner Studienarbeit und Diplomarbeit möchte ich mich herzlich bei Professor Görisch bedanken, der sich dazu bereit erklärt hat, auch meine Doktorarbeit von universitärer Seite aus zu betreuen. Ich verspreche ihm, dass ich ihn in Zukunft in Frieden lasse. Danke!

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer bei der Epigenomics AG Dr. Matthias Schuster, der stets engagiert und mit wertvollen Ratschlägen diese Arbeit betreut hat. Daneben möchte ich auch Dr. Ralf Lesche dafür danken, dass ich in seinen Projekten Zugang zu diesen sehr interessanten biologischen Fragestellungen bekommen habe. Beiden möchte ich sehr für die hilfreichen Tipps technologischer und biologischer Natur danken. Besonders dankbar bin ich für ihr Vertrauen, dass mir die Freiheiten brachte, meine eigenen Ideen zu verwirklichen.

Ich danke dem ehemaligen ProcLog Team für die Durchführung der DNA-Chip und der Anthrazyklin-Real-Time PCR Studie. Und natürlich auch den Statistikern Oliver Hartmann und Gunther Weiss für die statistische Auswertung dieser Studien. Beiden möchte ich auch dafür danken, dass sie sehr tapfer und geduldig, teilweise sogar auch erfolgreich versucht haben, mir die Geheimnisse der statistischen Analyse von Überlebensdaten näher zu bringen. Für die Bereitstellung der Expressionsdaten der Zelllinien möchte ich Dr. Martens (Department of Medical Oncology, Erasmus MC, Rotterdam) danken

Ich danke PD Dr. Kristiansen (Charité Berlin) für die Bereitstellung der klinischen Proben für die Mikrodisektionsstudie. Ich danke außerdem Fr. Beyer und Fr. Stelzer (Charité Berlin) für die Anfertigung der Dünnschnitte und die Hilfe bei der Mikrodisektion. Dr. Haedicke (MVZ Vorpommern GmbH) danke ich für die fachliche Unterstützung bei der Wahl der zu dissezierenden Zellen.

Viel Dank gilt auch den anderen aktuellen und ehemaligen Epigenomics Doktoranden Philipp, Reimo, Anne, Manuel, Claudia und René, auf deren Hilfsbereitschaft ich mich immer verlassen konnte. Ich danke allen Mitarbeitern der Epigenomics AG für die freundschaftliche und fruchtbare Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gebührt auch Florian Herse (Charité Berlin) für die Literaturbeschaffung.

Ich danke meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich dem Lieben Gott für die Schöpfung von Hopfen, Malz, Wasser und der gerösteten Kaffeebohne, sowie Wilhelm IV *et al.* (1516) für sein Gebot.

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungs- und Gennamenverzeichnis.....	8
2 Zusammenfassung und Ausblick.....	12
3 Einleitung.....	14
3.1 Epidemiologie des Brustkrebses.....	14
3.2 Anatomie der Brust und Brustkrebsentstehung.....	15
3.3 Therapieformen.....	16
3.4 Molekulare Biomarker.....	18
3.4.1 Epigenetische Biomarker.....	20
3.4.1.1 Prognostische Methylierungsmarker.....	22
3.4.1.2 Prädiktive Methylierungsmarker für eine Antihormontherapie.....	23
3.4.1.3 Prädiktive Methylierungsmarker für weitere Therapieformen.....	25
3.4.1.4 Diagnostische Methylierungsmarker.....	25
3.5 Technologien zur Methylierungsanalyse.....	26
3.6 Heterogenität von Tumoren.....	29
3.7 Ziel der Arbeit.....	31
4 Material und Methoden.....	33
4.1 Probenpräparation.....	33
4.1.1 Herstellung von histologischen Dünnschnitten und Mikrodisektion.....	33
4.1.1.1 Herstellung von Dünnschnitten.....	33
4.1.1.2 Histologische Färbung.....	33
4.1.1.3 Mikrodisektion.....	34
4.1.2 Probenlyse und DNA-Extraktion.....	34
4.1.2.1 Gewebelyse und DNA-Extraktion von gefrorenem Frischgewebe.....	34
4.1.2.2 Lyse und Extraktion von Dünnschnitten fixierten Gewebes.....	34
4.1.2.3 Lyse mikrodisezierter Proben.....	35
4.1.2.4 Herstellung einer Referenz FFPE-DNA.....	35
4.1.3 Herstellung von DNA-Standards.....	36
4.2 Bisulfitkonvertierung.....	37
4.2.1 Bisulfitbehandlung von DNA (Zelllinien, Standard DNA und Patientenproben).....	37
4.2.2 Hochdurchsatzprotokoll.....	38
4.2.3 Bisulfitbehandlung geringer DNA Mengen.....	39
4.3 DNA Quantifizierung.....	40
4.3.1 UV-Quantifizierung.....	40
4.3.2 Real-Time PCR-Quantifizierung.....	40
4.3.2.1 LOC645666 und GSTP1-Assay.....	40
4.3.2.2 ACTB-Assay.....	41
4.4 PCR-Amplifikation.....	41
4.5 Gelelektrophorese.....	42
4.6 Sequenzierung.....	43
4.7 Quantitative Methylierungsbestimmung (QM Assays).....	44
4.8 DNA-Chip.....	44

4.9 Statistische Methoden.....	45
5 Ergebnisse.....	46
5.1 Charakterisierung von PITX2.....	46
5.1.1 Korrelation von PITX2-Expression und Methylierung in Brustkrebszelllinien.....	47
5.1.2 Entwicklung eines QM-Assays für den Promotor C von PITX2.....	53
5.1.3 PITX2 Promotor C: Methylierung in ausgewählten Patientinnenproben.....	54
5.1.4 Vergleich beider PITX2 Promotoren in unabhängiger Patientinnenpopulation.....	56
5.2 Identifizierung neuer prognostischer und prädiktiver Methylierungsmarker.....	61
5.2.1 Identifizierung potentieller Methylierungsmarker in Zelllinien.....	61
5.2.2 Markervalidierung mit Patientinnenproben.....	63
5.2.3 Analyse weiterer Kandidatengene in Patientenproben.....	64
5.2.4 DNA-Chip Studie.....	66
5.3 Methylierungsheterogenität innerhalb von Patientenproben.....	73
5.3.1 Makroskopische Methylierungsheterogenität.....	73
5.3.2 Mikroskopische Methylierungsheterogenität.....	76
5.3.2.1 Methodenentwicklung.....	76
5.3.2.1.1 Charakterisierung von DNA aus FFPET.....	77
5.3.2.1.2 Quantitative Bisulfitsequenzierung.....	79
5.3.2.1.2.1 Methodvalidierung mit Patientenproben.....	85
5.3.2.1.3 Analyse kleinster DNA-Mengen.....	90
5.3.2.2 Mikrodisektionsstudie.....	93
5.3.2.2.1 Patientinnenvorauswahl.....	93
5.3.2.2.2 Methylierungsanalyse mikrodisezierter Proben.....	95
6 Diskussion.....	107
6.1 Methodik.....	107
6.1.1 Optimierung für FFPET Proben.....	107
6.1.2 Quantitative Bisulfitsequenzierung.....	109
6.1.2.1 Vergleich mit weiteren Bisulfitsequenzierungs-Methoden.....	109
6.1.2.2 Kalibrierung.....	111
6.1.2.3 Vergleich mit anderen Assay-Formaten.....	112
6.1.2.4 Verwendbarkeit für kleinste Templatmengen.....	115
6.1.3 Vergleich mit publizierten Methoden zur Mikrodisektionsanalyse.....	116
6.1.4 Kontaminationsvermeidung.....	118
6.2 Brustkrebsbiomarker.....	120
6.2.1 Biologie bekannter Brustkrebsbiomarker.....	120
6.2.2 Identifizierung neuer epigenetischer Biomarker.....	122
6.2.3 Methylierung innerhalb von PITX2.....	124
6.3 Methylierungsmarker im Kontext der Tumorheterogenität.....	125
6.3.1 Verteilung der Methylierung gleicher Zelltypen im Tumor.....	125
6.3.2 Heterogenität innerhalb von Arealen gleicher Zellen.....	126
6.3.3 Methylierung von Zellen der Immunabwehr.....	128
6.3.4 Auswirkung auf die Entwicklung eines prognostischen oder prädiktiven Test.....	130

Inhalt	7
7 Literatur.....	132
8 Anhang.....	156
8.1 Oligonukleotide.....	156
8.2 DNA-Chip Ergebnisse.....	163
8.3 Mikrodissezierte Proben.....	167
8.4 Veröffentlichungen.....	215
9 Curriculum Vitae.....	217

1 Abkürzungs- und Gennamenverzeichnis

5-meC	5-Methylcytosin
5' UTR	5' untranslatierte Region
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
ACTB	<i>Actin beta</i>
APC	<i>Adenomatosis Polyposis Coli</i>
AUC	Fläche unter der Kurve (<i>Area Under the Curve</i>)
B	Belgien
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BHQ-1	<i>Black Hole Quencher 1</i>
BMP2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BMP4	<i>Bone Morphogenetic Protein 4</i>
bp	Basenpaare
CCND2	Cyclin D2
CDN	Kanada
CE	Kapillarelektrophorese (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CGH	komparative Genomhybridisierung (<i>Comparative Genome Hybridization</i>)
COBRA	kombinierter Bisulfit-Restriktionsassay (<i>Combined Bisulfite Restriction Assay</i>)
CT	Durchbruchzyklus (<i>Cycle Threshold</i>)
D	Deutschland
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCIS	Duktales Karzinom <i>in situ</i>
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DLX4	<i>Distal-Less Homeobox 4</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>Double Stranded DNA</i>)
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ER	Östrogenrezeptor (<i>Estrogen Receptor</i>)
ESME Analyse	epigenetische Sequenzierungs-Methylierungsanalyse
EtOH	Ethanol
FFPET	Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebe (<i>Formalin Fixed and Paraffin Embedded Tissues</i>)
FGF4	<i>Fibroblast Growth Factor 4</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung

FLUO	Fluorescein
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GAD1	<i>Glutamate Decarboxylase 1</i>
GATA4	<i>GATA Binding Protein 4</i>
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GSTP1	<i>Glutathione S-Transferase Pi</i>
HDAC1	<i>Histone Deacetylase 1</i>
HE	Hämatoxylin und Eosin
HER-2/neu	<i>v-erb-b2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2, Neuro/Glioblastoma Derived Oncogene Homolog (Avian)</i>
HEX	Hexachlorofluorescein
HM	<i>Heavy Methyl</i>
HMW	hochmolekular (<i>High Molecular Weight</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS3ST2	<i>Heparan Sulfate (Glucosamine) 3-O-Sulfotransferase 2</i>
IDC	invasives duktales Karzinom
IHC	Immunohistochemie
ISL	<i>Islet</i>
ISL1	<i>ISL LIM Homeobox 1</i>
LATS1	<i>LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila)</i>
LATS2	<i>LATS, large tumor suppressor, homolog 2 (Drosophila)</i>
LDB1	<i>LIM Domain Binding 1</i>
LEF1	<i>Lymphoid Enhancer-Binding Factor 1</i>
LHX3	<i>LIM homeobox 3</i>
LHX4	<i>LIM homeobox 4</i>
LIM	Lin11, Isl-1 & Mec-3
LIMK1	<i>LIM domain kinase 1</i>
LMD	Laser Mikrodisektion
LMO2	<i>LIM Domain Only 2 (Rhototin-Like 1)</i>
LMW	niedermolekular (<i>Low Molecular Weight</i>)
LMX1A	<i>LIM Homeobox Transcription Factor 1, Alpha</i>
LMX1B	<i>LIM Homeobox Transcription Factor 1, Beta</i>
LOH	Verlust der Heterozygotität (<i>Loss of Heterozygosity</i>)
MDA	multiple Verdrängungsamplifikation (<i>Multiple Displacement Amplification</i>)
mPCR	Multiplex-PCR
MS-SNuPE	methylierungsspezifische Einzelnukleotid-Primerverlängerung (<i>Methylation Specific Single Nucleotide Primer Extension</i>)
MSDK	Methylierungsspezifische digitale Karyotypisierung
MSP	methylierungsspezifische PCR
MSX1	<i>Msh Homeobox 1</i>
MSX2	<i>Msh Homeobox 2</i>

NCOR1	<i>Nuclear Receptor Co-Repressor 1</i>
NK	natürliche Killerzelle
NL	Niederlande
NODAL	<i>Nodal Homolog (Mouse)</i>
NR0B1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 0, Group B, Member 1</i>
NR5A1	<i>Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1</i>
PAI-1	<i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1), Member 1</i>
PAX2	<i>Paired Box 2</i>
PAX9	<i>Paired Box 9</i>
PBL	periphere Blut-Lymphozyten
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PgR	Progesteronrezeptor
PITX1	<i>Paired-Like Homeodomain 1</i>
PITX2	<i>Paired-Like Homeodomain 2</i>
PITX3	<i>Paired-Like Homeodomain 3</i>
PK	Prozesskontrolle
POU4F1	<i>POU Class 4 Homeobox 1</i>
POU4F2	<i>POU Class 4 Homeobox 2</i>
PROP1	<i>PROP Paired-Like Homeobox 1</i>
PSAT1	<i>Phosphoserine Aminotransferase 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
QM	quantitative Methylierung
RARB	<i>Retinoic Acid Receptor, Beta</i>
RASSF1A	<i>Ras Association Domain Family 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROX	5-Carboxy-X-rhodamine
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT PCR	Reverse Transkriptase PCR
SAM	S-Adenosylmethionin
SFRP1	<i>Secreted Frizzled-Related Protein 1</i>
SLIT2	<i>Slit Homolog 2 (Drosophila)</i>
SLITRK1	<i>SLIT and NTRK-Like Family, Member 1</i>
SMAD4	<i>SMAD Family Member 4</i>
sPCR	Singleplex-PCR
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>Single Stranded DNA</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCF4	<i>Transcription Factor 4</i>
TCF7L1	<i>Transcription Factor 7-Like 1 (T-Cell Specific, HMG-Box)</i>
TDGF1	<i>Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1</i>

TE	Tris-EDTA
TFF1	<i>Trefoil Factor 1</i>
TGFB1	<i>Transforming Growth Factor, Beta 1</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRRAP	<i>Transformation/Transcription Domain-Associated Protein</i>
TSC1	<i>Tuberous Sclerosis 1</i>
TSC2	<i>Tuberous Sclerosis 2</i>
UK	Großbritannien
UNG	Uracil DNA N-Glykosylase
uPA	<i>Plasminogen Activator, Urokinase</i>
UV	ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
ZNFN1A1	<i>Zinc Finger Protein, Subfamily 1A, 1 (Ikaros)</i>

2 Zusammenfassung und Ausblick

Biomarker, die eine Vorhersage über die Prognose einer Krebserkrankung oder über das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie erlauben, spielen eine immer größere Rolle in der Medizin. Die DNA Methylierung ist wesentlich in die Tumorgenese involviert und stellt somit ein großes Potenzial für solche Biomarker dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Methylierung des für den postoperativen Verlauf von Brustkrebserkrankungen prognostischen und für eine Behandlung mit Tamoxifen prädiktiven Methylierungsmarkers PITX2 näher untersucht. Dabei wurde anhand verschiedener Brustkrebszelllinien das Verhalten der Methylierung über das gesamte PITX2 Gen charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Methylierung nicht homogen über das Gen verteilt ist. CpG Inseln im Bereich von intragenischen Exons sind besonders stark methyliert, während die Methylierung der CpG Inseln im Bereich der Transkriptionsstarts der verschiedenen PITX2 Isoformen niedriger methyliert sind. Dort konnte ein direkter Zusammenhang von Methylierung und der Expression gefunden werden. Nur die Zelllinien, die im Bereich des entsprechenden Transkriptionsstarts unmethyliert waren, exprimierten die PITX2 Isoformen A und B. Auf der Analyse dieses Bereichs basieren auch die bisher publizierten Untersuchungen, im Rahmen derer PITX2 als prognostischer und prädiktiver Marker identifiziert wurde. Für eine verkürzte Transkriptvariante (C) konnte ebenfalls eine Region identifiziert werden, deren Methylierung mit der Expression dieses Transkripts zusammenhängt. Es konnte gezeigt werden, dass auch diese Region als prognostischer und prädiktiver Methylierungsmarker geeignet ist.

Die Brustkrebszelllinien wurden ebenfalls dazu verwendet, um Gene zu untersuchen, die in einem funktionalen Zusammenhang mit PITX2 stehen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die mit den Zelllinien erzielten Ergebnisse auch auf Patientinnenproben übertragbar waren: Gene, die in den Zelllinien ähnlich wie PITX2 methyliert waren, zeigten auch in den Proben vergleichbare Methylierung und waren folglich auch prognostische Marker. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in einer Literaturrecherche weitere Gene ausgesucht, die im funktionalen Zusammenhang mit PITX2 stehen. Diese Gene wurden dann zunächst in einer Fallkontrollstudie mit 12 Brustkrebsfällen darauf untersucht, ob sie Methylierungsunterschiede zwischen den Proben zeigen. Diejenigen, die diese zeigten wurden dann im Rahmen einer DNA Chip Studie in einer Patientinnenpopulation von 384 (darunter 284 Östrogenrezeptor-positiv, 97 negativ und 3 mit unbekanntem Rezeptorstatus) Patientinnen näher untersucht. Dabei konnte BMP4 als Gen identifiziert werden, welches in der untersuchten Gesamtpopulation ein besserer Biomarker als PITX2 ist. In der Subpopulation der Östrogenrezeptor-positiven Patientinnen, einer Subpopulation in der PITX2 als besonders geeigneter Biomarker beschrieben ist, konnten sogar vier Gene (BMP4, NR5A1, BARX1 und FGF4) identifiziert werden, die eine zutreffendere Bestimmung der Rückfallwahrscheinlichkeit zuließen, als PITX2.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Methylierung einiger Marker in den verschiedenen Komponenten eines Tumors, d.h. in intraduktalen und invasiven Tumorzellen (DCIS und IDC), in Stroma-, Fett-, Muskelgewebe, in normalen Drüsenepithelzellen und in Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) zu untersuchen. Für diesen Zweck wurde eine Technologie entwickelt, die es ermöglicht, eine größere Anzahl von Genen in einigen wenigen mikrodisszierten Zellen aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben zu analysieren. Dazu wurde zunächst die DNA aus diesen fixierten Geweben näher charakterisiert, mit dem Ergebnis, dass hohe Mengen dieser DNA eine PCR inhibieren und diese Inhibition durch eine erhöhte Polymerasekonzentration vermindert werden kann. Anschließend wurde eine neuartige

Sequenziermethode entwickelt und etabliert, die eine gute Quantifizierung der Methylierung erlaubt. Diese Technologie in Verbindung mit einem für geringste DNA Mengen entwickelten Protokoll zur Bisulfitkonvertierung konnte dann erfolgreich zur quantitativen Methylierungsanalyse von mikrodisssezierten Zellen angewendet werden. Dabei wurde die Methylierung von 13 Loci in drei Brustkrebsfällen näher untersucht. Es zeigte sich, dass sich die Methylierung dieser Loci zwischen verschiedenen Tumorkomponenten stark unterscheidet. So ist PITX2 beispielsweise vorwiegend in DCIS und IDC methyliert. Es ist jedoch auch in normalem Drüsenepithel und in den TIL Methylierung vorhanden. In den anderen Komponenten ist PITX2 nicht methyliert. Innerhalb von Proben einer Tumorkomponente aber von unterschiedlichen Orten des Tumors ist die Methylierungsheterogenität gering. Methylierungsunterschiede zwischen DCIS und IDC konnten bei keinem der 13 analysierten Loci gefunden werden. Es konnte beobachtet werden, dass innerhalb von kleinen, mikrodisssezierten Tumorarealen die Methylierung nicht homogen ist, was ein Indiz dafür sein könnte, dass sich unmittelbar benachbarte Tumorzellen weiter unterscheiden.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode zur multiplexierten quantitativen Analyse von DNA Methylierung ist auch auf andere Fragestellungen übertragbar. Es steht nun eine Technologie zur Verfügung, die es generell ermöglicht, die Methylierung einer Vielzahl von Loci bei einer sehr geringen Menge DNA zu untersuchen. So könnte diese Methode in Zukunft dafür verwendet werden, um beispielsweise bestimmte Lymphozyten oder Stammzellen gezielt hinsichtlich ihrer Methylierung zu charakterisieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte und etablierte quantitative Sequenziermethode ist aufgrund ihrer Robustheit und dem damit verbundenen geringen Etablierungsaufwand für neue Assays dazu geeignet, eine große Anzahl potenzieller Biomarker schnell und kostengünstig zu untersuchen.

3 Einleitung

3.1 Epidemiologie des Brustkrebses

Brustkrebs (Mammakarzinom) ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Nach Angaben der IARC (*International Association on Research of Cancer*) erkranken weltweit pro Jahr etwa 1,2 Millionen Frauen an Brustkrebs, 410000 sterben daran (Parkin *et al.*, 2002). In der westlichen Zivilisation erkrankt ungefähr jede zehnte bis elfte Frau im Verlauf ihres Lebens an Brustkrebs (Giersiepen *et al.* 2005). In Deutschland waren im Jahr 2002 nach Schätzung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland etwa 55000 Frauen betroffen. Die Anzahl der Sterbefälle an Brustkrebs betrug knapp 18000 im selben Jahr (GEKID 2006). In den USA ist Brustkrebs die Haupttodesursache bei Frauen zwischen 40 und 59 (Greenlee *et al.* 2000). Brustkrebs stellt mit circa 27% den größten Anteil an tödlich verlaufenden Krebserkrankungen bei Frauen dar (Giersiepen *et al.* 2005). Dabei treten große geographische Unterschiede bei dem Auftreten von Neuerkrankungen (Inzidenz) und der Sterblichkeit (Mortalität) auf. Im europäischen Vergleich liegt die Inzidenz in Deutschland im oberen Mittelfeld. In Nord- und Westeuropa liegt sie deutlich über der von Ost- und Südeuropa. In den USA liegt sie um ca. 20 % höher, in Japan um ca. 50 % niedriger als in Deutschland. Die Varianz hinsichtlich der Mortalität ist dagegen deutlich niedriger, lediglich in Asien liegt diese weit unter der Mortalität in Europa. Trotz höherer Inzidenz in den USA liegt dort die Mortalität geringfügig unter der von Westeuropa (Parkin *et al.*, 2002).

Die Inzidenz von Brustkrebs nimmt zu und hat sich in Deutschland zwischen 1972 und 2002 ungefähr verdoppelt (Giersiepen *et al.* 2005). Dies entspricht einer jährlichen Zunahme von ca. 2,5 %. Gleichzeitig nimmt die Mortalität ab. Eine Analyse der Mortalität von 1990 - 1992 und 2000 - 2002 zeigt, dass der Rückgang besonders in den jüngeren Altersklassen ausgeprägt ist (Giersiepen *et al.* 2005). Während sich bei den über 75-Jährigen kein Rückgang einstellt, ging die Mortalität bei den unter 50-Jährigen um 20 – 30 %, bei den 50- bis 74-Jährigen um 10 - 15 % zurück. Die relative 5-Jahres-Überlebenszeit beträgt nach aktuellen Schätzungen ca. 79 % (GEKID 2006) und liegt damit im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen relativ hoch. Diese liegt z.B. bei Magenkrebs bei ca. 31 % und bei Lungenkrebs bei ca. 15 %. Auch die 10-Jahres-Überlebensrate liegt mit ca. 65 % (GEKID 2006) noch sehr hoch. Die Gründe für die steigende Inzidenz sind unklar. Es wird vermutet, dass vor allem veränderte Lebensgewohnheiten dafür verantwortlich sein könnten, wie z.B. frühe Menarche, späte Menopause, späte Schwangerschaft, veränderte Essgewohnheiten, Übergewicht, Alkoholkonsum und eine frühe Einnahme hormoneller Empfängnisverhütungsmittel. Für die Abnahme der Mortalität sind vor allem verbesserte diagnostische Möglichkeiten, ein allgemein erhöhtes Gesundheitsbewußtsein, d.h. eine höhere Akzeptanz von Vorsorgemaßnahmen und verbesserte Therapien verantwortlich. In diesen Aspekten liegen wohl auch die großen weltweiten geographischen Unterschiede der Inzidenz und der Mortalität begründet.

Die Relevanz des Mammakarzinoms wird auch durch die Altersverteilung der Erkrankten deutlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 62 Jahren und damit um 7 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter für Krebs insgesamt (GEKID 2006). Dabei steigt die Inzidenz zwischen dem 30. und dem 60. Lebensjahr stark an und bleibt danach konstant, bzw. fällt sogar leicht ab (GEKID 2006). Die Mortalität ist bei jungen Patientinnen besonders hoch (Giersiepen *et al.* 2005).

3.2 Anatomie der Brust und Brustkrebsentstehung

Die weibliche Brust besteht zum größten Teil aus Fett- und Drüsengewebe sowie aus Bindegewebe, Lymph- und Blutgefäßen. Die Brustdrüse ist aufgebaut aus einem duktalem Anteil, bestehend aus den Milchgängen (Ductus lactifer), die kleinere und größere Milch-abführende Gänge (Duktuli) bilden und in die Brustwarze (Mamilla) münden und einem lobulären Anteil, den Drüsenläppchen (Lobuli), welche durch kleine Milchgänge zu Drüsenlappen verbunden sind (Abbildung 1, links). Die Drüsenlappen stellen die milchproduzierenden Strukturen des Milchgangssystems dar. Sowohl der duktale als auch der lobuläre Anteil bestehen hauptsächlich aus Epithelzellen. Die Drüsenläppchen bestehen aus einem inneren einschichtigen Epithel, das durch eine Basalmembran vom umgebenden Bindegewebe getrennt ist. Zwischen den Epithelzellen und ihrer Basalmembran liegen Korbzellen, die die Fähigkeit zur Kontraktion besitzen (Myoepithelien). Kleine Milchgänge haben ebenfalls ein einschichtiges Epithel, das auch noch Milch bildet. Die größeren Milchgänge besitzen ein ein- bis zweischichtiges Epithel und in ihrer Wand glatte Muskulatur, die dem Milchtransport dient.

Das Brustdrüsensystem unterliegt während des Zyklus einem hohen hormonellen Proliferationsdruck. Dies ist wohl auch der Grund für das relativ häufige Auftreten von Brustkrebskrankungen. Entsprechend des

Ursprungs des Brustkrebs unterscheidet man Milchgangkarzinome (duktales Karzinom) und Lappchenkarzinome (lobuläre Karzinome). Das duktales Karzinom stellt mit ca. 75 % aller Brustkrebskrankungen die häufigste Form dar, gefolgt von lobulären Karzinomen mit 10 %. Neben diesen Hauptgruppen des Mammakarzinoms gibt es einige selteneren Varianten, die sich aufgrund ihrer Histologie von den duktalem und lobulären Karzinomen unterscheiden (Mallon *et al.* 2000). Innerhalb der beiden Hauptgruppen erfolgt eine weitere Unterteilung entsprechend der Entwicklungsstufe, in der sich der Tumor gerade befindet. Man geht dabei davon aus, dass es im Verlauf einer Brustkrebs-

erkrankung zu einer linearen Progression über die Entwicklungsstadien einer atypischen Hyperplasie, des Karzinoms *in situ* und letztlich des invasiven Karzinoms kommt (Abbildung 1, rechts). Entsprechend erfolgt die

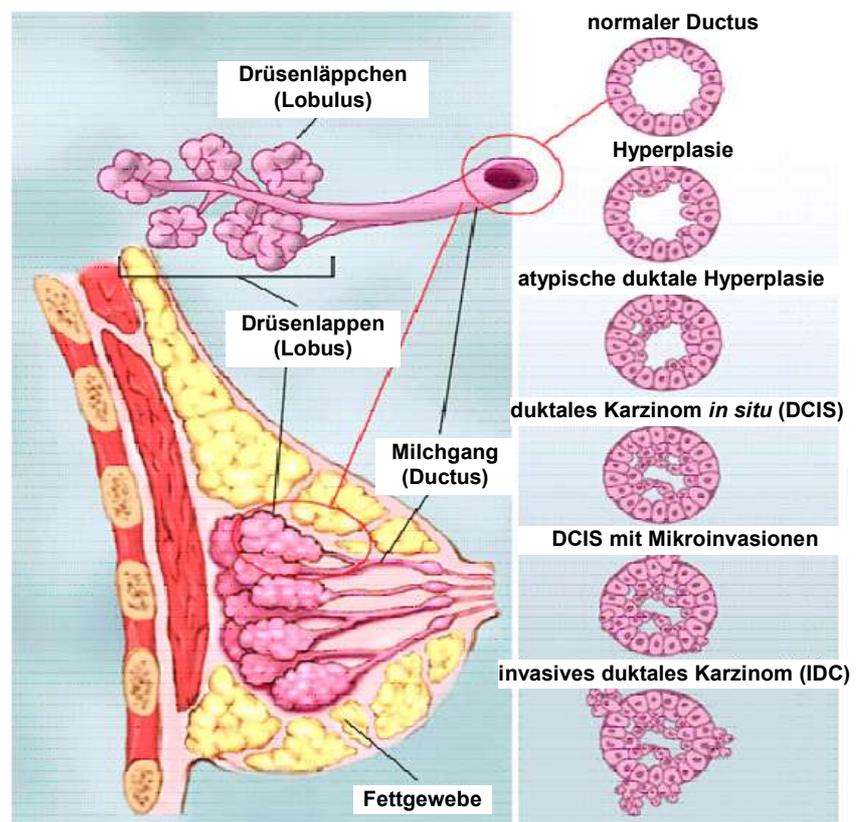


Abbildung 1: Anatomie der Brust und hypothetische Brustkrebsentstehung am Beispiel des duktales Karzinoms (Beschreibung im Text).

Bezeichnung der Untergruppen als duktales Karzinom *in situ* (DCIS), invasives duktales Karzinom (IDC), lobuläres Karzinom *in situ* (LCIS) und invasives lobuläres Karzinom (ILC). Im Unterschied zu den invasiven Formen zeichnen sich die *in situ* Formen darin aus, dass die entarteten Zellen noch auf die ursprüngliche Komponente, d.h. die Duktuli oder die Lobuli begrenzt sind und noch nicht das benachbarte Gewebe infiltrieren.

Neben dieser histologischen Klassifizierung wird auch die Ausbreitung und die Differenzierung des Tumors beschrieben. Die Klassifizierung der Ausbreitung erfolgt in der Regel nach dem TNM-System (Sobin 1999). T steht für die Größe des Primärtumors, „N“ kodiert die Anzahl eventuell befallener Lymphknoten und „M“ beschreibt die Anzahl potentieller Metastasen. Die Differenzierung des Tumors wird durch das „Grading“ beschrieben (Elston und Ellis 1991, Rosen und Oberman 1993). Dabei spielen beispielsweise Faktoren wie Kernmorphologie und Mitoserate eine Rolle. Sowohl der TNM-Wert, als auch der *Grade* liefern erste Rückschlüsse über die Aggressivität des Tumors und damit den potentiellen Ausgang der Erkrankung (Prognose).

3.3 Therapieformen

Handelt es sich um einen malignen Tumor, ist in den meisten Fällen eine operative Entfernung des Tumors der erste Schritt der Therapie. Hierbei ist das Ziel, möglichst das gesamte Tumormaterial zu entfernen. Bei der operativen Entfernung des Tumors werden auch Lymphknoten aus der Achselhöhle entnommen. Sind in den Lymphknoten Krebszellen zu finden (Lymphknoten-positive Tumoren), muss davon ausgegangen werden, dass der Tumor bereits zu metastasieren begonnen hat.

Im Anschluß an die operative Entfernung des Tumors erfolgen in der Regel physikalische (Radiotherapie) und / oder medikamentöse Behandlungen. Letztere kann in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden. Ist der Tumor zu groß für eine operative Entfernung, dann wird eine medikamentöse Behandlung bereits vor der Operation durchgeführt. Ziel dieser sogenannten neoadjuvanten Therapie ist es, den Tumor auf eine operable Größe zu schrumpfen. Hat der Tumor bereits begonnen Metastasen zu bilden, dann ist in der Regel keine kurative Therapie mehr möglich. In diesem Fall ist das Ziel der sogenannten palliativen Therapie eine Lebenszeitverlängerung bei möglichst hoher Lebensqualität. Bei der postoperativen medikamentösen Behandlung einer Brustkrebserkrankung, bei der keine detektierbaren Metastasen vorliegen, spricht man von einer adjuvanten Therapie.

Eine weitere Unterscheidung der medikamentösen Therapie erfolgt nach dem Wirkmechanismus des Medikaments. Dabei erfolgt die Unterscheidung zwischen Chemo-, Hormon-, Antikörper- und Biophosphonattherapie.

Bei der Chemotherapie kommen Zellgifte (Zytostatika) zum Einsatz. Zytostatika hemmen das Zellwachstum, bzw. die Zellteilung und können daher das Wachstum des Tumors vermindern. Zur Zeit sind eine Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika verfügbar, die sich in ihrer Wirkungsweise teilweise grundsätzlich unterscheiden. Die ersten Chemotherapeutika, die zur klinischen Anwendung kamen, waren DNA bindende Stoffe. Substanzen wie Mustargen, Busulfan, Chlorambucil, Melphalan und Thiotepa, sowie Platinkomplexe und Mitomycine gehören zur Klasse der bifunktionalen Alkylanzien, die eine kovalente Quervernetzung der Nukleinbasen erzeugen. Die mit der hohen Reaktivität dieser Stoffe verbundenen Nebenwirkungen führten

zur Entwicklung von Alkylanzien, die erst durch enzymatische Hydroxylierung in den Zellen aktiviert werden (z.B. Cyclophosphamid, Ifosfamid, Procarbazin und Dacarbazin).

Das zunehmende Verständnis des Stoffwechsels führt zur Entwicklung von antimetabolisch wirksamen Substanzen. 6-Mercaptopurin und 6-Thioguanin hemmen die Purinsynthese, 5-Fluorouracil die Thymidylatsynthase und Methotrexat die Dihydrofolat-Reduktase. Cytosinarabinosid hemmt die DNA Polymerase α und Hydroxyharnstoff die Reduktion der Ribo- zu den Desoxyribonukleosiden.

Durch die Entwicklung leistungsstarker Screeningverfahren für Wirkstoffe konnte eine Reihe therapeutisch wirksamer Naturstoffe identifiziert werden, wie Vinca-Alkaloide, Antibiotika (z.B. Anthrazykline), Epipodophyllotoxine, Taxane. Gerade die Anthrazykline und die Taxane haben sich in den letzten Jahren in der klinischen Routine durchsetzen können. Die Wirkungsweise der Naturstoffe ist dabei sehr vielseitig. Durch unterschiedliche Mechanismen werden Radikal-induzierte DNA-Strangbrüche ausgelöst, die zum Teil durch Hemmung der Topoisomerase nicht mehr repariert werden. Anthrazykline interkalieren beispielsweise mit der DNA, erzeugen Strangbrüche und inhibieren die Topoisomerase II. Die Camptothecin-Derivate Irinotecan und Topotecan bewirken über eine Komplexbildung mit der Topoisomerase I und der DNA DNA-Strangbrüche. Es kommt zu einer Hemmung der DNA- und RNA-Polymerasen. Mitomycin ist durch seine Bindung an die DNA eher den Alkylanzien zuzurechnen. Einige Naturstoffe binden an Tubulin, dem monomeren Baustein der Mikrotubuli. Während Vinca-Alkaloide die Polymerisation zu den Mikrotubuli unterbinden, beschleunigen die Taxane einerseits den Aufbau der Mikrotubuli, andererseits verhindern sie deren Depolymerisierung.

Östrogen, das bei Frauen vor allem in den Eierstöcken, aber auch in der Nebenniere und im Fettgewebe produziert wird, begünstigt das Wachstum vieler Brustkrebstumoren (Prall *et al.* 1998). Dieses Östrogen-induzierte Wachstum zu unterbinden ist das Ziel der Hormontherapie. Dabei kommen Antiöstrogenen (Tamoxifen, Toremifene, Raloxifen und Fulvestrant) zum Einsatz, die antagonistisch das Binden des Östrogens an seine Rezeptoren verhindert. Die Bildung des Östrogens im Fettgewebe, der Hauptöstrogenquelle bei postmenopausalen Frauen, wird durch Aromatasehemmer (Anastrozol, Letrozol und Exemestan) verringert. Durch Analoge des Gonadotropin-releasing Hormons (GnRH) kann die durch die Hypophyse regulierte Bildung von Östrogen in den Eierstöcken bei premenopausalen Frauen supprimiert werden. Solche Substanzen sind Buserelin, Goserelin, Triptorelin und Leuprolide. Die Bildung von Östrogen in den Eierstöcken kann außerdem durch ein operatives Entfernen der Eierstöcke erreicht werden. Eine Senkung des Östrogenspiegels im Blut wird durch Gestagene erreicht. Die Behandlung mit Tamoxifen ist bis heute die am meisten verwendete adjuvante Hormontherapie.

Eine Überexpression des HER-2/neu Gens steht bei Brustkrebserkrankungen mit einer verringerten Lebenserwartung im Zusammenhang (Slamon *et al.* 1987). HER-2/neu gehört zu der Familie der HER Gene, der auch der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) angehört. Die Entwicklung eines Antikörperpräparates (Trastuzumab, Herceptin[®]) hat in den letzten Jahren einen bedeutenden Fortschritt bei der Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms gebracht.

Letztlich finden Bisphosphonate bei der Stabilisierung der Knochensubstanz und damit bei der Bekämpfung von Knochenmetastasen klinische Anwendung.

Oftmals wird bei der Behandlung einer Brustkrebserkrankung nicht nur ein einzelnes, sondern eine Kombination von Medikamenten angewendet. Dabei kommen sowohl Kombinationen verschiedener Chemotherapeutika, als auch Kombinationen von Chemo-, Hormon- und Antikörpertherapie zum Einsatz. Die

Wahl der für die bestimmte Patientin geeigneten Behandlungsform ist entscheidend für den Erfolg der Behandlung. Daher sollte vor der Behandlung die Erkrankung möglichst gut charakterisiert sein, um den Erfolg der unterschiedlichen Behandlungsformen vorhersagen zu können. Auf der anderen Seite soll jedoch auch verhindert werden, dass die Patientin eine Therapie erhält, deren Nebenwirkungen in keinem Verhältnis zu dem potentiellen Nutzen stehen. Neben der ersten Abschätzung des möglichen Krankheitsverlaufs durch Tumorcharakteristiken wie TNM-Wert, *Grade* und Art des Tumors, sind daher Indikatoren (Biomarker) von hohem klinischen Interesse, anhand derer sich der weitere Krankheitsverlauf möglichst gut abschätzen lässt.

3.4 Molekulare Biomarker

Im Rahmen von Brustkrebserkrankungen sind vier prinzipiell verschiedene Arten von Biomarkern von klinischem Interesse. Prädispositionsmarker erlauben eine Einschätzung des Risikos, dass eine bestimmte Frau an Brustkrebs erkranken wird. Diagnostische Marker ermöglichen ein Auffinden der Krankheit, möglichst zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung. Prognostische Biomarker helfen, den erwarteten Krankheitsverlauf, ohne Berücksichtigung der Art und der Intensität einer angewendeten Therapie, einzuschätzen. Prädiktive Biomarker ermöglichen eine Aussage über die Wirkung einer bestimmten Therapie auf den Krankheitsverlauf (Ross *et al.* 2003, Ross *et al.* 2004, Ross *et al.* 2005).

Der überwiegende Teil der Brustkrebserkrankungen entsteht sporadisch (95 %), allerdings sind 5 % familiär bedingt und resultieren aus Keimbahnmutationen. Es konnten zwei Genloci identifiziert werden, deren Inaktivierung für etwa 90 – 95 % aller familiärer Mammakarzinome verantwortlich ist. Diese beiden Loci kodieren für die Gene BRCA1 und BRCA2 (*Breast Cancer 1* und *2*). Es handelt sich um Tumorsuppressorgene, die Wachstum und Differenzierung im Brustepithel regulieren. Frauen mit einem solchen Mutationshintergrund haben eine 30 % - 80 % ige Wahrscheinlichkeit in ihrem Leben Brustkrebs zu entwickeln, wobei dieser häufig schon vor dem 50. Lebensjahr auftritt (Frank und Critchfield 2002, Rebbeck 2002, de Jong *et al.* 2002, Couch und Hartmann 1998).

Diagnostische Biomarker, also Marker die geeignet sind eine Brustkrebserkrankung zu detektieren, sind bislang noch nicht in der klinischen Routine etabliert, an entsprechenden Markern wird zur Zeit geforscht. Gesucht werden vor allem Marker, die in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten (z.B. Blut) zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung nachgewiesen werden können. Bisher ist Mammographie die Methode der Wahl für die Brustkrebsfrüherkennung. Zwar führt diese Methode zu einer Senkung der Mortalität, allerdings ist der tatsächlich Nutzen umstritten, da auf der anderen Seite auch Frauen falsch positiv getestet werden und dann eine unnötige Behandlung erhalten (Gotzsche und Nielsen 2006). Biomarker, die die Anzahl der falsch positiv getesteten Frauen reduzieren und/oder durch ein früheres Erkennen der Krankheit die Mortalität weiter reduzieren sind daher von hohem klinischen Interesse.

Neben einer vorläufigen Prognostizierung des Krankheitsverlaufs anhand der TNM-Klassifizierung, des Alters der Patientin und des *Grading*s sind prognostische und prädiktive Biomarker von hohem klinischem Interesse. Dabei ist oftmals keine klare Abgrenzung von prädiktiven und prognostischen Biomarkern möglich, da einige bei unbehandelten Patientinnen sowohl einen guten Krankheitsverlauf prognostizieren und zusätzlich auch das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen.

Die wohl bekanntesten prognostisch-prädiktiven Biomarker, die auch bereits seit vielen Jahren standardisiert

in der klinischen Routine eingesetzt werden, sind die Hormonrezeptoren Östrogenrezeptor (ER) und der Progesteronrezeptor (PgR) (Osborne 1998). Über 70 % aller Brustkrebstumoren sind ER positiv (Harvey *et al.* 1999). Ein positiver Östrogen- und Progesteronrezeptor-Status ist assoziiert mit gut differenzierter Histologie, negativem Lymphknoten-Status, Diploidie, niedriger Proliferationsrate und einer Tendenz für einen positiven klinischen Verlauf (Osborne 1998, Bertucci *et al.* 2000, Locker 1998). ER und PgR negative Tumoren sind oftmals mit anderen Biomarkern assoziiert, die ebenfalls eine schlechte Prognose indizieren, wie z.B. Amplifikation der Onkogene HER-2/neu, c-myc und int-2, mit Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und Überexpression von Invasions- und Metastasen-assoziierten Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und einigen Proteasen (Osborne 1998, Locker 1998). Der ER und PgR Status wird weit verbreitet zum Prognostizieren eines progressiven Krankheitsverlaufs und für die Wahl einer adjuvanten Hormontherapie verwendet (Locker 1998). Dabei läßt sich eine Prognose anhand des ER Status nur für die erste Zeit nach der Operation stellen. Bereits für das rückfallfreie Überleben nach ca. 7 Jahren ist der ER Status kein prognostischer Biomarker mehr (Fisher *et al.* 1988). Entsprechend der biologischen Funktion des Östrogenrezeptors sprechen ER α und PgR positive Patientinnen in der Regel gut auf adjuvante Hormontherapien an (Bertucci *et al.* 2000).

Eine Amplifikation des HER-2/neu Locus und eine Überexpression des entsprechenden Proteins wird in ungefähr 20-30% aller invasiven Brustkrebstumoren gefunden (Slamon *et al.* 1987). Die Bestimmung der HER-2/neu Expression ist inzwischen zusammen mit der ER und PgR Bestimmung eine Standarduntersuchung in der klinischen Routine (Murphy *et al.* 2005). Amplifikation und Überexpression von HER-2/neu geht einher mit einer schlechten Prognose, sowohl in Lymphknoten-negativen, als auch positiven Patientinnen (Ross *et al.* 2003a). Zusätzlich geben diese Daten einen Aufschluß über das Ansprechen auf die Antikörpertherapie mit dem entsprechenden HER-2/neu Antikörper (Trastuzumab, Herceptin[®]).

Neben den Tests auf ER, PgR und HER-2/neu Status, die alle von der FDA zugelassen sind und von der *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) und dem *College of American Pathologists* (CAP) empfohlen werden, gibt es zur Zeit lediglich zwei weitere Tests mit FDA Zulassung. Ende 2004 wurde mit dem CellSearch[®] Test (Veridex, USA) ein Test zugelassen, mit dem zirkulierende Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen nachgewiesen werden können und welche eine prognostische Aussage über den Krankheitsverlauf zulassen (Gilbey *et al.* 2004, Riethdorf 2007, Cristofanilli *et al.* 2004). Seit Februar 2007 ist daneben ein RNA Chip-basierter Test (MammaPrint[®], Agendia, NL) von der FDA zugelassen, der eine Prognose anhand des Expressionsmusters von 70 Genen erlaubt (Weigelt *et al.* 2005 und 2003, van 't Veer 2002). Ein Überblick über diese und einige weitere prognostische und prädiktive Biomarker, dem entsprechenden Wirkstoff, für den sie prädiktiv sind und die klinische Bedeutung ist in Tabelle 1 dargestellt. Dabei sind vor allem die Tumor-assoziierten Proteolysefaktoren uPA (Plasminogenaktivator vom Typ Urokinase) und PAI-1 (Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1) interessant, die nach Hayes *et al.* (1996) das höchste Evidenzniveau *level of evidence 1* für den klinischen Nutzen neuer Prognosefaktoren erreicht haben (Sweep *et al.* 1998, Harbeck *et al.* 2002, 2004 und 2004a, Look *et al.* 2002, Duffy 2002).

Biomarker	Wirkstoff	klinische Bedeutung	Referenz
ER/PgR	Aromatase Inhibitoren, Antiöstrogene	Standard Test, FDA zugelassen	Mirza <i>et al.</i> 2002, Murphy <i>et al.</i> 2005
HER-2/neu	Trastuzumab (Herceptin®)	Standard Test, FDA zugelassen	Mirza <i>et al.</i> 2002, Jackisch 2006, Murphy <i>et al.</i> 2005
DNA-Ploidie		klinische Studien	Kallioniemi <i>et al.</i> 1987, Mirza <i>et al.</i> 2002
S-Phase		klinische Studien	Kallioniemi <i>et al.</i> 1987, Wenger und Clark 1998, Mirza <i>et al.</i> 2002
Ki67 Labeling Index		klinische Studien	van Diest <i>et al.</i> 2004, Urruticoechea <i>et al.</i> 2005, Mirza <i>et al.</i> 2002
Cyclin D	Flavopyridol	klinische Studien	
Cyclin E		klinische Studien	Lopez-Beltran <i>et al.</i> 2006
EGFR	Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab	klinische Studien	Nicholson <i>et al.</i> 1990
VEGF	Bevacizumab	klinische Studien	Sledge 2005
p53		klinische Studien	Mirza <i>et al.</i> 2002
uPA/PAI-1		klinische Studien	Sweep <i>et al.</i> 1998, Harbeck <i>et al.</i> 2002 2004 und 2004a, Look <i>et al.</i> 2002, Duffy 2002
Transkription - 70 Gene (MammaPrint®)		FDA zugelassen, kommerziell erhältlich	Weigelt <i>et al.</i> 2005 und 2003, van 't Veer 2002
Transkription – 21 Gene (Oncotype Dx®)		kommerziell erhältlich	Paik <i>et al.</i> 2004, Habel <i>et al.</i> 2006
Cathepsin D		klinische Studien	Mirza <i>et al.</i> 2002
BCL2	G3135 Proteasome Inhibitor	klinische Studien	Holmqvist <i>et al.</i> 1999
Zirkulierende Tumorzellen (CellSearch®)		FDA zugelassen	Gilbey <i>et al.</i> 2004, Riethdorf 2007, Cristofanilli <i>et al.</i> 2004

Tabelle 1: Liste einiger prognostischer und prädiktiver Brustkrebsbiomarker, dem entsprechenden Wirkstoff und der klinischen Bedeutung.

3.4.1 Epigenetische Biomarker

Der Begriff „Epigenetik“ definiert alle mitotisch und meiotisch vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht in der DNA selbst kodiert sind. Bislang sind drei solcher epigenetischer Systeme bekannt: RNA-assoziierte Genregulation, Histonmodifikation und DNA-Methylierung (einen Überblick liefert Egger *et al.* 2004). Methylierung der C5 Position von Cytosinbasen in DNA ist seit langem als epigenetischer Mechanismus von fundamentaler Bedeutung bekannt (Holliday und Pugh 1975, Riggs 1975). Die Methylierung von Cytosinen im CpG Kontext wird durch mehrere DNA Methyltransferasen (DNMTs) reguliert und aufrechterhalten (Robertson *et al.* 1999) und ist involviert in Prozesse wie Inaktivierung parasitärer DNA,

wie z.B. Transposons und der Abwehr von Viren (Bestor 1998), Geninaktivierung im Rahmen von Zelldifferenzierung und Entwicklung (Dean *et al.* 2005), *Imprinting* (Li *et al.* 1993), X-Chromosom-Inaktivierung (Chang *et al.* 2006, Panning und Jaenisch 1998) und auch Sicherung der strukturellen Integrität von Chromosomen (Xu *et al.* 1999, Robertson 2005).

Entgegen der statistischen Wahrscheinlichkeit kommen CG Dinukleotide (CpGs) im menschlichen Genom nur zu 20% der erwarteten Häufigkeit vor. Diese Unterrepräsentation ist das Resultat einer Selektion, die von der großen Mutationshäufigkeit dieser Duplettsequenz herrührt: Thymin, welches als Produkt einer spontanen Desaminierung von 5-Methylcytosin entsteht, wird von den zellulären Reparatursystemen nicht als DNA-fremde Base erkannt und deshalb auch nicht repariert. Trotzdem gibt es im Genom Regionen, die die statistisch erwartete Dichte von CpGs aufweisen. Diese kurzen (0,5-2kb) Regionen werden CpG-Inseln genannt und sind während der Evolution stark konserviert, da sie normalerweise nicht methyliert sind und Uracil, das Produkt einer spontanen Desaminierung von Cytosin, als DNA-fremde Base erkannt und repariert wird. CpG Inseln befinden sich vor allem in der Promotorregion von Genen und bewirken, falls methyliert, eine stabile Repression der Expression des entsprechenden Gens. Etwa 40 % der Gene des humanen Genoms enthalten solche CpG-Inseln, die in den meisten Fällen unmethyliert sind (Bird 1986, Eckhardt *et al.* 2006). Abnormale *de novo* Methylierung von CpG Inseln ist charakteristisch für Krebs und wird schon während der frühen Karzinogenese gefunden (Jones und Baylin 2002). Davon sind vor allem Tumorsuppressorgene betroffen, die im Tumor inaktiviert sind. Eine gängige Theorie für die Erklärung der Karzinogenese beschreibt den Ausfall beider Allele eines Tumorsuppressorgens durch LOH (*Loss of Heterozygosity*), Mutationen und Methylierung oder einer Kombination dieser Ereignisse (Jones und Laird 1999, Knudson 1971). In Tumoren ist außerdem insgesamt eine deutliche Abnahme der genomweiten Gesamtmethylierung zu beobachten. Diese Hypomethylierung findet sich vor allem in repetitiven oder parasitären DNA-Elementen, welche in gesunden Zellen normalerweise methyliert sind (Yoder *et al.* 1997). Diese Hypomethylierung bedingt eine Abnahme der genetischen Stabilität, indem transponierbare Elemente aktiviert werden und sich die strukturelle Stabilität der Chromosomen verringert (Xu *et al.* 1999, Robertson 2005).

Die fundamentale Rolle der DNA Methylierung bei der Krebsentstehung erklärt auch das immer größer werdende Interesse für epigenetische Biomarker in der klinischen Anwendung. Zusätzlich haben inzwischen auch demethylierende Agenzien ihren Wert als Chemotherapeutika unter Beweis gestellt (Egger *et al.* 2004, Issa *et al.* 2004), sodass sich in der Zukunft die DNA Methylierung selbst als Ziel einer Therapie darstellen könnte. Zur Zeit befinden sich noch keine DNA Methylierungsmarker in der klinischen Routine und werden nur in der klinischen Forschung angewendet. Insgesamt ist die Identifizierung neuer und besserer prädiktiver und prognostischer Biomarker für die Wahl einer geeigneten Therapie aber auch von diagnostischen Biomarkern für eine Früherkennung einer Krebserkrankung von größtem Interesse. Die Vielzahl der zur Verfügung stehenden verschiedenen Therapieformen können gerade prädiktive Biomarker für eine Optimierung der Behandlung zu lebensrettenden Diagnostika machen. Dabei bietet sich gerade die DNA Methylierung auch aus technischer Sicht hervorragend an. Zum einen kann der Wert der DNA Methylierung nur zwischen 0 % und 100 % liegen und die Normalisierung gegenüber Haushaltsgenen ist nicht notwendig, zum anderen ist DNA im Gegensatz zu RNA und vielen Proteinen generell sehr stabil und lässt sich daher gut analysieren, gerade auch in archivierten Patientinnenproben.

3.4.1.1 Prognostische Methylierungsmarker

In mehreren Studien ist inzwischen die Verwendung der DNA Methylierung für prognostische Zwecke bei Tumorerkrankungen beschrieben. Für eine Vielzahl von Markern, deren Expression (mRNA oder Protein) bereits als prognostische Marker bekannt ist, wurde DNA Methylierung als wichtiger Regulator der Expression gefunden.

Unter den bekannten prognostischen Faktoren, für die DNA Methylierung beschrieben sind, ist wohl der bedeutendste der Plasminogenaktivator vom Typ Urokinase (uPA) (Jänicke *et al.* 2001). Den ersten Beweis für den Einfluß der DNA Methylierung auf die Expression von uPA erbrachte eine Studie von Xing und Rabbani (1999). Dort konnte gezeigt werden, dass in Zelllinien, die keine Expression von uPA zeigten, auch der Promotor methyliert war und umgekehrt. DNA Methylierung und eine Korrelation mit der Expression wurde dann auch in klinischen Brustkrebsproben gefunden (Pakneshan *et al.* 2004 und 2005). Die Methylierung des Promotors von uPA korrelierte dabei invers mit dem *Grade* und wurde vor allem in ER positiven Tumoren gefunden. In einer ähnlichen Studie von Chen *et al.* (2003) konnte gefunden werden, dass 23 % von 93 Brustkrebstumoren Methylierung des uPA Locus zeigten und dass vorwiegend die ER positiven Tumoren methyliert waren. Eine direkte Korrelation von Methylierung und Expression wurde bisher in klinischen Brustkrebsproben nicht gezeigt.

Für einige weitere Gene, die im Rahmen der Prognose von Brustkrebserkrankungen eine Rolle spielen, wurde inzwischen auch abnormale Methylierung in Tumoren gefunden. In den meisten dieser Studien wurden allerdings nur eine sehr kleine Anzahl von Patientinnen untersucht und die Methylierung auch nicht direkt mit dem Ausgang der Erkrankung korreliert, sondern mit anderen prognostischen Markern, wie z.B. ER Status und *Grade*. Trotzdem liefern diese Studien einen Hinweis für die Rolle der DNA Methylierung bei der Brustkrebsprognose.

Shinozaki *et al.* (2005) analysierten die Promotormethylierung von sechs bekannten Tumorsuppressor- und verwandten Genen (RASSF1A, APC, TWIST, CDH1, GSTP1 und RARB) in 151 Brusttumoren. Dabei war CDH1 bereits auf Expressionsebene als prognostischer Marker bekannt (Yoshida *et al.* 2001 und Siitonen *et al.* 1996) und auch differentielle Methylierung in Brustkrebstumoren war bereits nachgewiesen (Hu *et al.* 2002). Shinozaki *et al.* (2005) korrelierten die Methylierung dieser sechs Gene mit dem bekannten prognostischen Faktor des Lymphknotenstatus. Sie fanden, dass die Hypermethylierung von CDH1 assoziiert mit dem Befall von Lymphknoten, einer invasiven Histologie und dem Fehlen von ER Expression zusammen hing. Auf der anderen Seite trat Hypermethylierung der Gene RASSF1A und RARB eher in ER positiven bzw. HER-2/neu positiven Tumoren auf. Hypermethylierung von GSTP1 und RARB war signifikant assoziiert mit dem Befall der Lymphknoten. Chow *et al.* (2005) fanden bei 110 Tumoren, dass die Methylierung von COX-2 mit prognostischen Faktoren wie Tumorgroße und Anzahl der befallenen Lymphknoten korreliert. Die Expression des *Secreted frizzled related protein 1* (SFRP1), einem negativen Regulator des Wnt Signalwegs, ist in Brustkrebs oftmals reprimiert und mit einer schlechten Prognose verbunden (Klopocki *et al.* 2004). Kürzlich haben zwei Gruppen unabhängig voneinander die epigenetische Regulation von SFRP1 durch DNA Methylierung nachweisen können (Lo *et al.* 2006, Veeck *et al.* 2006), wobei Veeck *et al.* (2006) zusätzlich die prognostische Eigenschaft des Markers an 130 Brustkrebspatientinnen zeigen konnte.

Weitere Gene, die im Zusammenhang mit der Prognose bei Brustkrebserkrankungen stehen und wahrscheinlich durch Methylierung reguliert werden sind CDH3 (Paredes *et al.* 2005), die putativen

Tumorsuppressorgene TSC1 und TSC2 (Jiang *et al.* 2005), LATS1/LATS2 (Takahashi *et al.* 2005) und p16INK4a (Hui *et al.* 2000, Dominguez *et al.* 2003).

Mit PITX2 (*Paired-like* Homeodomäne Transkriptionsfaktor) wurde vor kurzem ein Gen identifiziert, dessen Promotormethylierung ein prognostischer Marker ist. Eine Analyse von 415 unbehandelten Patientinnen ergab, dass 86 % der Patientinnen mit niedriger Methylierung nach 10 Jahren rückfallfrei waren, gegenüber von nur 67 % in der Gruppe der Patientinnen mit hoher PITX2 Methylierung (Foekens *et al.* 2005).

3.4.1.2 Prädiktive Methylierungsmarker für eine Antihormontherapie

Neben der Eigenschaft als prognostischer Marker erlaubt PITX2 eine prädiktive Aussage über das Ansprechen von ER positiven, Lymphknoten-negativen Patientinnen auf eine Behandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen (Maier *et al.* 2004, Harbeck *et al.* 2005). Die meisten dieser Patientinnen würden nach momentan herrschenden Richtlinien neben der Hormontherapie auch eine Chemotherapie erhalten, obwohl eine Hormontherapie für den überwiegenden Teil von ihnen ausreichend wäre. PITX2 wurde als prädiktiver Biomarker in einer DNA Chipstudie mit zwei unabhängigen Populationen Tamoxifen-behandelter Patientinnen gefunden - 109 Patientinnenproben wurden zur Identifizierung und 236 zur Validierung des Markers verwendet (Maier *et al.* 2004). Anschließend wurden die Ergebnisse in einer weiteren Studie validiert. Dabei wurden insgesamt 422 Tamoxifen-behandelte, Lymphknoten-positive Patientinnen untersucht (Harbeck *et al.* 2005). Auch in dieser Validierungsstudie konnte die Eigenschaft von der PITX2 Promotormethylierung als prädiktiver Marker bestätigt werden: 98 % der Patientinnen mit niedriger PITX2 Methylierung waren nach 10 Jahren Rückfall-frei, verglichen mit 85 % ohne Rückfall in der Gruppe der Patientinnen mit hoher PITX2 Methylierung. Damit lieferte die PITX2 Methylierung signifikant zusätzliche Information zu den bekannten Faktoren wie *Grade*, Tumorgöße und Alter der Patientinnen (Harbeck *et al.* 2005). Diese Studien zur Methylierung von PITX2 in Brustkrebs stellen die z. Z. umfangreichsten Studien im Bereich von Methylierung bei Brustkrebs dar. Sie liefern einen signifikanten Beweis für die Eignung der PITX2 Promotormethylierung als prädiktiver Biomarker für das Ansprechen von Lymphknoten-negativen Patientinnen auf eine Behandlung mit Tamoxifen.

Die DNA Methylierung im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf eine Hormonbehandlung ist in einigen weiteren Studien beschrieben. Wie schon bei den prognostischen Markern wurden auch hier Gene untersucht, deren Eignung als prädiktive Marker bereits auf Ebene der mRNA oder des Proteins bewiesen war. Mehrere Gene des Östrogen-signalweges werden durch DNA Methylierung reguliert. Die bekanntesten Beispiele sind die Hormonrezeptoren selbst. Einige Publikationen beschreiben die abnormale Methylierung von ER in Brustkrebs (Lapidus *et al.* 1996 und 1998). DNA Methylierung fungiert als wichtiger negativer Regulator der ER Expression in Brustkrebs (Sasaki *et al.* 2003) aber die Promotorstruktur des Genes ist zu komplex und es existieren viele Transkriptvarianten, sodass eine Korrelation der Expression mit der Methylierung nicht trivial erscheint. Leider gibt es nur sehr wenige Studien, in denen direkt das Ansprechen einer Hormontherapie mit der Methylierung von Hormonrezeptorgenen korreliert wurde. Chang *et al.* (2005) z.B. führten eine Studie mit 34 Proben von Tamoxifen-resistenten Tumoren und 68 Kontrollproben durch, um den Zusammenhang der Resistenz mit der Methylierung der Hormonrezeptoren zu untersuchen. Neben dem als ER bezeichneten Östrogenrezeptor α (ER α) untersuchten sie mit ER β auch ein weiteres Mitglied der ER-

Familie. Methylierung von ER α wurde dabei in 22 % der Kontrolltumoren und 32 % der resistenten Tumoren gefunden. ER β war in 59 % der Kontrolltumoren und 24 % der resistenten Tumoren zu finden. Damit war ER β , nicht aber ER α signifikant unterschiedlich methyliert zwischen diesen beiden Gruppen (ER α , p-Wert = 0,261 und ER β , p-Wert = 0,001), für ER α war lediglich ein Trend erkennbar.

Widschwendter *et al.* (2004) fanden einen Zusammenhang der Methylierung von ER α und der Prognose adjuvant Tamoxifen-behandelter Patientinnen. Diese Patientinnen hatten entweder nur Tamoxifen, Tamoxifen und Chemotherapie, nur Chemotherapie oder keine adjuvante Behandlung erhalten. Hypermethylierung von ER α war mit einem besseren Ansprechen auf Tamoxifen assoziiert, was überraschend ist, da ER α Expression negativ mit der Methylierung korreliert (Sasaki *et al.* 2003). Durch die Vielzahl unterschiedlich behandelter Patientinnen ist in dieser Studie allerdings die Interpretation der Ergebnisse kompliziert, vor allem weil die Wahl der adjuvanten Therapie wahrscheinlich auf Ebene der ER α Expression basierte.

Zusätzlich zum Östrogenrezeptor selbst ist DNA Methylierung auch in anderen Genen der Östrogensignalkaskade zu finden. BRCA1 z.B., welches die ER Aktivität inhibiert (Rosen *et al.* 2003) ist oftmals durch Methylierung in sporadischen Brustkrebsfällen inaktiviert (Rice *et al.* 2000). Für *Cyclin D1*, welches in verschiedener Hinsicht in die Östrogensignalkaskade involviert ist (McMahon *et al.* 1999), ist die Regulation der Transkription durch DNA Methylierung bei Ratten beschrieben (Kitazawa *et al.* 1999). *Caveolin-1* wurde vor kurzem als Koaktivator des ER identifiziert (Schlegel *et al.* 1999 und 2001) und ist in Brustkrebs methyliert (Chen *et al.* 2004). Leu *et al.* (2004) zeigten sogar, dass ein Ausschalten der Östrogensignalkaskade zu einer epigenetischen Inaktivierung nachgelagerter Gene führt. Eine Langzeitbehandlung einer Brustkrebszelllinie mit Tamoxifen führte zu einem irreversiblen Verlust der Expression einiger nachgelagerter Gene (Badia *et al.* 2000). Dies könnte durch DNA Methylierung bedingt sein und einige dieser Gene könnten sich in Zukunft als wertvolle Biomarker erweisen.

Ein weiteres Östrogen-reguliertes Gen, für das Promotor Methylierung beschrieben ist, ist TFF1 (*Trefoil Factor 1*). TFF1 ist in ER-positiven Brustkrebstumoren exprimiert, nicht jedoch in normalem Brustepithel (Rio *et al.* 1987). Es enthält in seiner Promotorregion eine Bindestelle für den Östrogenrezeptor (Nunez *et al.* 1989) und seine Expression wird deswegen als Indikator für eine funktionierende Östrogensignalkaskade in diesen Tumoren angesehen. In Hormonrezeptor-positiven Tumoren ist fehlende TFF1 Expression mit einer erhöhten Unabhängigkeit von Hormonen und einer erhöhten Proliferation der Tumoren verbunden (Ruibal *et al.* 1999). Expression von TFF1 scheint sowohl ein prognostischer als auch ein prädiktiver Marker bei Brustkrebs zu sein: Foekens *et al.* (1990a und 1990b) beschreiben eine signifikant höhere Expression bei Brustkrebspatientinnen mit guter Prognose und Schwartz *et al.* (1991) zeigten, dass Patientinnen mit TFF1 Expression besser auf eine Hormontherapie reagieren als solche mit verminderter Expression. Die TFF1 Promotormethylierung korreliert mit der Expression des Gens (Martin *et al.* 1995 und 1997).

Kürzlich konnte mit PSAT1 (*Phosphoserinaminotransferase 1*) ein Gen identifiziert werden, dessen Methylierung ebenfalls als prädiktiver Marker für eine Tamoxifenbehandlung geeignet ist. Auch bei diesem Gen konnte wieder ein direkter Zusammenhang zwischen DNA Methylierung und Expression des Gens gefunden werden (Martens *et al.* 2005).

Biomarker, die eine Resistenz gegenüber Tamoxifen in ER-positiven Tumoren vorhersagen können, könnten sich bald als wertvolles Hilfsmittel für die Wahl einer alternativen Hormonbehandlung erweisen, z.B. der teuren Behandlung mit Aromataseinhibitoren.

3.4.1.3 Prädiktive Methylierungsmarker für weitere Therapieformen

Obwohl DNA Methylierung als prädiktiver Marker für verschiedene Chemotherapien in vielen verschiedenen Krebsarten beschrieben ist (Maier *et al.* 2005b), gibt es im Bereich des Brustkrebs neben den bisher genannten prädiktiven Biomarkern für eine Hormonbehandlung kaum weitere Marker für andere Formen der Chemotherapie. Allerdings gibt es auch hier potentielle Kandidaten, deren prädiktives Potenzial aus Expressionstudien bekannt ist. Der Promotor von PTEN beispielsweise ist oftmals in Brustkrebstumoren methyliert (Garcia *et al.* 2004). Hypermethylierung ist wiederum assoziiert mit dem Verlust der PTEN Expression dieses Genes. Es erscheint interessant, dass ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die Expression von PTEN in HER-2/neu positiven Tumoren das Ansprechen auf die Antikörpertherapie mit Herceptin[®] voraus sagen kann (Nagata *et al.* 2004).

3.4.1.4 Diagnostische Methylierungsmarker

Es sind bereits zahlreiche Gene bekannt, die in Krebs abnormal methyliert sind. Vor allem solche Gene, die in möglichst vielen Tumoren individueller Patientinnen methyliert und in gesundem Gewebe unmethyliert sind, eignen sich prinzipiell als diagnostische Marker für eine Krebsfrüherkennung, vor allem dann, wenn der Nachweis in Blut oder anderen leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten gelänge.

In allen bisher genannten Studien wurde die DNA Methylierung direkt in den Tumoren gemessen. Müller *et al.* (2004) wählten einen anderen Ansatz und analysierten mehrere Methylierungsmarker im Blut von Patientinnen vor der Operation. Sie fanden, dass DNA Methylierung des Östrogenrezeptors, von APC und von RASSF1A (*Ras association domain family 1*) mit dem Ausgang der Brustkrebserkrankung bei diesen Patientinnen korrelierte. Dabei ist nicht klar, ob es sich dabei auch um Marker handelt, die im Tumor selbst als prognostische Marker geeignet wären. Gerade die Methylierung von RASSF1A, welches zu 81-85 % der Brusttumoren methyliert ist (Shinozaki *et al.* 2005, Bae *et al.* 2004) könnte vielmehr ein diagnostischer Marker sein, der quantitativ eine Aussage über das Ausmaß der Erkrankung und damit der Prognose liefert. Nach einer Studie von Fiegl *et al.* (2005) ist das Vorhandensein von RASSF1A Methylierung im Blut ein Jahr nach der Operation ein Biomarker für eine schlechte Prognose. Auch dies könnte die These stützen, dass es sich hierbei um einen diagnostischen Marker handelt und dabei eher vorhandene Tumorzellen im Blut nachgewiesen wurden. Entsprechend würden diese vorhandenen Tumorzellen dann einen baldigen Rückfall prognostizieren. Hoque *et al.* (2006) wählten dann auch einen Ansatz, bei dem die Methylierung von RASSF1A und drei weiteren Genen (APC, GSTP1 und RARB) für die Frühdiagnose von Brustkrebs in Blutproben verwendet wurde. Sie untersuchten 97 Blutproben von Patientinnen mit Brustkrebs und 76 Kontrollpersonen. Sie wiesen bei 62 % der Brustkrebspatientinnen und 13 % der Kontrollpersonen Methylierung von mindestens einem der vier Gene im Blut nach. Generell ist RASSF1A wohl eines der meisten hinsichtlich Methylierung untersuchten Gene in allen Formen von Krebs, vor allem aber in Brustkrebs. Die meisten Studien zeigen übereinstimmend, dass dieses Gen in einem hohen Anteil der Tumoren methyliert ist und somit wohl einen guten diagnostischen Marker darstellt (Pfeiffer und Dammann 2005). Lesche *et al.* (2006) konnten in einer breit angelegten DNA Chip-Studie weitere in Brustkrebstumoren anormal methylierte Gene identifizieren. HS3ST2 (*heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2*),

LIMK1 (*LIM Kinase 1*), SLIT2 (*SLIT Homolog 2*) und SLITRK1 (*SLIT und NTRK-like family, member 1*) erwiesen sich dabei als Gene, die in vielen der 259 Tumorproben methyliert und in den meisten der 84 gutartigen Veränderungen und gesunden Brustgewebeproben nicht methyliert waren und somit potentielle Biomarker für eine Brustkrebsfrüherkennung darstellen.

3.5 Technologien zur Methylierungsanalyse

In Abhängigkeit von der zu beantwortenden klinischen Fragestellung bieten sich eine Vielzahl möglicher Methoden zur Analyse der DNA Methylierung an. Dabei kann zunächst grob zwischen globaler und sequenzspezifischer Methylierungsanalyse unterschieden werden. Für die Untersuchung der globalen Methylierung, also des Verhältnisses von Cytosin zu 5-Methylcytosin einer Probe, wird die DNA in Nukleotide gespalten und chromatographisch analysiert (z.B. mit HPLC oder CE) (Eick *et al.* 1983; Fraga *et al.* 2000; Annan *et al.* 1989; Friso *et al.* 2002; Stach *et al.* 2003; Wirtz *et al.* 2004). Die benötigten DNA-Mengen hängen vom Detektionssystem ab und schwanken von 2,5 µg (UV-Absorption) bis 100 ng (Fluoreszenz).

Bei den Methoden zur sequenzspezifischen DNA Methylierungsanalyse kann zwischen drei Hauptgruppen unterschieden werden, die auf der Verwendung von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen oder Antikörpern gegen Methylcytosin, bzw. auf einer vorhergehenden chemischen Modifikation der DNA (Bisulfitbehandlung) beruhen.

Methylierte DNA kann durch methylbindende Antikörper angereichert und anschließend z.B. durch DNA Chips oder PCR analysiert werden (Gebhard *et al.* 2006 und 2006a).

Eine Reihe von Restriktionsendonukleasen sind methylierungssensitiv, d.h. sie hydrolysieren die DNA nur dann, wenn das CpG in der Erkennungsstelle unmethyliert ist. Eine Ausnahme stellt die Endonuklease McrBC dar (Sutherland *et al.* 1992), welche methylierte DNA schneidet. Nach einer Inkubation der DNA Probe mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen ist die DNA methylierungsspezifisch fragmentiert. Diese methylierungsspezifische Fragmentierung wird in einer Reihe verschiedener weiterer Analysen ausgenutzt. Zur Untersuchung einzelner Gene kann diese fragmentierte DNA per PCR analysiert werden. Dabei werden die Primer so gewählt, dass zwischen den beiden Primern mindestens eine potentielle Schnittstelle für das Restriktionsenzym vorliegt. Die Amplifikation erfolgt nur dann, wenn die DNA methyliert vorliegt und folglich nicht hydrolysiert wurde (Fukuzawa *et al.* 2004). Zudem sind auch genomweite Analyse möglich. Diese beruhen prinzipiell darauf, dass die fragmentierte DNA genomweit amplifiziert wird, wobei wieder nur der Teil amplifiziert wird, der nicht hydrolysiert wurde und demzufolge methyliert war. Diese Amplifikationsprodukt kann dann weiter analysiert werden, z.B. durch Hybridisierung auf einen DNA Chip (Gonzalzo und Jones 1997; Toyota *et al.* 1999; Costello und Plass 2002; Feltus *et al.* 2003; Huang *et al.* 1999). Eine ähnliche Methode, allerdings zum Nachweis unmethylierter DNA ist das methylierungsspezifische digitale Karyotypisieren (MSKD). Hier wird die DNA zunächst wie bei den anderen Methoden methylierungssensitiv geschnitten und an diese Schnittstellen Biotin-Linker ligiert. Diese aus unmethylierten CpG Positionen generierten Fragmente werden dann aufgereinigt, durch zwei weitere Restriktionsenzyme verkürzt, kloniert und sequenziert (Hu *et al.* 2005). Nachteile dieser Methoden sind, dass zum einen nur Sequenzen analysiert werden können, die entsprechende Restriktionsschnittstellen enthalten und zum anderen eine sehr große Menge DNA (> 1µg) für die Analyse benötigt wird.

Die von Frommer *et al.* (1992) eingeführte Bisulfitbehandlung der DNA hat die Analyse der DNA-Methylierung revolutioniert. Cytosin und Methylcytosin besitzen die gleichen Basenpaarungseigenschaften und können dadurch nicht mit Methoden untersucht werden, die auf Amplifikation oder Hybridisierung beruhen. Die Bisulfitbehandlung basiert auf der spezifischen Desaminierung des Cytosins zu Uracil, wo hingegen Methylcytosin unbeeinflusst bleibt. Dabei erfolgt zunächst eine nukleophile Addition einer Sulfongruppe an C6 des Cytosins. Diese Reaktion ist bei 5-Methylcytosin wahrscheinlich aus sterischen Gründen ungünstig. Anschließend findet eine hydrolytische Desaminierung des 6-Sulfonylcytosins statt, es entsteht 6-Sulfonuracil. Dieses desulfoniert dann unter alkalischen Bedingungen zu Uracil. Damit wird durch die Bisulfitkonvertierung quasi ein C/U Polymorphismus generiert, der im Gegensatz zu dem 5-meC/C Polymorphismus mit herkömmlichen molekularbiologischen Methoden untersucht werden kann. Dazu wird in den meisten Fällen zunächst eine konventionelle PCR durchgeführt. Die wichtigsten Verfahren dabei sind:

- **COBRA (Combined Bisulfite Restriction Assay):** Bisulfit-konvertierte DNA wird mit methylierungsunspezifischen Primern amplifiziert, d.h. es werden Primer verwendet, die nicht überlappend mit CpGs sind und mit denen somit ursprünglich methylierte, als auch ursprünglich unmethylierte DNA gleichermaßen amplifiziert werden kann. Die PCR-Produkte werden anschließend mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert. Die Erkennungssequenz enthält dabei CpG-Positionen, die je nach ursprünglichem Methylierungsstatus als TG oder CG im PCR-Produkt vorliegen. Die geschnittenen PCR-Produkte werden dann gelelektrophoretisch analysiert. Eine Auswertung der Bandenstärken erlaubt eine semiquantitative Aussage über den Methylierungsstatus der untersuchten CpG-Positionen (Xiong und Laird 1997).
- **Sequenzierung:** Die Sequenzierung von PCR-Produkten aus Bisulfit-konvertierter DNA kann auf zwei Arten erfolgen. Bei der direkten Sequenzierung eines PCR Produktes einer Probe resultieren an den CpG Positionen entsprechend des ursprünglichen Methylierungszustandes eine Mischung aus TG und CG. Aus dem Verhältnis von T zu G kann dann ein quantitativer Methylierungswert berechnet werden. (Clark *et al.* 1994, Grunau *et al.* 2001, Lewin *et al.* 2004). Daneben besteht auch die Möglichkeit das PCR Produkt der Probe zu klonieren und eine entsprechend große Zahl an Klonen zu sequenzieren (Klonsequenzierung), über deren Methylierung dann eine quantitative Aussage über die Methylierung in der ursprünglichen Probe getroffen werden kann. Neben der klassischen Sequenziermethode nach Sanger *et al.* (1977) kommen dabei auch vermehrt Verfahren zum Einsatz die nach dem Prinzip „Sequenzierung durch Synthese“ beruhen. Bei dieser Pyrosequenziermethode wird in Abhängigkeit von der eingebauten Base biochemisch Licht emittiert (Colella *et al.* 2003).
- **Methylierungsspezifische PCR (MSP).** Die gerichtete Amplifikation kann mittels PCR-Primer erfolgen, die spezifisch an methylierte DNA binden (Herman *et al.* 1996). Die Primer überlappen dabei mit mindestens einer CpG-Position. Ähnlich zu einer allelspezifischen PCR werden nur methylierte Sequenzen angereichert. Die Primer können auch so entworfen werden, dass ausschließlich nicht methylierte DNA amplifiziert wird (Lo *et al.* 1999). MSP ist geeignet, methylierte DNA vor einem hohen Hintergrund unmethylierter DNA nachzuweisen und ist dadurch als Technologie für die Krebsfrüherkennung geeignet.
- **MS-SNuPE (Methylation-specific Single Nucleotide Primer Extension).** Ein Primer wird so gewählt, dass er unmittelbar vor einer CpG Position liegt und wird dann um ein einziges Nukleotid verlängert. Je nach ursprünglichem Methylierung handelt es sich dabei um ein C oder T oder ein entsprechendes Gemisch dieser beiden. Die verlängerten Primer können dann durch Radioaktivität, HPLC, CE oder MS analysiert

werden (Gonzalzo und Jones 1997 El-Maarri *et al.* 2002, Uhlmann *et al.* 2002 Tost *et al.* 2003). Als Templat für diese Methode dient PCR amplifizierte Bisulfit-DNA.

- DNA-Chip: Die parallele Analyse der Methylierung verschiedener Gene ist durch die DNA-Chip-Analyse von Fluoreszenz-markierten PCR-Amplifikaten von Bisulfit-DNA möglich (Adorjan *et al.* 2002, Schumacher *et al.* 2006). Dabei befinden sich auf einer Oberfläche Oligonukleotide, die spezifisch an PCR Produkte von methylierter und unmethylierter DNA binden. Das PCR Produkt der Probe wird gegen diese Oligonukleotide hybridisiert und das Verhältnis der Hybridisierungsintensitäten mit einem Oligonukleotid für unmethylierte und einem für methylierte DNA gebildet.
- HM Assay (**Heavy Methyl Assay**): Bei dem HM Assay handelt es sich um eine methylierungsspezifische Amplifikation mit methylierungsunspezifischen Primern. Die Amplifikation entweder der methylierten oder der unmethylierten DNA wird dabei durch Blocker-Nukleotide gehemmt. Dies sind Oligonukleotide, die so modifiziert sind, dass sie nicht verlängert werden können. Ihre Zielsequenz überlappt mit mehreren CpGs, sodass die Bindung an die DNA methylierungsspezifisch erfolgt. Gleichzeitig überlappt ihre Bindungsstelle auch mit einer der beiden Primerbindungsstellen, sodass diese nicht binden können und die Amplifikation blockiert wird. Wie die MSP Technologie erlaubt auch die HM Technologie den hochsensitiven Nachweis kleinster Mengen methylierter DNA vor einem hohen Hintergrund unmethylierter DNA und ist somit als Technologie zur Früherkennung von Tumor-DNA in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut) geeignet (Cottrell *et al.* 2004).

Seit der Entwicklung von Real-Time PCR Systemen finden diese auch im Bereich der DNA Methylierung Verwendung. In einer Real-Time PCR wird, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Anzahl der entstandenen Kopien nach jedem PCR Zyklus gemessen. Die Messung kann mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe, wie z.B. SYBR-Green, erfolgen. SYBR-Green bindet nur an doppelsträngige DNA und ändert dabei sein Emissionsmaximum, sodass die Zunahme von doppelsträngiger DNA verfolgt werden kann. Mit Fluoreszenz-markierten DNA-Sonden (Detektionssonden) werden dagegen Signale erzeugt, die auf der sequenzspezifischen Bindung an die Ziel-DNA beruhen. Während der PCR wird der Zyklus bestimmt, bei dem die Menge des PCR Produktes erstmals einen Schwellenwert (*Threshold*) überschreitet. Dieser sogenannte CT (**Cycle Threshold**) korreliert antiproportional mit dem Logarithmus der eingesetzten Templatmenge, sodass diese über den CT berechnet werden kann.

Prinzipiell finden sowohl methylierungsspezifische, als auch methylierungsunspezifische PCRs Anwendung im Real-Time PCR Format. Dies ermöglicht eine höchst zuverlässige quantitative Messung der DNA Methylierung, die mit einer konventionellen PCR nicht möglich ist (Cottrell *et al.* 2004, Eads *et al.* 2000, Cottrell und Laird 2003). Eine Besonderheit bei den Real-Time PCR basierten Assayformaten bildet der QM Assay (**Quantitative Methylation Assay**). Hierbei wird die DNA mit methylierungsunspezifischen Primern amplifiziert. Die Detektion sowohl von methylierter, als auch von unmethylierter DNA erfolgt dann simultan durch zwei Detektionssonden, die spezifisch für jeweils einen der Methylierungszustände sind. Beide Detektionssonden besitzen unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe und können unabhängig voneinander gemessen werden. Über das Verhältnis der CTs der beiden Detektionssonden kann dann das Verhältnis von methylierter DNA zu unmethylierter DNA berechnet werden (Lehmann *et al.* 2002, Kluth *et al.* 2005).

Eine umfangreiche Übersicht aller Methoden zur Analyse von Methylcytosin geben Oakeley (1999), Fraga und Esteller (2002), Laird (2003), sowie Schumacher und Petronis (2006).

3.6 Heterogenität von Tumoren

Histomorphologisch stellen sich Tumore als äußerst heterogene Gewebe dar. Die Tumorzellen sind im Zellverband umgeben von Stroma-, Fett- und normalen Epithelzellen. Daneben infiltrieren während einer Immunabwehr häufig Lymphozyten den Tumor (Tumor-infiltrierende Lymphozyten, TIL). Liegt der Tumor nahe am Muskelgewebe, so werden auch davon Teile während der Operation entfernt und befinden sich in der Probe, die nach der Operation weiter untersucht wird. Es ist hinlänglich bekannt, dass sich die Transkriptome und Proteome verschiedener Zelltypen unterscheiden. Gerade im Fall von Krebs sind durchaus auch Unterschiede des Genoms zwischen den verschiedenen Zelltypen keine Seltenheit. Die DNA Methylierung ist ein wichtiger Bestandteil der Zelldifferenzierung (Riggs 1975, Bird 1986) und Unterschiede in der Methylierung verschiedener Zelltypen sind in zahlreichen Experimenten mit Zelllinien beschrieben. Kürzlich ist die Methylierung der Chromosomen 6, 21 und 22 in 12 verschiedenen Gewebetypen veröffentlicht worden (Eckhardt *et al.* 2006). Dort wurde gefunden, dass ca. 18 % der untersuchten CpG Inseln in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich methyliert sind. Diese Gewebheterogenität hat solange keine Auswirkung auf das Analyseergebnis eines Biomarkers in einer Probe, solange die Gewebemorphologie während der Analyse erhalten bleiben. Die meisten etablierten Tests für Biomarker basieren nicht zuletzt aus diesem Grund auf Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) oder immunohistochemischen (IHC) Verfahren, bei dem die Detektion des Analyten im Gewebedünnschnitt direkt in seiner natürlichen Umgebung stattfindet. Diese Verfahren haben aber den Nachteil, dass in der Regel nur eine semiquantitative Aussage möglich ist. Zusätzlich lassen sich einige Biomarker nur in Dünnschnitten von gefrorenem Gewebe untersuchen, fixierte Gewebe sind für diese Biomarker nicht zugänglich. Für die Analyse von DNA Methylierung ist ein *in situ* Verfahren zwar beschrieben (Nouvo *et al.* 2004), wurde aber nicht wieder reproduziert. Daher muss die DNA vor der Analyse aus den Geweben isoliert werden. Die Zusammensetzung der DNA in diesem Extrakt spiegelt nach dieser Isolation natürlich auch die Zusammensetzung des Gewebes wider. Methylierungsinformation, die spezifisch für bestimmte Zellen des Tumors sind, können so verloren gehen, da sie durch den hohen Anteil anderen Zellen maskiert werden. Dies ist offensichtlich gerade dann problematisch, wenn der genaue Anteil an methylierter DNA für die Aussagekraft eines Biomarkers wichtig ist. Zudem ist es so nicht möglich, den Ursprung der methylierten DNA auf bestimmte Zellen zurückzuführen und Information für das Verständnis der Biologie des Biomarkers geht verloren.

Die Laser Mikrodisektion (LMD, Emmert-Buck *et al.* 1996) ist eine Technologie, mit der reine Populationen von Zellen für nachfolgende Untersuchungen aus Gewebeschnitten gewonnen werden können. Unter einem Mikroskop werden die interessanten Zellen mit einem eingekoppelten Laser ausgeschnitten und aufgefangen. Seit der Entwicklung der LMD wurden eine Vielzahl von Studien aus den Bereichen der Transkriptom- Genom- und Proteombrustkrebsforschung publiziert (Fuller *et al.* 2003). So konnte mittels LMD die Analysen von LOH (*Loss of Heterozygosity*) Markern vereinfacht werden, indem entartete Epithelzellen von umgebenden Stroma und anderen Zellen isoliert wurden (Jones *et al.* 2000, Bertheau *et al.* 2001, Hoang *et al.* 2001, Kurose *et al.* 2001, Oesterreich *et al.* 2001, Charafe-Jauffret *et al.* 2002, Bell *et al.* 2002, Kuijper *et al.* 2002, Cavalli *et al.* 2004). Bertheau *et al.* (2001) schätzt, dass die Verwendung von LMD zur LOH Analyse die Sensitivität fast verdoppelt und dass ohne LMD mindestens ein Drittel der LOH in Brustkrebstumoren nicht gefunden würden. Einen weiteren Beweis für den Wert der LMD Technologie liefern

die Ergebnisse von Kurose *et al.* (2001) und Cavalli *et al.* (2004) die fanden, dass LOH nicht nur in den entarteten Tumorzellen, sondern auch im anliegenden Stroma und nicht-tumorösen Epithelgewebe vorkommt. Daneben hat sich LMD auch für CGH- (*Comparative Genome Hybridization*), SNP- und Mutationsanalysen bewährt (Aubele *et al.* 1999, Aubele *et al.* 2000, Daigo *et al.* 2001, Schmidt-Kittler *et al.* 2003, Li *et al.* 2006). Am weitesten verbreitet ist die LMD Technologie bisher noch bei der Analyse des Transkriptoms. In einigen Studien wurde LMD mit RT PCR (*Reverse Transcription PCR*) kombiniert, um die Expression bekannter Gene näher zu charakterisieren (Hayes *et al.* 2000, Glockner *et al.* 2000, Lehmann *et al.* 2000, Ge *et al.* 2002, Suzuki *et al.* 2005). Der größte Wert für die Identifizierung und Charakterisierung von Biomarkern steckt dabei jedoch in der Kombination aus LMD und Hochdurchsatz RNA-Chip Technologie. Gerade in Verbindung mit einer Voramplifikation der RNA (Wang *et al.* 2000, Baugh *et al.* 2001) lassen sich genaue Expressionsprofile der im Tumor enthaltenen Komponenten erstellen und sich so wertvolle Erkenntnisse über die Biologie des Brustkrebs gewinnen (Elkahloun *et al.* 2002, Sgroi *et al.* 1999, Luzzi *et al.* 2003, Zhu *et al.* 2003, Ma *et al.* 2003, Sugiyama *et al.* 2002, Mimori *et al.* 2005, Yang *et al.* 2006). Mit der Proteomforschung hat die LMD Technologie inzwischen auch Einzug in die letzte Ebene des Dogmas der Molekularbiologie erhalten. Allerdings ist hier die Anwendbarkeit der LMD vor allem noch dadurch begrenzt, dass für die Analysen des Proteoms in der Regel eine große Menge an Proteinen benötigt wird. Trotzdem sind einige Studien veröffentlicht, in denen LMD mit den Standardanalyseverfahren der Proteinanalysen erfolgreich gekoppelt wurde (Somari *et al.* 2005, Wulfschle *et al.* 2001, Wulfschle *et al.* 2002, Bichsel *et al.* 2001, Craven *et al.* 2002).

Für eine Analyse der DNA Methylierung wurde die LMD Technologie bisher wenig verwendet. Wie schon bei der Proteomforschung liegt hier der Hauptgrund wieder in der Verfügbarkeit von genügend Material für die Analyse. Zur Zeit gibt es keine Methoden um das gesamte Genom so zu amplifizieren, dass die DNA-Methylierung erhalten bliebe und genügend Material für eine Analyse generiert würde. Lediglich über den Umweg des Erzeugens von Zelllinien kann genügend DNA generiert werden, um auch aufwendigere Analysen durchzuführen. Dadurch erweist sich die Analyse des Methyloms als bedeutend schwieriger im Vergleich zur Analyse des Genoms und des Transkriptoms. Entsprechend ist bis heute nur wenig über DNA-Methylierung in den verschiedenen Komponenten eines Brustkrebstumors bekannt. Hu *et al.* (2005) erzeugten primäre Zelllinien aus Epithel-, Myoepithel- und Stromazellen von Tumoren und nicht betroffenen Bereichen. Mit einer genomweiten MSDK Analyse fanden sie sowohl Methylierungsunterschiede zwischen Myoepithel- und Epithelzellen innerhalb des Tumors, zwischen Epithelzellen des Tumors und des gesunden Gewebes und zwischen Myoepithelzellen des Tumors und des gesunden Gewebes. Außerdem fanden sie Gene, die im Stroma des Tumors eine andere Methylierung aufwiesen, als im Stroma von gesundem Gewebe. Die Methylierungsunterschiede zwischen den Epithelzellen des Tumors und den Epithelzellen des gesunden Gewebes sind dabei nicht überraschend, dagegen zeigen die Methylierungsunterschiede zwischen den Stromazellen des Tumors und des gesunden Gewebes, dass auch diese morphologisch normal erscheinenden Stromazellen aus dem Tumor eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen könnten. In einer DNA-Chipstudie konnte für die Methylierung des Tumorsuppressorgens RASSF1A gefunden werden, dass sich nicht nur die Epithelzellen des Tumors von den Epithelzellen des gesunden Gewebes unterscheiden, sondern dass „normale“ Epithelzellen in bis zu 4 cm Entfernung zum Tumor noch abnormale Methylierung zeigten (Yan *et al.* 2006). Dies könnte ein Hinweis auf einen Feldeffekt sein, durch den die Methylierung in dem an den Tumor angrenzenden Gewebe beeinflusst wird. Ein vergleichbarer Effekt konnte

in einer Studie für das Gen Stratifin beobachtet werden (Umbricht *et al.* 2001), welches ebenfalls in „normalen“ Epithelzellen aus Tumornähe, nicht jedoch in Epithelzellen von Frauen ohne Brustkrebs methyliert ist. Dagegen fanden Lehmann *et al.* (2002), dass RASSF1A zwar in Tumorepithelzellen methyliert ist, nicht jedoch in Stroma und „normalen“ Epithelzellen von Krebspatientinnen. Di Vinci *et al.* (2005) fanden, dass sich die Methylierung des auf Expressionsebene als prognostischen Biomarkers bekannten Gens p16INK4a (Hui *et al.* 2000, Dominguez *et al.* 2003) nicht zwischen Stroma, „normalen“ Epithelzellen des Tumor-angrenzenden Gewebes und Tumorepithelzellen unterscheidet. Da in dieser Studie auch keine Korrelation von Methylierung mit der Expression gefunden wurde, argumentieren die Autoren, dass p16INK4a Methylierung in keinem Zusammenhang mit der Karzinogenese steht. Allerdings könnte dieses Ergebnis auch eine Bestätigung des bereits beschriebenen Feldeffektes darstellen.

Zusätzlich zu den Methylierungsunterschieden der verschiedenen Zelltypen in einem Tumor wurde die LMD Technologie auch zur Analyse der Methylierung von Tumorepithelzellen aus verschiedenen Entwicklungsstadien des Tumors verwendet. Lehmann *et al.* (2002) fanden, dass RASSF1A bereits in den als Krebsvorstufe angenommenen Hyperplasien verbreitet methyliert ist. Gleiches wurde für Stratifin gefunden (Umbricht *et al.* 2001). Dagegen ist Cyclin D2 nicht in Hyperplasien, jedoch in DCIS methyliert und die Methylierung nimmt mit zunehmenden *Grade* des Tumors zu (Lehmann *et al.* 2002).

Neben diesen Studien sind eine Reihe weitere Arbeiten publiziert, in denen die Methylierung einzelner Gene in verschiedenen Tumorkomponenten aus anderen Krebsformen, vor allem Prostatakrebs mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen beschrieben ist. In Prostatatumoren beispielsweise ist RASSF1A in Tumorepithelzellen methyliert, nicht jedoch in „normalen“ Epithelzellen aus anliegendem Gewebe (Greenspan *et al.* 2006). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Lehmann *et al.* (2002) bei Brustkrebs überein, nicht jedoch mit Yan *et al.* (2006) und widerspricht der Theorie eines Feldeffektes. Für einen möglichen Feldeffekt sprechen zwei weitere Studien über die Methylierung von GSTP1. Zwar finden Nakayama *et al.* (2003) keine Methylierung in „normalen“ Epithelzellen des umliegenden Gewebes und nur in den Tumorepithelzellen, jedoch zeigen Hanson *et al.* (2006) und Rodriguez-Canales *et al.* (2007), dass Methylierung von GSTP1 auch im Stroma des Tumors zu finden ist.

3.7 Ziel der Arbeit

Ein Bestandteil dieser Arbeit war die Entwicklung einer Strategie zur Identifizierung neuer Methylierungsbiomarker. Dazu sollten Gene, die entweder biologisch in Zusammenhang mit bekannten Biomarkern oder im Zusammenhang mit Krebs im allgemeinen stehen, geeignet selektiert werden und auf ihr Potenzial als Biomarker getestet werden. Daneben sollte im Rahmen dieser Arbeit der als prognostisch und prädiktiv bekannte Biomarker PITX2 näher charakterisiert werden. PITX2 ist ein komplexes Gen mit mehreren Transkriptvarianten und CpG-Inseln. Um das prognostische und prädiktive Potenzial dieses Biomarkers zu erhöhen sollten weitere Regionen des Gens untersucht werden, um Regionen zu identifizieren, die eventuell informativer als die bisher analysierten sind.

Die bisher veröffentlichten Arbeiten über die DNA Methylierung von Biomarkern in verschiedenen Komponenten und Zelltypen innerhalb eines Tumors, bzw. im anliegenden Gewebe zeigen, dass es sich dabei um einen sehr komplexen biologische Zusammenhang handeln könnte. Um beispielsweise die Frage

nach einem möglichen Feldeffekt aufklären zu können, sind quantitative Methoden notwendig, die es erlauben auch kleinste Gewebemengen zu analysieren, um sich so ein möglichst genaues Bild über die Verteilung der Methylierung innerhalb eines Tumors bilden zu können. Die bisher verwendeten Methoden erlauben entweder nur eine qualitative Aussage oder benötigen viel Material (in der Regel mehr als 1000 Zellen) für eine akkurate Bestimmung der Methylierung eines einzigen Biomarkers. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die Methylierung vieler Biomarker auch in kleinsten Mengen von mikrodisezierten Zellen mit hoher Akkuranz und Zuverlässigkeit zu analysieren. Mit einer solchen Methode soll dann weiter die Methylierung der prognostischen, prädiktiven bzw. diagnostischen Biomarker PITX2, uPA, TFF1, RASSF1A, LIMK1, SLIT2, SLITRK1 und HS3ST2 in den verschiedenen Komponenten von Brustkrebstumoren untersucht werden. Das Ergebnis dieser Analyse sollte einen Hinweis darauf geben, wie ein möglicher prognostischer, prädiktiver oder diagnostischer Test, der auf der Analyse des Gesamttumors basiert, von dessen Zusammensetzung beeinflusst wird. Zudem sollen die Ergebnisse wichtige Information über das biologische Verständnis dieser Biomarker liefern.

4 Material und Methoden

4.1 Probenpräparation

4.1.1 Herstellung von histologischen Dünnschnitten und Mikrodissektion

Für die Mikrodissektion von Zellen wurden zunächst Dünnschnitte von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Tumoren angefertigt (siehe 4.1.1.1). Diese wurden anschließend histologisch gefärbt (siehe 4.1.1.2) und dann die entsprechenden Gewebebereiche mikrodisseziert (siehe 4.1.1.3).

4.1.1.1 Herstellung von Dünnschnitten

Zur Herstellung von Gewebedünnschnitten wurden die verwendeten Paraffingewebeblöcke mit dem Rotationsmikrotom 2035 Biocut (Leica Microsystems, D) geschnitten. Je nach weiterer Verwendung wurden 2 µm, 3 µm und 5 µm Schnitte erzeugt. Für die Mikrodissektion wurden nur 3 µm und 5 µm Schnitte verwendet. 2 µm Schnitte wurden für eine spätere visuelle Begutachtung der mikrodissezierten Areale angefertigt (Referenzschnitte). Schnitte, die für die Mikrodissektion gedacht waren, wurden auf Glasobjektträger aufgebracht, die mit einer PEN-Membran beschichtet waren (Leica Microsystems, D), wohingegen die Schnitte für die optische Begutachtung auf herkömmliche Objektträger aufgebracht wurden. Nach dem Aufbringen der Dünnschnitte auf die Glasobjektträger wurden diese über Nacht bei 50 °C in einem Inkubator INB 200 (Mettler, D) getrocknet.

4.1.1.2 Histologische Färbung

Alle Dünnschnitte wurden histochemisch gefärbt. Dabei wurden Schnitte, die nur für eine visuelle Begutachtung gedacht waren, mit einer klassischen HE (Hämalaun und Eosin) Färbung angefärbt. Schnitte, die mikrodisseziert wurden, wurden nur leicht mit Hämalaun gefärbt.

Vor der Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger mit den Schnitten 15 min in einem Xylobad (Mallinckrodt Baker, NL) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in einer graduell absteigenden wässrigen Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 %, 0 %) rehydriert, bevor sie gefärbt wurden. Die leichte Hämalaunfärbung der Schnitte für die Mikrodissektion wurde durchgeführt, indem die rehydrierten Schnitte 75 s in die Hämalaunlösung (sauer nach Mayer, Hollborn und Söhne, D) getaucht wurden. Anschließend wurden diese Schnitte 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und in einer aufsteigenden wässrigen Ethanolreihe (0 %, 70 % und 80 %) dehydriert und abschließend getrocknet. Für die klassische H&E Färbung der Referenzschnitte wurde diese 7 min in der Hämalaunlösung inkubiert, 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und 90 s in eine Eosin Lösung (0,67 % Eosin [Waldeck Division Chroma, D], 47 % Ethanol, 10 Tropfen / 100 ml Eisessig [Waldeck Division Chroma, D]) getaucht.

Nach dem Färben wurden die Referenzschnitte in einer aufsteigende wässrigen Ethanolreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 %) dehydriert, in Xylol getaucht und anschließend getrocknet, bevor dann ein Objektgläschen mittels Eukitt® (Fluka Chemie, CH) aufgebracht wurde.

4.1.1.3 Mikrodissektion

Die Mikrodissektion der relevanten Areale wurde mit dem Mikrodissektionssystem LMD6000 (Leica Microsystems, D) durchgeführt. Die mikrodissezierten Areale wurden in den mit 25 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 % [v/v] Tween 20 [Sigma-Aldrich, USA], 10 ng/µl poly-dA [Roche, D], 3 g/l Proteinase K [Carl Roth, D]) gefüllten Deckeln von 500 µl Reaktionsgefäßen (Leica Microsystems, D) aufgefangen. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und das Probenmaterial auf den Boden des Reaktionsgefäßes zentrifugiert (10 s bei 5000 g).

Neben der Mikrodissektion wurden auch einige Proben makrodisseziert. Dazu wurden die entsprechenden Areale auf dem membranbeschichteten Objektträger mit einer sterilen Skalpellklinge ausgeschnitten und in 500 µl PCR Reaktionsgefäße (Eppendorf, D) überführt.

4.1.2 Probenlyse und DNA-Extraktion

Gewebeproben von Patienten wurden durch eine Proteinase K Behandlung aufgeschlossen und anschließend entweder extrahiert oder direkt weiter verwendet. Dabei wurden für gefrorenes Frischgewebe (4.1.2.1), ganze Dünnschnitte von fixiertem Gewebe (4.1.2.2) und mikrodissezierte Proben (4.1.2.3) unterschiedliche Protokolle verwendet. Zusätzlich wurde eine Referenz DNA aus einem Gemisch von verschiedenen Geweben hergestellt (4.1.2.4).

4.1.2.1 Gewebelyse und DNA-Extraktion von gefrorenem Frischgewebe

Die Lyse von gefrorenem Frischgewebe und die anschließende Extraktion der DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, D) durchgeführt. Dabei wurde das *Tissue Protocol* (siehe Kit-Handbuch) verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mit 60 µl vorgewärmten (40 °C) Puffer AE (Qiagen, D).

4.1.2.2 Lyse und Extraktion von Dünnschnitten fixierten Gewebes

Zur Extraktion der DNA aus ganzen Dünnschnitten von Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe wurden diese Dünnschnitte zunächst in 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, D) überführt, welche anschließend 5 min bei 16000 g zentrifugiert wurden. Nach Zugabe von 190 µl Lysepuffer (50 mM Tris-HCl,

pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,5 % [v/v] Tween 20 [Sigma-Aldrich, USA]) wurden diese Proben 10 min bei 65 °C und 1000 rpm im Thermomixer (Eppendorf, D) inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Thermomixer auf 50 °C und 1400 rpm umgestellt und die Proben so lange inkubiert, bis sie auf 50 °C herunter gekühlt waren. Nun wurden 20 µl einer wässrigen Proteinase K (Carl Roth, D) Lösung (3 g/l) hinzu gegeben, die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert und dann 48 Stunden bei 60 °C und 1000 rpm im Thermomixer (Eppendorf, D) inkubiert. Abschließend wurde die Proteinase K 20 min bei 95 °C inaktiviert.

Das so gewonnene Lysat wurde anschließend entweder direkt bisulfitiert (4.2.1) oder vorher extrahiert. Dabei wurde die Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, D) entsprechend dem Handbuch durchgeführt. Die Elution der DNA erfolgte mit 2 x 60 µl Puffer EB (Qiagen, D).

4.1.2.3 Lyse mikrodissasierter Proben

Mikrodissasiierte Proben wurden im direkten Anschluß an die Mikrodissasiiation zunächst 8 h bei 60 °C in einem Mastercycler (Eppendorf, D) inkubiert. Danach wurden 2 µl einer wässrigen Proteinase K (Carl Roth, D) Lösung (300 g/l) dazu gegeben und die Proben vorsichtig gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden dann kurz zentrifugiert und weitere 4 h bei 60 °C im Mastercycler (Eppendorf, D) inkubiert. Die nun lysierten Proben wurden dann ohne Zeitverzögerung bisulfitiert (4.2.3).

4.1.2.4 Herstellung einer Referenz FFPET-DNA

Für Optimierungsexperimente wurde eine repräsentative DNA-Mischung aus FFPET Geweben hergestellt. Verwendet wurden dazu 28 verschiedene PET-Proben, davon vier Brust-, zwölf Mandel- und zwölf Gallenblasengewebe.

Die fixierten Gewebe wurden mit Hilfe einer Rasierklinge grob von dem überständigen Paraffin befreit und dann in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Carl Roth, D) überführt. Dort wurden sie mit Xylol bedeckt, kurz gevortext und dann eine Stunde inkubiert. Das Xylol wurde dekantiert und diese Prozedur einmal wiederholt. Reste des Xylols wurden durch dreimaliges Waschen mit Ethanol entfernt. Anschließend wurde das Gewebe luftgetrocknet, bis kein Ethanol mehr sichtbar war. Das getrocknete Gewebe wurde mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten, in flüssigem Stickstoff gefroren und im gefrorenen Zustand mit Mörser und Pistill zerkleinert. Das pulverisierte Gewebe (ca. 2 g) wurde auf zwei 15 ml Zentrifugationsröhrchen (Carl Roth, D) verteilt, zu jedem Aliquot wurden 10 ml Lysepuffer (Zusammensetzung siehe 4.1.2.2) zugegeben und 5 min bei 100°C im Wasserbad inkubiert. Nach dem Abkühlen der beiden Gewebesuspensionen auf unter 50 °C erfolgte die Zugabe von je 1 ml Proteinase K-Lösung (Carl Roth, D, 20 g/l) und die 24-stündige Inkubation bei 40°C im Wasserbad. Danach wurde erneut 1 ml der Proteinase K-Lösung zugegeben und weitere 19 h bei 40 °C inkubiert.

Die wässrigen Überstände beider Ansätze wurden in einem neuen 50 ml Zentrifugationsröhrchen vereint. Zu den noch unverdauten Resten wurden 4 ml des Lysepuffers und 0,5 ml Proteinase K Lösung gegeben und bei 60 °C und unter Schütteln (1000 rpm) über Nacht inkubiert. Zu dem vereinten Überstand wurde 1 ml

Proteinase K Lösung (20 mg/ml) gegeben und dieses dann ebenfalls bei 60 °C über Nacht inkubiert. Alle Lysate wurden vereint und die Proteinase K 10 min bei 100 °C im Wasserbad inaktiviert. Aus dieser Prozedur resultierten etwa 33 ml Lysat (61 mg Gewebe / ml), welches aliquotiert und bei -80°C gelagert wurden.

Dieses Lysat wurde sowohl mit als auch ohne anschließende Extraktion weiter verwendet. Für eine Extraktion wurde entweder das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, D) oder eine Phenol-Chloroform-Methode verwendet. Die Extraktion mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, D) erfolgte entsprechend dem Handbuch (*Tissue Protocol*). Dabei erfolgte die Elution der DNA von der Säule mit 100 µl Wasser. Bei der Phenol-Chloroform Extraktion wurde das Lysat in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, D) im Verhältnis 1:5 mit Wasser verdünnt und dann mit einem Volumenäquivalent einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Mischung (25:24:1, AppliChem, D) versetzt. Dieses Gemisch wurde gevortext und dann 10 min bei 1700 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und diese Extraktionsprozedur einmal wiederholt. Zur Fällung der DNA aus der wässrigen Phase wurde ein halbes Volumenäquivalent einer 7,5 M Ammoniumacetat Lösung und zwei Volumenäquivalente Ethanol zugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und dann 2 min bei 1700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 1 ml 70 % igem wässrigem Ethanol gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde dann bei Raumtemperatur und geöffnetem Reaktionsgefäßdeckel getrocknet und anschließend in 50 µl Wasser gelöst.

4.1.3 Herstellung von DNA-Standards

DNA Standards wurden aus Mischungen von unmethylierter und methylierter DNA hergestellt. Unmethylierte DNA wurde nach dem Prinzip der multiplen Verdrängungsamplifikation (Dean *et al.* 2002) unter Verwendung des GenomiPhi[®] DNA Amplification Kit (GE Healthcare, CT, USA) entsprechend der Empfehlung des Herstellers hergestellt.

Künstlich methylierte DNA wurde hergestellt, indem die zuvor hergestellte unmethylierte DNA enzymatisch durch die Methyltransferase Sss1 methyliert wurde. Die Methylierung der DNA fand in einem Volumen von 250 µl folgender Zusammensetzung statt: 10 µg unmethylierte DNA, 1,24 µl SAM (New England Biolabs, USA), 40 U Sss1 Methylase (New England Biolabs, USA) und 1 x NE-Puffer 2 (New England Biolabs, USA). Dieses Reaktionsgemisch wurde 24 Stunden bei 37 °C im Thermomixer (Eppendorf, D) inkubiert. Nach 8 Stunden Inkubation wurden weitere 40 U Sss1 Methylase und 1,24 µl SAM zugegeben.

Die so hergestellte unmethylierte und methylierte DNA wurde Bisulfit-konvertiert, UV spektrophotometrisch quantifiziert (4.3.1) und entsprechend der gewünschten prozentualen Methylierung gemischt.

Zusätzlich wurde für die Herstellung von Standards CpGenome[™] Universal Methylated DNA (Millipore, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um enzymatisch methylierte humane (männliche) genomische DNA. Als entsprechend unmethyliertes Äquivalent zu dieser methylierten DNA wurde DNA aus peripherem humanen Blut (PBL, Promega, USA) verwendet. Beide DNAs wurden vor der Bisulfitkonversion entsprechend der gewünschten prozentualen Methylierung gemischt.

4.2 Bisulfitkonvertierung

Für die Bisulfitkonversion von DNA werde drei Komponenten verwendet:

- die DNA Probe (gelöst in Wasser oder Puffer),
- die Bisulfitlösung (enthält 0,4708 g/ml Natriumdisulfit [$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$], Merck, D, und 0,1128 g/ml Natriumsulfit [Na_2SO_3], Fluka Chemie, CH, in Wasser)
- ein organisches Lösungsmittel (Diethylenglykoldimethylether [DME], Merck, D). In dem organischen Lösungsmittel ist zusätzlich ein Radikalfänger gelöst (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure [Trolox[®]], Sigma Aldrich, USA, 125,3 g/l).

Die Bisulfitreaktion wurde im Thermocycler (Eppendorf, D) bei folgenden Konditionen inkubiert: 5 min / 99°C, 22 min / 60 °C, 3 min / 99 °C, 87 min / 60 °C, 3 min / 99 °C, 177 min / 60 °C.

Es wurden insgesamt drei verschiedene Protokolle eingesetzt, die sich in den verwendeten Volumina und in der Art der Aufreinigung der DNA aus dem Bisulfitreaktionsgemisch unterscheiden. Ein Protokoll wurde für konventionelle Proben wie Zelllinien DNA, DNA aus ganzen Paraffin-Dünnschnitten, DNA aus gefrorenen Geweben und Standard DNAs (siehe 4.2.1), ein Protokoll für den gleichen Probentyp wie unter 4.2.1 allerdings für einen hohen Probendurchsatz (siehe 4.2.2) und ein Protokoll für Proben, bei denen die DNA Menge stark limitiert ist, wie z.B. mikrodissiziertes Material, verwendet (siehe 4.2.3).

4.2.1 Bisulfitbehandlung von DNA (Zelllinien, Standard DNA und Patientenproben)

Die Bisulfitkonvertierung von DNA aus Zelllinien, DNA von Patienten und Standard DNAs fand in einem Volumen von 160 µl (50 µl DNA Probe, 95 µl Bisulfitlösung und 15 µl DME / Trolox[®]-Lösung) in 200 µl PCR-Reaktionsgefäßen (Eppendorf, D) statt. Dieses Reaktionsgemisch wurde gründlich gemischt und wie unter 4.2 beschrieben inkubiert.

Nach der Bisulfitumwandlung der DNA wurde diese durch Ultrafiltration aufgereinigt. Dazu wurden Ultrafiltrationssäulen mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Microcon[®] YM-30, Millipore, USA) verwendet. Diese Ultrafiltrationssäulen wurden in die dazugehörigen Auffanggefäße überführt und mit 240 µl Wasser befüllt. Das komplette Bisulfitreaktionsgemisch (160 µl) wurde nun ebenfalls auf diese Säule gegeben und mit der Pipette gemischt, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren. Nun wurde der Filter mit dem verdünnten Bisulfitreaktionsgemisch 15 min bei 15000 g zentrifugiert und die Ultrafiltrationssäulen in ein neues Auffanggefäß überführt. Anschließend wurden 400 µl einer 0,2 M Natronlauge auf den Filter gegeben, dieser erneut 15 min bei 15000 g zentrifugiert und dann in ein neues Auffanggefäß überführt. Die DNA auf dem Filter wurde nun insgesamt drei mal gewaschen, indem je 400 µl Wasser auf die Säule gegeben wurden und diese wieder 15 min bei 15000 g zentrifugiert wurden. Nach jedem Waschschrift wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben und das alte verworfen.

Um die DNA von der Filteroberfläche zu eluieren, wurde 35 µl vorgewärmtes Wasser (50°C) auf den Filter gegeben und 10 min bei 50 °C und 1000 rpm im Thermomixer (Eppendorf, D) inkubiert. Die Säulen wurden umgedreht in das Auffanggefäß gesteckt und 2 min bei 1000 g zentrifugiert. Diese Elution wurde einmal wiederholt. Bis zur weiteren Verwendung der DNA wurde diese entweder bei -20°C (>2 Tage Lagerung) oder bei 4°C (≤ 2 Tage Lagerung) aufbewahrt.

4.2.2 Hochdurchsatzprotokoll

Ein Hochdurchsatzprotokoll im 96 iger Plattenformat kam zur Anwendung, wenn mehr als 32 Proben gleichzeitig bearbeitet wurden. Das Bisulfitreaktionsgemisch hatte die gleiche Zusammensetzung wie unter 4.2 beschrieben und wurde auch mit dem gleichen Temperaturprofil inkubiert, allerdings fand die Inkubation des Gemisches in 96 iger PCR Platten (ABgene, UK) statt.

Die Aufreinigung der Bisulfit-behandelten DNA fand ebenfalls im 96 iger Format statt. Hierzu wurden Komponenten des QIAamp 96 DNA Blood Kit und des QIAamp Viral RNA Mini Kit (beide Qiagen, D) verwendet.

Jeweils die Hälfte des Bisulfitreaktionsgemisches wurde auf zwei *Round-Well* Blöcke (Qiagen, D) verteilt. Dann wurden nacheinander 280 µl AVL Puffer (Qiagen, D) und 280 µl Ethanol in jedes Loch der *Round-Well* Blöcke gegeben. Die *Round-Well* Blöcke wurden mit den entsprechenden Verschlusskappen sorgfältig verschlossen und kräftig geschüttelt. Die Platten wurden kurz bei 1450 g zentrifugiert um alle Tropfen von den Deckeln und Wänden der Platte zu entfernen und anschließend 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde eine QIAamp 96 Platte (Qiagen, D) auf die entsprechende Auffangplatte (S-Block, Qiagen, D) gestellt und mit der ersten Hälfte des vorbereiteten Gemisches aus Bisulfitreaktion, Puffer AVL und Ethanol beladen. Die Platte wurde mit einer luftdurchlässigen Abdeckung (*AirPore Tape Sheet*, Qiagen, D) verschlossen und 4 min bei 5790 g zentrifugiert. Danach wurde die QIAamp 96 Platte auf einen neuen S-Block gestellt, mit dem zweiten Teil des Gemisches beladen, verschlossen und erneut zentrifugiert. Die beiden S-Blöcke wurden verworfen.

Die gebundene DNA wurde nun einmal gewaschen. Dazu wurde die QIAamp 96 Platte auf einen neuen S-Block gestellt und auf jede Membran 500 µl AW1 Puffer gegeben. Die Platte wurde mit einem *AirPore Tape Sheet* verschlossen und 2 min bei 5790 g zentrifugiert. Die QIAamp 96 Platte wurde auf einen neuen S-Block überführt und der alte verworfen.

Nach diesem ersten Waschschrift erfolgte die Desulphonierung der DNA. Hierfür wurde auf jede Membran je 500 µl Desulfonierungspuffer (0,2 M NaOH, 90% Ethanol) gegeben. Die Platte wurde mit einem neuen *AirPore Tape Sheet* verschlossen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die Platte 1 min bei 5790 g zentrifugiert und anschließend auf einen neuen S-Block überführt.

Abschließend folgten zwei weitere Waschschriffe. Der erste dieser Waschschriffe wurde mit Waschpuffer AW1 genauso wie bereits oben beschrieben durchgeführt. Für den zweiten Waschschrift wurde Waschpuffer AW2 (Qiagen, D) verwendet. Die DNA wurde nach dem Waschen getrocknet. Dazu wurde das *AirPore Tape Sheet* entfernt und die Platte 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Elution der DNA von den Säulen wurde auf jede Säule 100 µl vorgewärmtes Wasser (70 °C) gegeben und die Platte 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Elution erfolgte direkt in die dafür vorgesehene Elutionsplatte (Qiagen, D) und wurde bei 5790 g (4 min) durchgeführt.

Bis zur weiteren Verwendung der DNA wurde diese entweder bei -20°C (>2 Tage Lagerung) oder bei 4°C (≤ 2 Tage Lagerung).

4.2.3 Bisulfitbehandlung geringer DNA Mengen

Für die Bisulfitkonvertierung von geringen DNA Mengen, wie lysierte Mikrodisektionsproben und kleinste Mengen von Standard DNAs wurden ebenfalls die unter 4.2 beschriebenen Komponenten verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 64 µl (20 µl Probe, 38 µl Bisulfitlösung, und 6 µl DME/Trolox[®]) in 200 µl PCR Reaktionsgefäßen (Standard DNAs), bzw. im Fall der mikrodisezierten Proben direkt in den 500 µl Auffanggefäßen. Alle Proben mit geringen DNA Konzentrationen waren in Lysepuffer gelöst der poly-dA als Carrier-DNA enthielt (Zusammensetzung siehe 4.1.1.3). Das Reaktionsgemisch wurde bei dem gleichen Temperaturprofil inkubiert, wie unter 4.2 beschrieben.

Im Anschluss an die Bisulfitkonvertierung erfolgte eine Aufreinigung der DNA über Zymo-Spin IC Silikamembransäulen (Zymo Research, USA). Diese Säulen wurden in 2 ml Sammelgefäße (Qiagen, D) plziert und mit 166 µl AVL Puffer (Qiagen, D) befüllt. Dieser AVL Puffer wurde vorher entsprechend der Herstellerangaben mit poly-A angesetzt. Die 64 µl Bisulfitreaktionsgemisch wurden zu dem AVL Puffer gegeben und die verwendete Pipettenspitze aufgehoben. In das leere Bisulfit-Reaktionsgefäß wurden AVL Puffer (90 µl) gegeben, welcher dann mit der ursprünglich verwendeten Pipettenspitze ebenfalls auf die Säule gegeben wurde. Das Gemisch aus Probe und AVL Puffer auf der Säule wurde nun gemischt, indem mit dieser Pipettenspitze vorsichtig einige Male auf und ab pipettiert wurde, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach zehnminütiger Inkubation dieses Gemisches bei Raumtemperatur wurde 250 µl Ethanol hinzu gegeben, der Deckel geschlossen und die Säule kräftig gevortext. Zur Bindung der DNA an die Silikaoberfläche wurde die Säule dann 2 min bei 16000 g zentrifugiert. Das Sammelgefäß mit dem Durchfluss wurde verworfen, die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben und mit 500 µl Desulphonierungspuffer (0,2 M NaOH, 90% Ethanol) befüllt. Der Desulphonierungspuffer wurde 2 min bei 16000 g abzentrifugiert, die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und das alte Gefäß verworfen. Die gebundene und desulphonierte DNA wurde nun nacheinander mit Puffer AW1 und mit Puffer AW2 (beide Qiagen, D) gewaschen. Dazu wurden 500 µl der Puffer auf die Säule gegeben, und diese jeweils 2 min bei 16000 g zentrifugiert und in ein neues Sammelgefäß überführt. Nach jedem Waschschrift wurden die Sammelgefäße verworfen und die Säule in ein neues überführt. Um einen möglichen Übertrag von Puffer AW2 zu verhindern wurde die Säule erneut zentrifugiert (2 min bei 16000 g). Zur Elution der konvertierten DNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, D) gegeben und mit 12,5 µl vorgewärmten Wasser (50°C) beladen. Das Wasser wurde dabei vorsichtig direkt auf die Silikamembran pipettiert. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Elution durch 1 min Zentrifugation bei 6000 g. Die Säule wurde in dem Reaktionsgefäß belassen und die Elution mit weiteren 12,5 µl vorgewärmten Wasser wiederholt. Bedingt durch das Totvolumen der Säule und Verdunstung erhielt man am Ende so ca. 18 µl Eluat. Dieses Eluat wurde in ein 200 µl PCR Reaktionsgefäß (Eppendorf, D) überführt, wobei die Pipettenspitze zunächst nicht verworfen wurde. In das nun leere 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 22 µl Wasser pipettiert und dieses Wasser danach ebenfalls in das entsprechende 200 µl PCR Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurde die bereits benutzte Pipettenspitze verwendet.

4.3 DNA Quantifizierung

Um die Konzentration an DNA zu messen, wurden sowohl ein biochemisches Verfahren (Real-Time PCR, siehe 4.3.2), als auch ein physikalisches Verfahren (UV Spektrophotometrie, siehe 4.3.1) angewendet.

4.3.1 UV-Quantifizierung

Eine UV-photometrische Bestimmung der DNA Konzentration und Qualität wurde bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) mit dem NanoDrop® ND-1000 Spektrophotometer (NanoDrop Technologies, USA) durchgeführt. Resultierend aus molarem Absorptionskoeffizienten (ssDNA bzw. dsDNA) und Schichtdicke ergab sich die Konzentration der DNA in ng/µl durch Multiplikation der OD mit 50 (dsDNA) bzw. 33 (ssDNA). Für nicht konvertierte DNA (doppelsträngig) wurde der Faktor 50 und für Bisulfit-konvertierte DNA (vorwiegend einzelsträngig) der Faktor 33 verwendet. Die Reinheit der DNA hinsichtlich eventuell noch vorhandener Proteine wurde durch den Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm beschrieben.

4.3.2 Real-Time PCR-Quantifizierung

Zur Quantifizierung von Bisulfit-konvertierter und genomischer DNA mittels Real-Time PCR wurden drei verschiedene Assays verwendet, die auf der Amplifikation von drei verschiedenen Loci in den Genen ACTB (siehe 4.3.2.2), GSTP1 und LOC645666 (siehe 4.3.2.1) beruhen.

4.3.2.1 LOC645666 und GSTP1-Assay

Genomische und Bisulfit-konvertierte DNA wurde mit einem 84 bp Fragment im Gen LOC645666 (Chr.13, Region 18453120 - 18453203 basierend auf Ensembl v41) durchgeführt. Diese Region enthält im Sense-Stang keine Cytosine und kann dadurch sowohl zur Quantifizierung von Bisulfit-konvertierter, als auch genomischer DNA verwendet werden. Für die Quantifizierung von Bisulfit-konvertierter DNA wurde eine 130 bp Region im GSTP1 Gene verwendet (Chr.11, Region 67108911-67109040 basierend auf Ensembl v41).

Beide Assays wurden im 20 µl Maßstab durchgeführt und hatten folgende Zusammensetzung: 1 x PCR Puffer mit passiver ROX Referenz (Eurogentec, B), 1 U HotGoldStar *Taq* Polymerase (Eurogentec, B), 0,2 mM jedes dNTP (dTTP, dATP, dGTP und dCTP, Fermentas, CND), 2,5 mM (LOC645666 Assay), bzw. 3 mM (GSTP1 Assay) MgCl₂ (Eurogentec, B), 0,625 µM jeder Primer und 0,2 µM (LOC645666 Assay) bzw 0,3 µM (GSTP1 Assay) Detektionssonde (beide Biomers, D). Folgende Primer und Detektionssonden (Biomers, D) wurden verwendet: TAAGAGTAATAATGGATGGATGATG (Vorwärtsprimer LOC645666 Assay), CCTCCCATC-TCCCTTCC (Rückwärtsprimer LOC645666 Assay), 6-FAM-ATGGATGAAGAAAGAAAGGATGAGT-BHQ-1 (Detektionssonde LOC645666 Assay), GGAGTGGAGGAAATTGAGAT (Vorwärtsprimer GSTP1 Assay),

CCACACAACAAATACTCAAAAC (Rückwärtsprimer GSTP1 Assay), 6-FAM-TGGGTGTTTGTAAATTTTGT-TTTGTGTTAGGTT-BHQ-1 (Detektionssonde GSTP1 Assay).

Die Quantifizierung wurde im 96 iger Plattenformat unter Verwendung von optischen PCR Platten und entsprechende optischen Folien (jeweils Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Die Assays wurden bei folgendem Temperatur-Zeit-Profil inkubiert: Initiale Aktivierung der Polymerase für 10 min bei 95 °C und 45 Zyklen mit jeweils 15 s (95°C) Denaturierung und 60 s (58 °C) Annealing und Extension. Dazu wurde ein 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) bei ausgeschalteter Emulation und maximaler *Ramping Rate* verwendet. Fluoreszenzintensitäten wurden bei jedem PCR Zyklus während des Extension / Annealing Schrittes gemessen. Die Analyse der Real-Time PCR erfolgte mit der ABI SDS 2.2 Software (Applied Biosystems, USA). Dabei wurde ein *Threshold* von 0,4 gewählt und die Fluoreszenz in den Zyklen 3-20 als Hintergrundsignal definiert.

4.3.2.2 ACTB-Assay

Für die Quantifizierung von Bisulfit-konvertierter DNA mit dem ACTB Assay wurde ein 133 bp Fragment in diesem Gen (Chr.7, Region 5538255-5538387 basierend auf Ensembl v41) amplifiziert. Dieser Assay wurde im 20 µl Maßstab unter Verwendung des LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Kit (Roche, D) entsprechend der Herstellerangaben in 20 µl Glaskapillaren (Roche, D) durchgeführt. Es wurden 4 mM MgCl₂ (Roche, D) und folgenden Primer- und Detektionssonden-Konzentrationen verwendet: 0,5 µM jeder Primer (Vorwärtsprimer TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT, Rückwärtsprimer AACCAATAAACCTACTCC-CCCTTAA) und 0,25 µM jede Sonde (TTGTGAATTTGTGTTTGTATTGTGTGTTG-FLUO und RED640-TGGTGGTTATTTTTTTTATTAGGTTGTGGT-Phosphat). Die Primer und Detektionssonde wurden von Biomers (D) bezogen. Die PCR wurde mit dem LightCycler® 1.0 (Roche, D) inkubiert. 40 Zyklen bei 95°C für 10s, 58°C für 20s und 72°C für 10s nach einer initialen Inkubation für 10 min bei 95°C wurden bei einer *Ramping-Rate* von 1 °C/s durchgeführt. Das FRET Signal wurde bei 640 nm während des 58 °C Annealing-Schrittes jeden Zyklus gemessen.

4.4 PCR-Amplifikation

PCRs wurden im wesentlichen für drei verschiedene Anwendungen durchgeführt:

- Multiplexierte Voramplifikation mehrerer DNA Fragmente (multiplex-PCR oder mPCR) von sehr geringen DNA Mengen, wie z.B. mikrodissiziertem Material.
- Amplifikation von einzelnen DNA Fragmenten (Singleplex-PCR oder sPCR) zur Sequenzierung oder Gelelektrophorese. Als Templat hierfür diente sowohl bisulfitierte DNA (ca. 10 ng), als auch das Produkt der mPCR Voramplifikation (0,5 µl).
- Multiplexierte Amplifikation mehrerer DNA Fragmente (multiplex-PCR oder mPCR) für eine weitere Analyse mittels DNA Chip.

Je nach nachgelagerter Anwendung wurden verschiedene PCR Protokolle verwendet. Die PCR

Zusammensetzung für die verschiedenen Protokolle sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die mPCR Voramplifikation wurde in 200 µl PCR Reaktionsgefäßen (Eppendorf, D), alle anderen PCRs in 96 iger PCR Platten (ABgene) durchgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzungen der PCRs. MgCl₂, Taq Polymerase und 10-fach PCR Puffer wurden von Qiagen (D) bezogen, dNTPs wurden von Fermentas (CDN)

Chemikalien	Anwendung		
	1) mPCR (Voramplifikation)	2) sPCR	3) mPCR für DNA Chip
HotStar Taq Polymerase,	0,4 µl (2U)	0,2 µl (1U)	0,2 µl (1U)
dNTP-Mix (dGTP, dATP, dCTP, dTTP)	0,4 µl (je 25 mM)	0,2 µl (je 25 mM)	0,6 µl (je 25 mM)
10-fach PCR-Puffer	5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ -Lösung (25 mM)	-	-	3,5
Primer	2,5 µl (je 1 µM)	5 µl (je 2,5 µM)	2,5 µl (je 1 µM)
H ₂ O	50 µl Endvolumen	25 µl Endvolumen	25 µl Endvolumen
Templat DNA	40 µl	10 µl	10 µl

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind nach der jeweiligen Anwendung getrennt in den Tabellen 10-14 (Seite 156-160) im Anhang aufgelistet.

Alle PCRs wurden in DNA Engine Tetrad[®] Thermocyclern (Biorad, USA) durchgeführt. Dabei wurden folgende Temperaturprofile verwendet:

- mPCR Voramplifikation: 15 min bei 95 °C und 50 Zyklen mit 20 s bei 95 °C, 45 s bei 58 °C und 30 s bei 72 °C
- sPCR: 15 min bei 95 °C und 45 Zyklen mit 20 s bei 95 °C, 45 s bei 58 °C und 30 s bei 72 °C
- mPCR für DNA Chip: 15 min bei 95 °C und 40 Zyklen mit 30 s bei 95 °C, 45 s bei 55 °C und 1 min bei 72 °C

In den mPCRs für die Chiphybridisierung wurden jeweils acht verschiedenen PCR Produkte amplifiziert. Bevor diese auf dem Chip hybridisiert wurden, wurden alle jeweils zu einer Probe gehörenden mPCRs zu gleichen Teilen gemischt.

4.5 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden Gele aus 2 % [w/v] Agarose (Molecular Biology Grade Agarose, Eurogentec, B) und 1x TBE-Puffer (0,1 M Tris, 83 mM Borsäure [beides Carl Roth, D] und 1 mM EDTA [Fluka Chemie, CH]) und 0,025% Ethidiumbromidlösung (1% [w/v] in Wasser, Fluka Chemie, CH) hergestellt. Vom PCR-Produkt wurden 5 µl unter Zusatz von 5 µl Ladepuffer (3 mM Bromphenolblau [Carl Roth, D], 23 % Glycerin [Fluka Chemie, CH]) aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Dazu wurde das ComPhor[®] Maxi Gelelektrophoresesystem (Biozym, D) verwendet. Als Laufpuffer wurde ebenfalls 1 x TBE Puffer verwendet. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wurde eine 100 bp-Leiter (Invitrogen, D) eingesetzt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht (302 nm) fotografiert.

4.6 Sequenzierung

PCR Produkte wurden mit der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (1977) sequenziert. Für den Verdau der nicht inkorporierten dNTPs und Primer wurden 3,5 µl der PCR Produkte in eine 96 iger PCR Platten (ABgene) überführt und dann ein Gemisch aus Exonuclease I und Shrimp Alkaline Phosphatase (ExoSAP-IT[®], GE Healthcare, USA) dazu gegeben. Das ExoSAP-IT wurde dafür zunächst 1:2 mit Wasser verdünnt und davon dann 2 µl zu den 3,5 µl PCR Produkt in die PCR Platten gegeben. Die PCR Platten wurde kurz bei 2000 g zentrifugiert und anschließend 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Enzym 15 min bei 95 °C inaktiviert. Beide Inkubationen fanden in einem DNA Engine Tetrad[®] Thermocycler (Biorad, USA) statt.

Für die Inkorporation der Fluoreszenz-markierten ddNTPs während der Kettenabbruch-Synthese wurde die BigDye[®] Terminator 3.1 Chemie (Applied Biosystems, USA) verwendet. Die Kettenabbruch-Synthese wurde in einem Maßstab von 20,5 µl durchgeführt und hatte die folgende Zusammensetzung: 5,5 µl ExoSAP-IT[®] verdautes PCR Produkt, 1 µl BigDye[®] Terminator v3.1, 4 µl Sangerpuffer (320 mM Tris-HCl, pH 9, 6 mM MgCl₂ und 10 % [v/v] Sulfolan (Merck, D)), 5 µl dNTP Mix (je 0,02 mM an dATP, dGTP, dACP, dTTP) und 5 µl Sequenzierprimer [2 µM]. Die Inkubation dieses Reaktionsgemisches erfolgte in der gleichen MTP, in der bereits der ExoSAP-IT[®] Verdau durchgeführt wurde und fand bei folgendem Temperaturprofil statt: 2 min bei 96 °C und 25 Zyklen mit je 30 s bei 96°C, 15 s bei 55 °C und 4 min bei 60 °C. Die Inkubation wurde in DNA Engine Tetrad[®] Thermocyclern (Biorad, USA) durchgeführt.

Nach der Kettenabbruch-Synthese wurde das Reaktionsgemisch durch eine Gelpermeationschromatographie im 96 iger Plattenformat aufgereinigt. Verwendet wurden Multiscreen HVN Platten (Millipore, USA), welche mit einer Sephadex (Sephadex 50 Superfine, GE Healthcare, USA) Matrix befüllt wurden. Das Befüllen der MultiScreen[®] HVN Platten wurde mit dem MultiScreen[®] Column Loader (45 µL, Millipore, USA) durchgeführt, sodass in jedem Loch 45 µl Sephadex vorlagen. Darauf wurde nun je 300 µl Wasser gegeben und die Matrix über Nacht gequollen. Vor der Auftragen des Kettenabbruch-Synthese Produktes auf diese Platte wurde das Quellwasser entfernt. Dazu wurde die Platte auf eine Auffangplatte aus dem DyeEx[®] 96 Kit (Qiagen, D) gestellt und 5 min bei 910 g zentrifugiert. Anschließend wurde das gesamte Kettenabbruch-Synthese Produktes vorsichtig mittig auf die Sephadex Matrix aufgetragen und direkt in eine THERMO-FAST[®] 96 PCR Detektionsplatte (ABgene, UK) zentrifugiert (5 min bei 910 g). Zu jeder gereinigten Probe wurden schließlich noch 10 µl Hi-Di[®] Formamid (Applied Biosystems, USA) gegeben.

Die Kapillargelelektrophorese wurde mit einem 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) durchgeführt. Verwendet wurden dazu 36 cm Kapillaren (3730 DNA Analyzer Capillary Array, Applied Biosystems, USA) und POP-7[™] Polymer für 3730/3730xl DNA Analyzers (Applied Biosystems, USA). Dabei wurden folgende Bedingungen gewählt: Ofentemperatur 60 °C, Vorlaufspannung 15 kV, Vorlaufzeit 180 s, Injektionsspannung 1,2 kV, Injektionszeit 15 s, erste Datenaufnahme 250 ms, zweite Datenaufnahme 250 ms, Laufspannung 8,5 kV, Anzahl der Spannungsstufen 30, Spannungsstufenintervall 15 s, Spannungstoleranz 0,6 kV, Stromstabilität 10 µA, Erhöhungsverzögerung 450 s, Datenverzögerung 120 s und Laufzeit 2450 s.

4.7 Quantitative Methylierungsbestimmung (QM Assays)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene QM Assays zur quantitativen Bestimmung der DNA Methylierung verwendet. Diese Assays waren spezifisch für die Analyse der Gene PITX2 (Promotor AB und C), TFF1, ABHD9 und uPA. Die für diese Assays verwendeten Primer und Detektionssonden sind in Tabelle 16 (Anhang) aufgelistet. Analysiert wurden dabei folgende Regionen im Genom (nach Ensembl v41): Chromosom 4, Region 111777835-111777978 (PITX2 AB), Chr.4, 111763501-111763655 (PITX2 C), Chr.10, 75340750-75340828 (uPA), Chr.21, 42656449-42656529 (TFF1), Chr.19, 15204086-15204233 (ABHD9).

Alle PCRs wurden im 20 µl Maßstab durchgeführt und hatten folgende Zusammensetzung: 1 x PCR Puffer mit passiver ROX Referenz (Eurogentec, B), 1 U HotGoldStar *Taq* Polymerase (Eurogentec, B), 0,2 mM jedes dNTP (dTTP, dATP, dGTP und dCTP, Fermentas, CDN), 0,625 µM jeder Primer und 0,2 µM jede Sonde (Biomers, D). Die Magnesiumkonzentration war bei den verschiedenen Assays unterschiedlich: 3,5 mM im TFF1 Assay, je 3 mM bei den beiden PITX2 Assays und dem uPA Assay, sowie 2,5 mM beim ABHD9 Assay. Die QM Assays wurden sowohl im 96iger, als auch im 384 iger Plattenformat durchgeführt. Dabei wurden optische PCR Platten und optischen Folien (Applied Biosystems, USA) verwendet.

Die QM Assays wurden bei folgendem Temperatur-Zeit-Profil inkubiert: Initiale Aktivierung der Polymerase für 10 min bei 95 °C und 45 Zyklen mit jeweils 15 s Denaturierung (95°C) und 60 s Annealing und Extension. Die Annealing- und Extensiontemperatur betrug für die Assays PITX2 (Promotor AB) 62 °C, PITX2 (Promotor C) 62 °C, TFF1 58 °C, uPA 60 °C und ABHD9 60 °C.

Alle QM Assays wurden mit einem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA) bei ausgeschalteter Emulation und maximaler Ramping Rate durchgeführt. Fluoreszenzintensitäten wurden während jedes PCR Zyklus während des Extension / Annealing Schrittes aufgenommen. Die Analyse der Real-Time PCR erfolgte mit der ABI SDS 2.2 Software (Applied Biosystems, USA). Die Berechnung der Methylierung erfolgte nach folgender Formel:

Methylierung = $\frac{100}{1+2^{(CT(CG)-CT(TG))}}$, mit CT(CG) und CT(TG): CT der CG bzw. TG Detektionssonde.

4.8 DNA-Chip

Die Quantifizierung der DNA Methylierung durch die DNA Chip Technologie wurde wie von Adorjan *et al.* (2002) und Shi *et al.* (2003) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die in Tabelle 17 (Anhang) aufgelistete Oligonukleotide in vierfacher Redundanz auf aktivierte Glasobjektträger gespottet. Alle Oligonukleotide trugen am 5'-Ende eine C6-Aminomodifikation. Die insgesamt 178 verschiedenen Oligonukleotide stellen dabei 89 Paare dar, die jeweils spezifisch für die methylierte DNA (CG-Sonde) und die unmethylierte DNA (TG-Sonde) sind. Jedes Oligonukleotidpaar deckte 2-4 CpG-Positionen ab. Jedes zu analysierende PCR-Amplifikat wurde durch 3-5 Oligonukleotidpaare abgedeckt.

Die mPCR Produkte von zwei unabhängigen PCR Amplifikationen einer Probe (siehe 4.4) wurden jeweils vereinigt. Diese vereinigten mPCRs wurden jeweils auf vier Chips hybridisiert.

Die Fluoreszenzbilder der hybridisierten Chips wurden mit einem GenePix 4000 Microarray Scanner (Axon Instruments, PA, USA) aufgenommen und wie von Adorjan *et al.* (2002) beschrieben ausgewertet.

4.9 Statistische Methoden

Für eine Bewertung der prognostischen und prädiktiven Eigenschaft von Biomarkern wurden Überlebenszeitanalysen durchgeführt. Dabei wurden die im folgenden beschriebenen statistischen Modelle angewendet.

Die graphische Darstellung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan und Meier (1958). Die Wahrscheinlichkeit, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt eine Patientin einen Rückfall in Form von entfernten Metastasen entwickelt, wurde nach dem Cox Proportional Hazard Modell berechnet (Cox, 1972).

Die Signifikanz (p-Wert) der mit diesem Modell berechneten Wahrscheinlichkeiten wurde mit dem Likelihood Ratio Test bestimmt.

Als Maß für den Unterschied zweier Gruppen (Effektgröße) wurde das Modell des Separationscores nach Royston und Sauerbrei (2004) angewendet.

Für eine Bewertung der Methylierungsmarker unabhängig von einem gewählten Methylierungsschwellenwert, anhand dessen eine Gruppierung durchgeführt würde, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation (36, 48, 72 und 96 Monate) ROC (*Receiver Operating Characteristic*) Analysen durchgeführt und die entsprechenden AUC (*Area Under the Curve*) berechnet (einen Überblick bieten Heagerty und Zheng, 2003). Mit dem Modell des Konkordanzindex nach Harrell (1982) wurde zusätzliche eine Variante der ROC Analyse für Überlebensdaten verwendet.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung von PITX2

Zur näheren Charakterisierung der Methylierung innerhalb des PITX2 Genes wurden PCR Amplifikate entworfen, die verschiedene Bereiche dieses Genes abdecken. Die Organisation des PITX2 Genes ist in Abbildung 2 dargestellt. Es besteht aus 3 bisher bekannten Isoformen (A, B, C), von denen zwei (A und B) sich nur in einem alternativ gespleißtem Exon unterscheiden. Das dritte Transkript (C) ist eine kürzere Isoform und unterscheidet sich von den beiden anderen im N-Terminus. Diese Isoform wird durch einen anderen Promoter als die Transkripte A und B reguliert. Über das gesamte Gen verteilt liegen mehrere CpG Inseln, die in Abbildung 2 blau dargestellt sind. Dargestellt sind dabei CpG Inseln nach einer Definition mit relaxierten Kriterien (hellblau) und mit strikten Kriterien (dunkelblau). CpG Inseln nach strikten Kriterien sind Regionen, die mindestens 500 bp lang sind, mehr als 50 % GC enthalten und das Verhältnis aus statistisch erwarteter CpG Dichte und tatsächlich vorkommender CpG Dichte $\geq 0,6$ ist. CpG Inseln nach relaxierten Bedingungen unterschieden sich von denen unter strikten Bedingungen in der Mindestlänge (200 bp statt 500 bp) und darin, dass CpG Inseln, die weniger als 100 bp von einander entfernt sind, zusammengefasst wurden. Die drei ausgeprägtesten CpG Inseln liegen im Bereich der Transkriptionstarts der Transkripte A und B, im Bereich des Transkriptionsstarts von Transkript C, sowie in der Region des alternativ gepleißten Exons. Die Regionen, die durch Amplifikate abgedeckt wurden, sind in Abbildung 2 rot markiert und nummeriert (1-8). Region 1 stellt dabei die Region dar, die in den vorangegangenen Studien analysiert wurde und deren Eignung als prognostischer und prädiktiver Marker bekannt ist (Harbeck *et al.* 2005, Maier *et al.* 2004). Alle weiteren Amplifikate decken Bereiche ab, die bislang nicht untersucht wurden. Die Analyse dieser Regionen erfolgte durch Sequenzierung und eine Analyse der Sequenzierung durch ESME (Lewin *et al.* 2004).

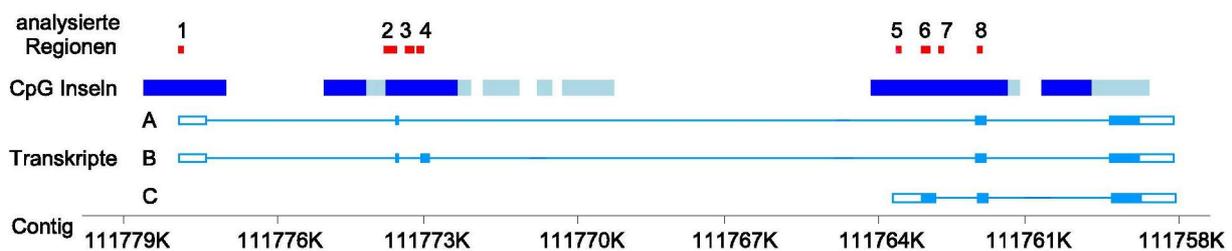


Abbildung 2: Aufbau des PITX2 Genes. Dargestellt sind die drei verschiedenen Isoformen (A, B und C), CpG Inseln im Gen (Beschreibung siehe Text), und die Position der acht untersuchten Regionen.

5.1.1 Korrelation von PITX2-Expression und Methylierung in Brustkrebszelllinien

Zur genaueren Charakterisierung des funktionellen Zusammenhangs von DNA Methylierung und Genexpression bei PITX2 wurden 35 Brustkrebszelllinien untersucht. Die Daten der relativen Expression der Transkripte A, B und C in diesen 35 Zelllinien wurden freundlicherweise von John W. M. Martens (Erasmus MC, Josephine Nefkens Institute Dept of Medical Oncology, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

In den Abbildungen 3, 4 und 5 ist der Zusammenhang von Expression der drei verschiedenen PITX2 Transkriptvarianten und der Methylierung der acht analysierten Regionen des PITX2 Gens dargestellt. Die Lage der acht untersuchten Regionen ist in Abbildung 2 und in den Diagrammen 3, 4 und 5 oben gezeigt. Als quantitativer Methylierungswert diente die durchschnittliche Methylierung aller CpGs der jeweiligen analysierten Region. Hierbei zeigte sich, dass nur die Zelllinien die Transkripte A und B exprimierten, die im Transkriptionsstartbereich der Transkripte A und B (Region eins) nicht oder weniger als 50% methyliert waren (Abbildungen 3 und 4), bis auf eine Ausnahme (MDA-MB361), bei der es eine signifikante, wenn auch geringe Expression des Transkripts A gab, obwohl diese Region zu ca. 80% methyliert war. Allerdings zeigte nicht jede Zelllinie, die in Region eins gering methyliert war auch unbedingt eine Expression der Transkripte A und B. Für Transkript C war dieser beschriebene Zusammenhang nicht erkennbar (Abbildung 5). Die Methylierung der Zelllinien im zweiten Bereich, also im Bereich des zweiten Exons der Isoformen A und B unterscheidet sich grundsätzlich von der Methylierung in Region eins. Insgesamt sind die Zelllinien dort wesentlich stärker methyliert als in Bereich eins. Lediglich eine Zelllinie (MDA-MB415) ist in diesem Bereich unmethyliert, alle anderen zeigen eine Methylierung von mindestens 60%. Auch der Zusammenhang von Methylierung und Expression ist in der Region zwei grundsätzlich verschieden verglichen mit Region eins: Bis auf eine Ausnahme (SUM185PE) findet Expression der Transkripte A und B nur in den Zelllinien statt, die in dieser Region zu über 90 % methyliert sind. Ein ähnliches Bild zeigt sich dort auch für das Transkript C, welches bis auf zwei Ausnahmen (SUM159 PT und DU4475) nur in Zelllinien exprimiert wird, die über 90 % methyliert sind. Die Analyse der Region drei zeigt ein ähnliches Bild wie in Region zwei, allerdings sind die Zelllinien insgesamt etwas weniger methyliert als in Region zwei. Von Region drei zu Region vier verändert sich die Methylierung der Zelllinien dann wieder sehr stark, obwohl diese beiden Regionen nur ca. 100 bp voneinander entfernt sind. In Region vier, welche im Bereich des alternativ gespleißten Exons (Exon 3) liegt, erstreckt sich die Methylierung der Zelllinien gleichmäßig über die gesamte Bandbreite von 0 % bis 100 %. Es ist kein Zusammenhang zwischen DNA Methylierung und Expression einer der drei Transkriptvarianten erkennbar.

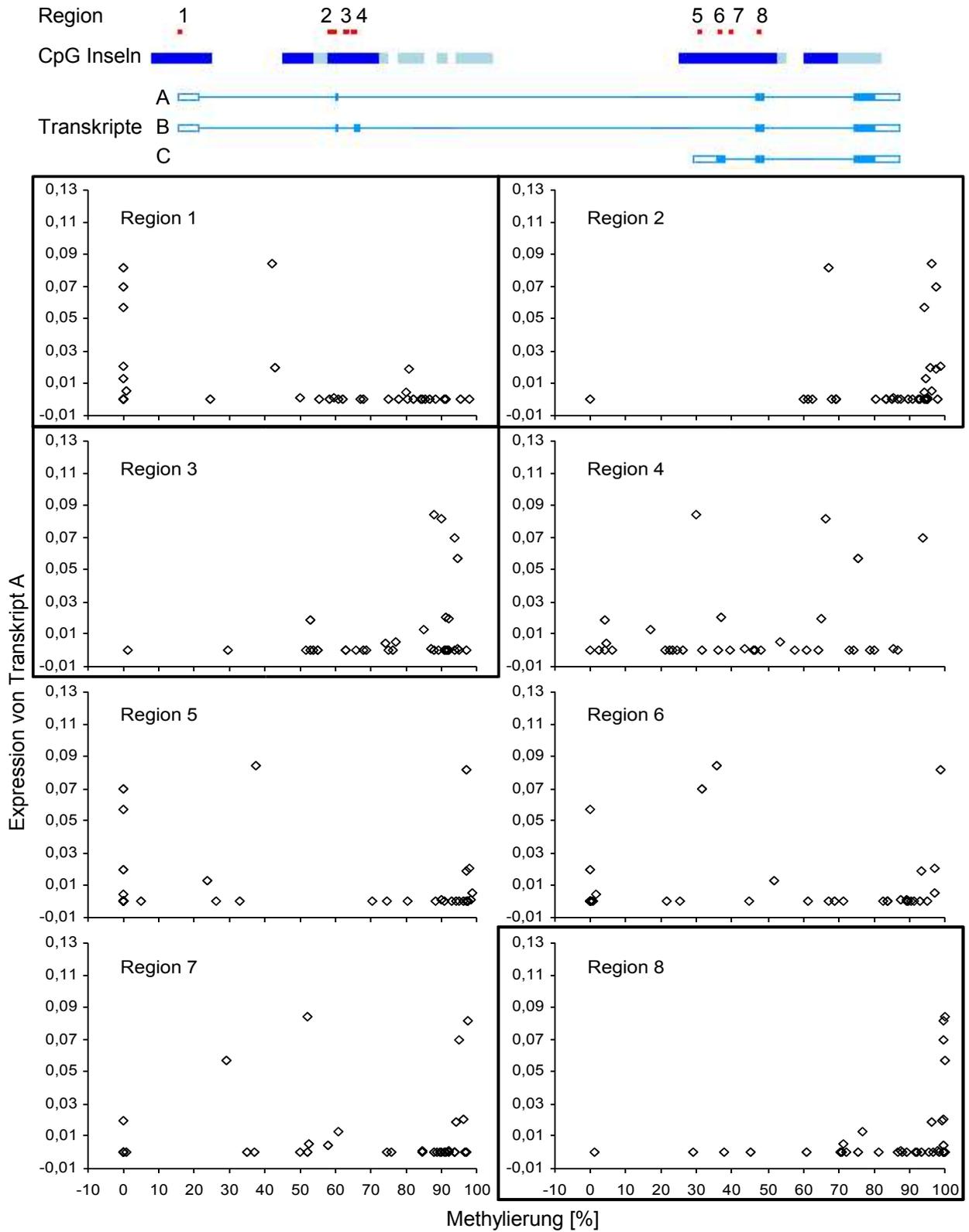


Abbildung 3: Abhängigkeit der PITX2 Expression (Transkript A) von der Methylierung an verschiedenen Positionen im Gen. Die Lage der analysierten Regionen im PITX2 Gen sind oben dargestellt. Die Diagramme, in denen ein Zusammenhang zwischen Expression und Methylierung zu erkennen ist, sind umrandet.

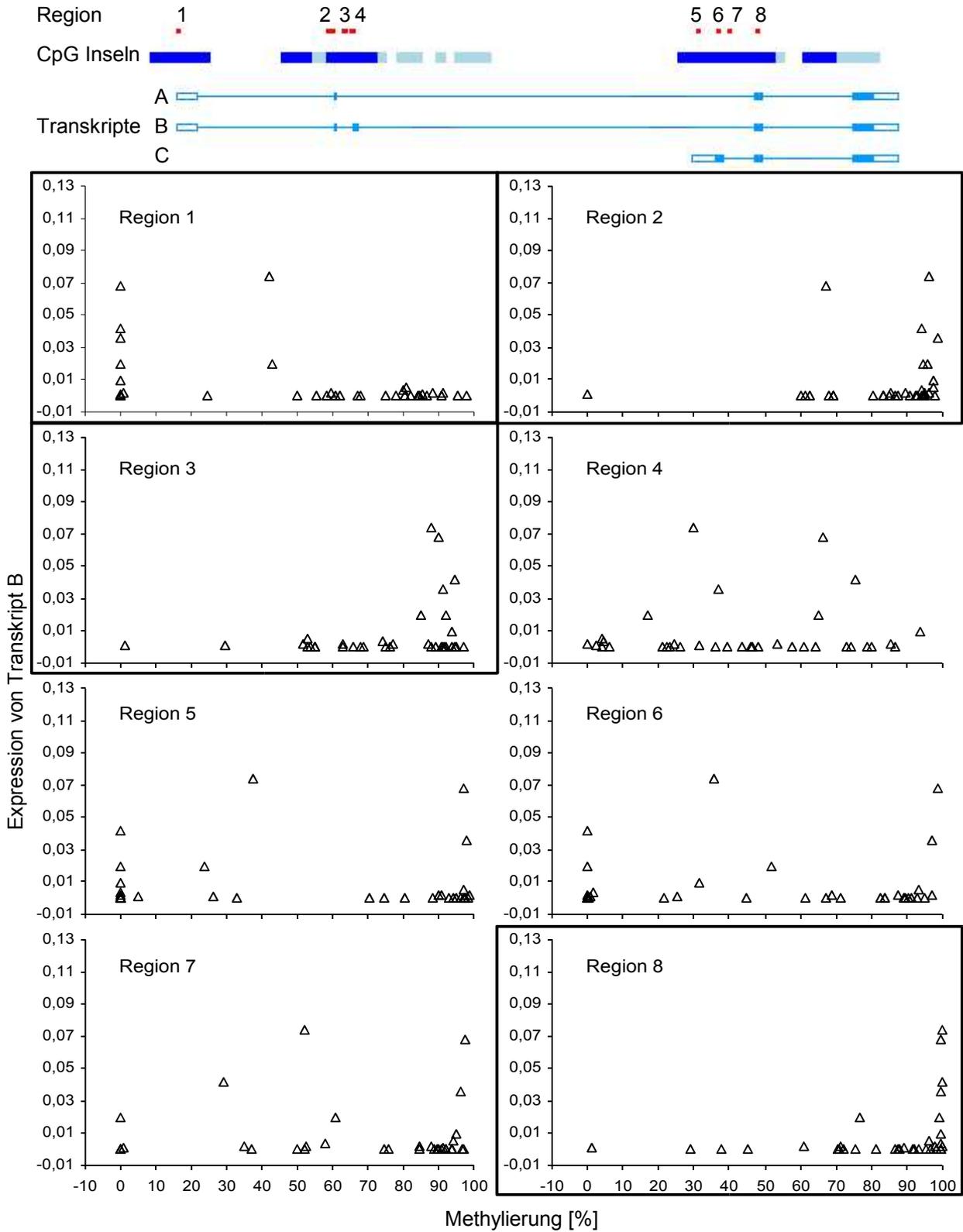


Abbildung 4: Abhängigkeit der PITX2 Expression (Transkript B) von der Methylierung an verschiedenen Positionen im Gen. Die Lage der analysierten Regionen im PITX2 Gen sind oben dargestellt. Die Diagramme, in denen ein Zusammenhang zwischen Expression und Methylierung zu erkennen ist, sind umrandet.

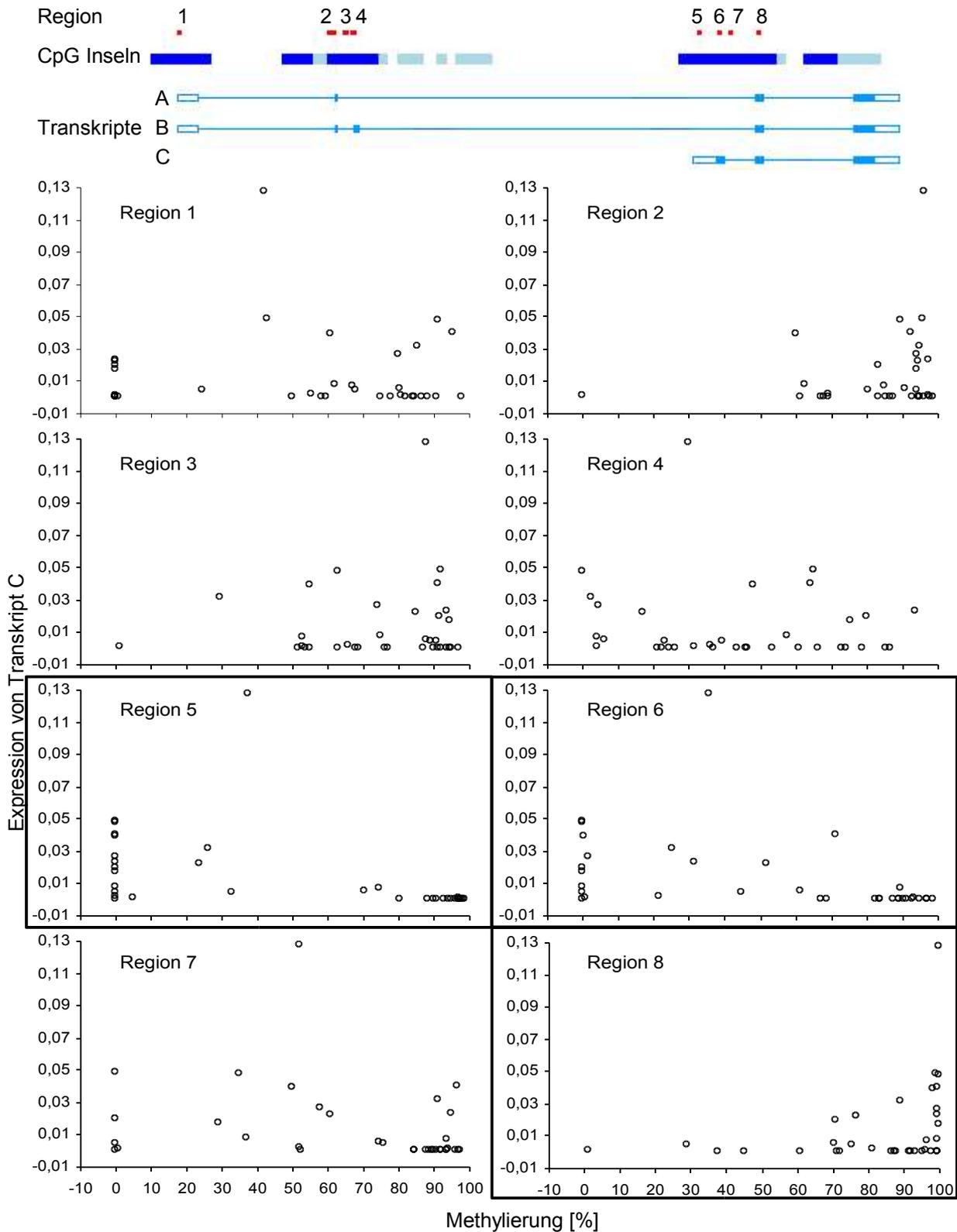


Abbildung 5: Abhängigkeit der PITX2 Expression (Transkript C) von der Methylierung an verschiedenen Positionen im Gen. Die Lage der analysierten Regionen im PITX2 Gen sind oben dargestellt. Die Diagramme, in denen ein Zusammenhang zwischen Expression und Methylierung zu erkennen ist, sind umrandet.

Die Regionen fünf und sechs liegen im untranslatierten bzw. translatierten Bereich des ersten Exons des Transkripts C. In Region fünf ergibt sich für die Transkriptvariante C ein vergleichbares Ergebnis wie für die Transkripte A und B in der Region ihrer Transkriptionsstarts (Region eins). Das heißt, dass lediglich bei den Zelllinien eine erhöhte Expression von Transkript C vorkommt, die in diesem Bereich weniger als 50 % methyliert sind. Andersherum gilt aber ähnlich wie für die Transkripte A und B in Region eins, dass nicht jede Zelllinie, die in Region 5 unmethyliert ist, auch das Transkript C exprimiert. Für die Transkripte A und B ist in Region fünf kein Zusammenhang zwischen Expression und Methylierung zu erkennen: Sowohl die komplett unmethylierten als auch die methylierten Zelllinien exprimieren teilweise die Transkripte A und B. Von Region 5 hin zu Region 6 ist keine wesentliche Änderung des Zusammenhanges von Expression und Methylierung erkennbar. Insgesamt nimmt die Methylierung der Zelllinien hin zu Region 6 jedoch etwas zu. Die Methylierung der Zelllinien nimmt dann in Richtung des C-Terminus der Transkripte insgesamt weiter zu. Waren in Region fünf noch 13 der 35 Zelllinien weniger als 5 % methyliert, so waren es in Region sechs nur noch zehn, in Region sieben nur noch fünf und in Region acht nur noch eine. Bei der Zelllinie, die in Bereich acht noch immer unmethyliert ist, handelt es sich um dieselbe, die bereits als einzige Zelllinie in den Bereichen zwei und drei unmethyliert war (MDA-MB415). In der Region sieben, die zwischen den ersten beiden Exons des Transkriptes C liegt, ist kein Zusammenhang zwischen Expression und Methylierung zu sehen. Schließlich zeigt Region acht einen vergleichbaren Zusammenhang von Methylierung und Transkription, wie schon Region zwei: Bis auf eine, bzw drei Ausnahmen exprimieren nur die Zelllinien die Transkripte A und B bzw. C, die in dieser Region mindestens zu 95 % methyliert sind. Sowohl Region acht als auch Region zwei überlappen mit den Exons, die nicht alternativ gespleißt werden.

Bisher wurden die einzelnen Regionen in den jeweiligen Zelllinien unabhängig voneinander betrachtet. Dabei wurde kein Augenmerk darauf geworfen, wie sich die Methylierung innerhalb einer bestimmten Zelllinie von Region zu Region verhält. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Zelllinien in Gruppen eingeteilt. Die Einteilung der Zelllinien in diese Gruppen beruhte auf der Expression bestimmter Transkriptvarianten. Der Grenzwert, ab wann eine Zelllinie als exprimierend eingestuft wurde, wurde mit 0,005 festgelegt. Zelllinien, die eine relative Expression von über 0,005 zeigten, wurden als exprimierend definiert. Insgesamt wurden vier Gruppen gebildet. In der ersten Gruppe (Gruppe 0, 9 Zelllinien) sind alle Zelllinien zusammengefasst, die keines der drei Transkripte exprimieren. Die Gruppe AB (4 Zelllinien) umfaßt alle Zelllinien, die entweder Variante A oder B, nicht aber C exprimieren. Diejenigen Zelllinien, die alle drei Transkripte vorweisen, wurden als Gruppe ABC (5 Zelllinien) bezeichnet. In Gruppe C (9 Zelllinien) sind nur Zelllinien enthalten, die lediglich die Isoform C, nicht aber A oder B exprimieren. In Abbildung 6 ist die Methylierung dieser vier Zellliniengruppen in vier verschiedenen, ausgewählten Regionen dargestellt. Ausgewählt wurden die Regionen eins, zwei, fünf und acht, diejenigen, in denen in den Abbildungen 3, 4 und 5 ein Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression sichtbar war. In Region eins, d.h. dort, wo der Transkriptionsstart der Isoformen A und B liegt, sind diejenigen Zelllinien unmethyliert, die auch mindestens eines dieser beiden Transkripte exprimieren (Gruppen AB und ABC). Zelllinien, die gar keine PITX2 Isoform oder nur die Variante C exprimieren sind dort methyliert (Gruppen 0 und C). Die zweite untersuchte Region liegt im Bereich des zweiten Exons der Transkripte A und B. Dort sind alle Zelllinien methyliert, besonders stark allerdings die Gruppe ABC, also die Zelllinien, die eine Expression aller Transkripte aufweisen. Die Region im Bereich des Transkriptionsstarts von Variante C (Region fünf) ist nur in den Zelllinien methyliert, die nicht die entsprechende Variante C exprimieren (Gruppen 0 und AB). Beide Gruppen, die Zelllinien enthalten, die Variante C exprimieren (ABC und C) sind dort gering methyliert.

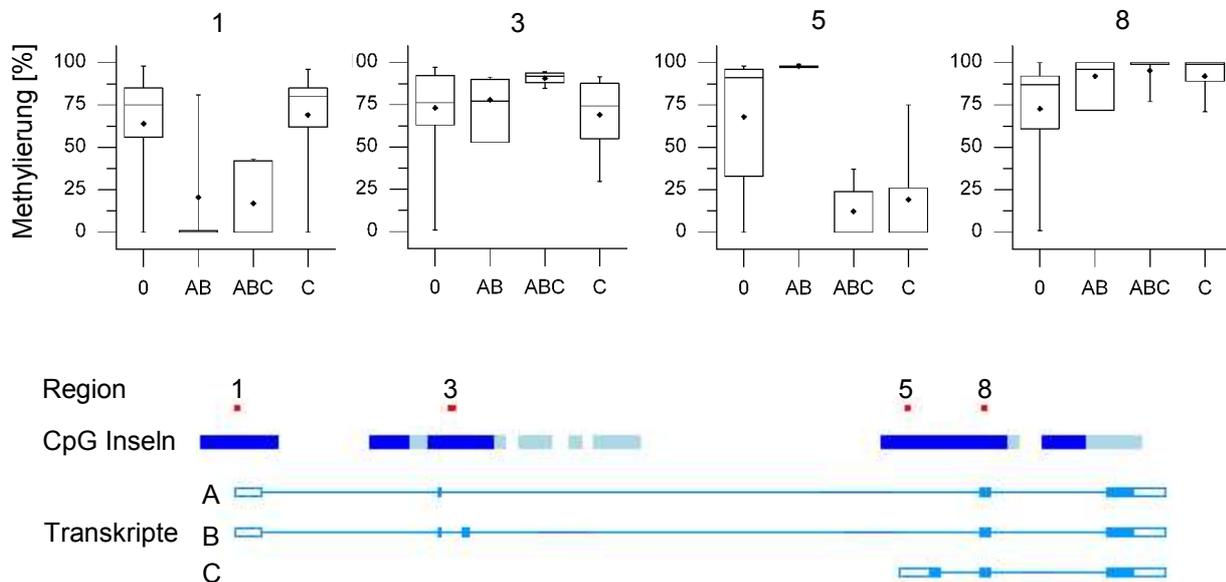


Abbildung 6: Oben: Methylierung der nach Expression gruppierten Zelllinien in vier verschiedenen Regionen von PITX2. Gruppe **0**: keine Expression; **AB**: Expression von Variante A oder B, nicht C; **ABC**: Expression aller drei Isoformen; **C**: nur Expression von Transkript C. Unten: Position der analysierten Regionen im PITX2 Gen.

Die letzte Region, die im Rahmen dieser Analyse dargestellt ist, ist Region acht, die überlappend mit dem Exon ist, welches alle drei Isoformen als einziges gemeinsam haben. Dort sind, wie bereits zuvor beschrieben, alle Zelllinien methyliert. Die Gruppen, die Zelllinien mit Expression von Variante C umfassen sind dort besonders hoch methyliert.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen der Methylierung in den verschiedenen Regionen von PITX2 gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen Methylierung und Expression in diesem Gen gibt. Exprimiert wird ein entsprechendes Transkript nur, wenn die Region seines Transkriptionsstart nicht methyliert ist. Zusätzlich ist bemerkenswert, dass Zelllinien, die PITX2 Isoformen exprimieren, auch besonders stark in den CpG Inseln im Bereich der Exons dieser entsprechenden Isoformen methyliert sind.

In den Abbildungen 3, 4 und 5 ist noch ein weiteres interessantes Phänomen zu erkennen: Die Methylierung verändert sich von Region 3 zu Region 4 erheblich. Dies ist daher bemerkenswert, da diese beiden Regionen nur ca. 100 bp auseinander liegen. Da diese beiden Regionen durch zwei unterschiedliche PCR Amplifikate untersucht wurden, konnte zunächst nicht sichergestellt werden, dass es sich bei diesem Phänomen nicht eventuell um einen PCR Artefakt handelt. Um dies weiter zu untersuchen, wurden die äußeren Primer dieser beiden PCR Amplifikate als Primer für ein einziges PCR Amplifikat verwendet, welches die beiden Regionen 3 und 4 komplett abdeckt. Aufgrund der Länge des resultierende PCR Produktes wurde dieses aus beiden Richtungen sequenziert und die Ergebnisse dieser beiden Sequenzierungen für jedes CpG gemittelt. Diese Methylierungswerte für jedes einzelne CpG wurden dann weiter über alle 35 Zelllinien gemittelt. Diese mittlere Methylierung pro CpG in Abhängigkeit von der CpG Position ist in Abbildung 7 dargestellt. Dort erkennt man, dass sich zwischen CpG Position 127 und 179 eine ca. 50 bp lange, CpG freie DNA Sequenz befindet. Alle 14 CpGs, die vor dieser Sequenz liegen, sind im Mittel über alle Zelllinien zwischen 63 % und

89 % methyliert (durchschnittlich zu 78 %). Die 24 CpGs, die hinter dieser Sequenz liegen, sind nur noch zwischen 14 % und 76 % methyliert (im Durchschnitt 50 %).

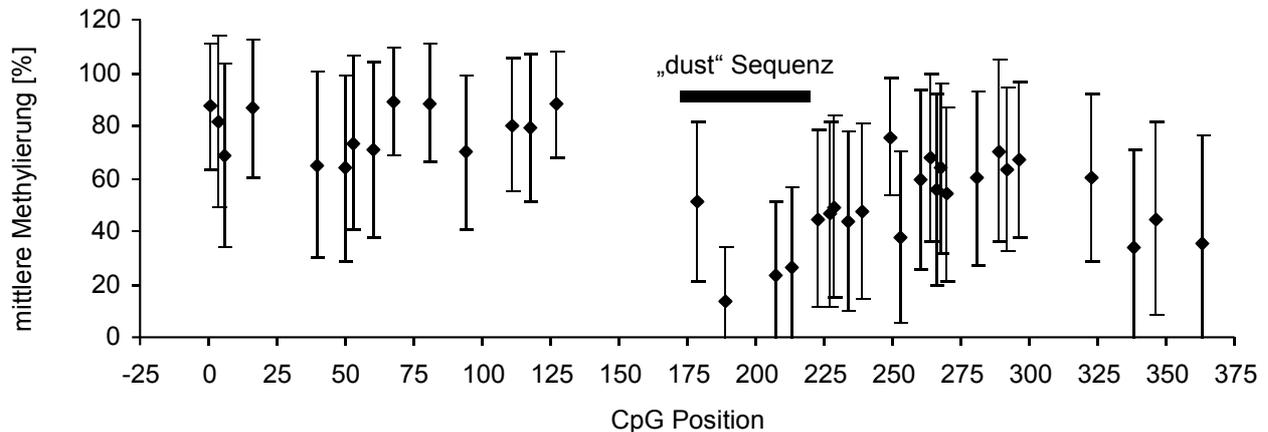


Abbildung 7: Methylierung der einzelnen CpGs im Bereich des dritten Exons der Transkriptvariante B. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus allen 35 Zelllinien \pm Standardabweichung. Die Position der niederkomplexen „dust“-Sequenz ist durch einen schwarzen Balken markiert.

Interessanter Weise liegt zwischen Position 172 und Position 220 eine Sequenz mit niedriger Komplexität. Diese nach dem „dust“ Algorithmus (Zhang und Madden 1997, Bailey *et al.* 2006) identifizierte Sequenz (AGGAGCCGGGACGGGAGGAGGGGAGGGGCGAGGCAGGCCGGAGGAG) wird in Ensembl als Repeat annotiert. Unter den vier CpGs, die innerhalb dieser Sequenz liegen, befinden sich auch die drei CpGs, die von allen 38 analysierten CpGs am geringsten methyliert sind (14, 24 und 27 %). Obwohl 35 biologisch unterschiedliche Zelllinien gemittelt wurden und dadurch mit einer hohen Streuung (bzw. Standardabweichung) zu rechnen war, zeigen diese drei CpGs eine statistisch signifikant niedrigere Methylierung als die meisten CpGs vor dieser „dust“-Sequenz.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die in Abbildung 6 dargestellten Regionen im PITX2 Gen weiter untersucht. Im Hinblick auf den funktionellen Zusammenhang von Expression und Methylierung in diesen Regionen und entsprechend der Lage in Relation zu den Exons und Introns des Gens werden diese Regionen im Weiteren mit Promotor AB (Region 1), Intron 2 (Region 3), Promotor C (Region 5) und Exon 5 (Region 8) bezeichnet.

5.1.2 Entwicklung eines QM-Assays für den Promotor C von PITX2

Die Untersuchungen der Methylierung von PITX2 in den Zelllinien (Kapitel 5.1.1) führten zur Identifizierung einer Region (Region 5), deren Methylierung mit der Expression des Transkriptes C zusammenhängt. Es sollte nun untersucht werden, ob sich die Methylierung dieser Region auch als prognostischer Marker für den Verlauf einer Brustkrebserkrankung eignet. Die Analysen der Zelllinien wurden mittels Bisulfit-Sequenzierung

durchgeführt. Diese Methode könnte eventuell in ihrem Auflösungsvermögen nicht ausreichend genug für die Beantwortung dieser Fragestellung sein. Aus diesem Grund wurde für diese Region im Rahmen der Arbeit ein QM Assay entwickelt und optimiert. Die Charakteristik der finalen Version dieses Assays ist in Abbildung 8 gezeigt. Zur Erstellung dieser Charakteristik wurde eine DNA Standardreihe von Mischungen aus bisulfitierter MDA und bisulfitierter künstlich methylierter MDA DNA verwendet, die relative Methylierungen von 0, 10, 25, 50, 75 und 100 % widerspiegeln.

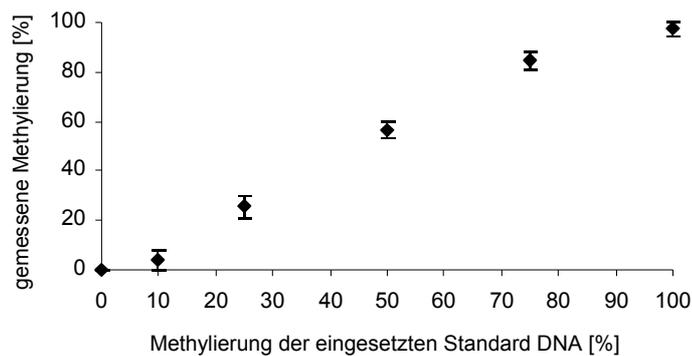


Abbildung 8: Charakteristik des QM Assays im Promotor C des PITX2 Gens. Dargestellt sind Mittelwerte aus sechs Messungen \pm Standardabweichung. Dabei wurden zwei unabhängig voneinander hergestellte Standardreihen jeweils drei mal gemessen.

In Abbildung 8 ist gut zu erkennen, dass der entwickelte Assay in der Lage ist, alle analysierten Methylierungsmischungen zu unterscheiden. Damit stand nun ein Assay zur Verfügung, mit dem im folgenden Patientinnenproben untersucht werden konnten, um das prognostische Potenzial dieser Region zu untersuchen.

5.1.3 PITX2 Promotor C: Methylierung in ausgewählten Patientinnenproben

Insgesamt wurden Bisulfit-konvertierte DNA Proben aus Tumoren von 94 Brustkrebspatientinnen untersucht. Bei diesen Gewebeproben handelte es sich um eingefrorenes Frischgewebe. Alle Patientinnen erhielten nach erfolgter Operation keine weitere Behandlung, sodass das reine prognostische Potenzial des Markers unabhängig von einer Therapieform untersucht werden konnte. Die Auswahl der Patientinnen erfolgte dabei nach dem Status der Methylierung im Bereich des Promotors der Transkripte A und B - also der Region, die bereits als prognostisch bekannt war. Es wurden insgesamt vier verschiedenen Gruppen von Patientinnen gebildet. Die ersten beiden Gruppen spiegeln Patientinnen wider, bei denen die Vorhersage des Krankheitsverlaufes anhand der Methylierung in der Promotor AB Region funktioniert hätte. 16 Patientinnen hatten eine niedrige Methylierung (≤ 1 %) und auch eine gute Prognose (Gruppe A) und 17 Patientinnen (Gruppe B) hatten eine schlechte Prognose und dementsprechend auch eine hohe Methylierung von PITX2 (≥ 53 %) in der Promotorregion AB. Anhand dieser beiden Gruppen sollte festgestellt werden, ob auch die zweite Region im Bereich des Promotors von Transkript C prognostisch ist. Des Weiteren wurden zwei weitere, größere Gruppen von Patientinnen gebildet, deren Analyse es ermöglichen sollte, einzuschätzen, ob

dieser neue Assay eine bessere Klassifizierung erlaubt, als es mit dem ursprünglichen möglich wäre. Bei diesen beiden Gruppen handelte es sich um Patientinnen, bei denen Methylierung von PITX2 als prognostischer Biomarker versagt hätte. 31 Patientinnen (Gruppe C) hatten eine hohe PITX2 Methylierung ($\geq 55\%$), obwohl sie keinen Rückfall erlitten hatten und 30 Patientinnen (Gruppe D) hatten einen Rückfall, obwohl eine niedrige PITX2 Methylierung ($\leq 23\%$) diese als Patientinnen mit guter Prognose eingestuft hätte. Die Methylierung dieser Patientinnengruppen sowohl in der Promotorregion der Transkripte A und B (Promotor AB) und im Promotor C ist in Abbildung 9 dargestellt. Dabei wurden die Patientinnen nach der Methylierung des Promotors AB (Abbildung 9, links) ausgewählt, sodass es dort eine klare Trennung zwischen den vier Gruppen gibt.

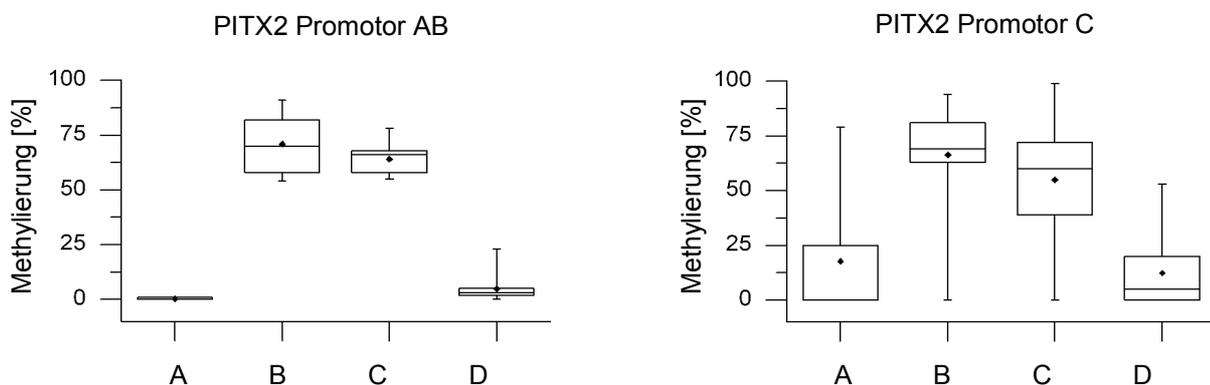


Abbildung 9: Methylierung von 94 ausgewählten und gruppierten Brustkrebspatientinnen in den beiden Promotoren (AB und C) des PITX2 Gens. Gruppe A: 16 Patientinnen mit niedriger Promotor AB Methylierung und guter Prognose; Gruppe B: 17 Patientinnen mit hoher Promotor AB Methylierung und schlechter Prognose; Gruppe C: 31 Patientinnen mit hoher Promotor AB Methylierung und guter Prognose; Gruppe D: 30 Patientinnen mit niedriger Promotor AB Methylierung und schlechter Prognose. Patientinnen der Gruppen A und B sind durch Promotor AB Methylierung richtig, Patientinnen der Gruppen C und D falsch prognostiziert worden.

Im Vergleich zum Promotor AB sind diese Patientinnenproben im Promotor C sehr ähnlich methyliert (Abbildung 9, rechts): Die Gruppen A und D sind gering methyliert, während die Gruppen B und C tendenziell hoch methyliert sind. Die Methylierung beider Promotoren korreliert also in den meisten Proben. Demzufolge ist die Methylierung im Promotor C Bereich wahrscheinlich auch als prognostischer Biomarker geeignet. Dabei ist keine Aussage darüber möglich, welcher der beiden Promotoren eine bessere Klassifizierung der Patientinnen zulässt, da die Gruppen, in denen eine Klassifizierung durch Methylierung des Promotors AB Region falsch war (Gruppen C und D) auch im Promotor C vergleichbar methyliert sind. Allerdings ist anhand der Whiskers in den Boxplots auch zu erkennen, dass einige Patientinnenproben im Promotor C anders methyliert sind als im Promotor AB, sodass dieser Promotor in einer größeren Patientinnenpopulation untersucht werden sollte.

5.1.4 Vergleich beider PITX2 Promotoren in unabhängiger Patientinnenpopulation

In der bisherigen Arbeit konnte ein Bereich im PITX2 Gen (Promotor C) identifiziert werden, der offensichtlich die Expression der kurzen PITX2 Isoform reguliert und dessen Methylierung wahrscheinlich auch als prognostischer Biomarker geeignet ist. Um dies zu bestätigen und weiter zu untersuchen, welcher der Promotoren, AB oder C, besser für diese Fragestellung geeignet ist, wurde eine größere, unabhängige Patientinnenpopulation untersucht. Diese Patientinnenpopulation umfasste 384 Lymphknoten-positive Patientinnen von vier verschiedenen klinischen Zentren. Von den 384 Patientinnen haben 143 einen Rückfall in Form von Metastasenbildung erlitten. Alle Patientinnen haben eine adjuvante Chemotherapie (Anthrazyklin) erhalten, 133 Patientinnen sind zusätzlich noch durch eine endokrine Therapie mit Tamoxifen therapiert worden. Der Beobachtungszeitraum nach der OP war im Median 82 Monate. Von den 384 Patientinnen hatten 284 (74 %) einen positiven ER Status, bei 97 (25 %) war dieser negativ und von drei Patientinnen unbekannt.

Da es sich bei den untersuchten Patientinnenproben um Proben Anthrazyklin-behandelter Patientinnen handelt, sollte zunächst geklärt werden, ob PITX2 in dieser Population als prognostischer Biomarker geeignet ist. Anschließend sollte dann die Methylierung beider Promotoren und ihre Eignung als Biomarker direkt verglichen werden. Allerdings ist durch die Wahl einer anderen Patientinnenpopulation eine direkte Validierung der Ergebnisse, die mit Zelllinien und unbehandelten Patientinnen erzielt wurden, nicht möglich.

Die Untersuchung erfolgte für beide PITX2 Promotoren mit QM Assays. Ausgewertet wurden nur die Ergebnisse der Patientinnen, die bei den Assays für beide Promotoren eine Messung ergaben, die den Qualitätsanforderungen entsprechen. Das Qualitätskriterium für eine Einzelmessung war, dass mindestens einer der beiden CTs (der Sonden für die unmethylierte oder für die methylierte DNA) von einer Messung kleiner als 36 sein musste. Pro Patientin und Assay wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Von diesen drei Messwerten mussten mindestens zwei dieses Kriterium erreichen, ansonsten wurden diese Probe ausgeschlossen. Von den insgesamt untersuchten 396 Patientinnen ergaben die Messungen von 377 Patientinnen gültige Ergebnisse nach diesen Qualitätskriterien (dunter 278 der 284 ER positiven Patientinnen) und wurden in dieser Studie berücksichtigt.

Um die Qualität eines Markers in einer Patientenpopulation beurteilen zu können, ist normalerweise eine Studie notwendig, bei der zunächst ein Schwellenwert für die Methylierung ermittelt wird, anhand dessen die beiden Gruppen (schlechte und gute Prognose) gebildet werden. Danach würde in einer zweiten Studie dieser Marker unter Verwendung des zuvor ermittelten Schwellenwertes validiert. In vielen wissenschaftlichen Arbeiten wird dies so nicht durchgeführt, stattdessen wird ein optimierter Schwellenwert verwendet, also der Schwellenwert, der in der durchgeführten Studie zu der besten Trennung der beiden Gruppen führt. Dies führt schnell zu einer zu optimistischen Beurteilung der Studienergebnisse. Bei den hier durchgeführten Analysen wurde als Schwellenwert der Median der Methylierung der gesamten Population gewählt. Die Wahl des Medians hat gegenüber einem optimierten Schwellenwert den Vorteil, dass dieser vor der Studie festgelegt wurde somit wie ein in einer Vorstudie ermittelter Schwellenwert nicht zu zu optimistischen Ergebnissen führt.

Das prognostische Potential der beiden untersuchten PITX2 Promotoren in der gesamten Patientinnenpopulation ist Abbildung 10 dargestellt. Dort sind in den beiden oberen Diagrammen die Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die beiden Promotoren dargestellt.

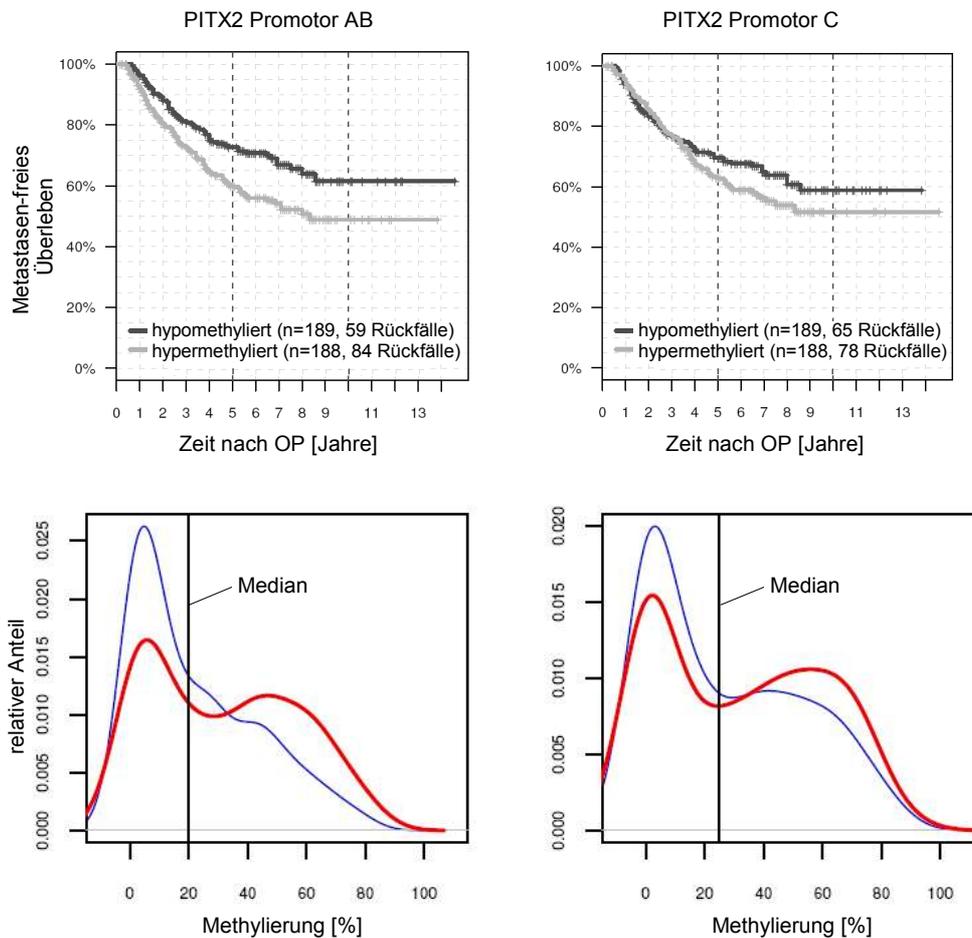


Abbildung 10: Kaplan-Meier-Überlebenskurven (oben) und Verteilung der Methylierung (unten) in der Gesamtpopulation (377 Patientinnen) für beide PITX2 Promotoren (AB und C).

Es zeigte sich, dass auch in dieser Patientinnenpopulation, also bei Anthrazyklin-behandelten Patientinnen PITX2 als prädiktiver Marker geeignet ist. Dabei können anhand der Methylierung des Promotors AB zwei Gruppen gebildet werden, bei denen in der einen 32% (59 von 189) und in der anderen 45% (84 von 188) Rückfälle auftreten. Im Vergleich dazu zeigt der Promotor C zwar auch Potenzial als prädiktiver Marker, jedoch ist dieses statistisch signifikant schlechter als bei dem anderen Promotor (34% und 41% Rückfälle in den beiden Gruppen). In Abbildung 10 ist auch die Verteilung der Methylierung in der Patientinnenpopulation dargestellt. Die Verteilung der Methylierung beider Promotoren zeigt dabei ein vergleichbares Bild. Sowohl die Patientinnen, die einen Rückfall erlitten haben (rot), als auch die ohne Rückfall (blau) zeigen lokale Maxima der Methylierung bei 0 % und ca. 50-60 %. Entsprechend der prognostischen Eigenschaft beider PITX2 Promotoren ist bei den Patientinnen mit Rückfall das Maximum bei 50 - 60 % im Vergleich zum Maximum bei 0 % relativ höher als bei den Patientinnen ohne Rückfall.

Von den 377 berücksichtigten Tumorproben hatten 278 einen positiven ER Staus. Von PITX2 ist aus früheren Studien mit unbehandelten und Tamoxifen-behandelten Patientinnen bekannt, dass eine Prognose bei ER positiven Tumoren zutreffender ist, als bei ER negativen. Aus diesem Grund wurden die in der

Gesamtpopulation vorkommenden ER positiven Patientinnen zusätzlich getrennt analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 11 zu sehen. Erwartungsgemäß kann in dieser Subpopulation von Patientinnen eine bessere Klassifizierung nach Rückfallwahrscheinlichkeit getroffen werden, als in der Gesamtpopulation. Anhand der Methylierung des Promotors AB konnten zwei Patientinnengruppen mit jeweils 46% (64 von 139) und 29% (40 von 139) Rückfallwahrscheinlichkeit gebildet werden. Hierbei wurde wieder der Median der Methylierung als Schwellenwert verwendet. Wie auch in der Gesamtpopulation ist die Methylierung des Promotors C für diesen Zweck etwas schlechter geeignet. Die Gruppierung anhand der Methylierung dieses Promotors führte zu zwei Gruppen mit 42 % (59 von 139) und 32 % (45 von 139) Rückfallwahrscheinlichkeit.

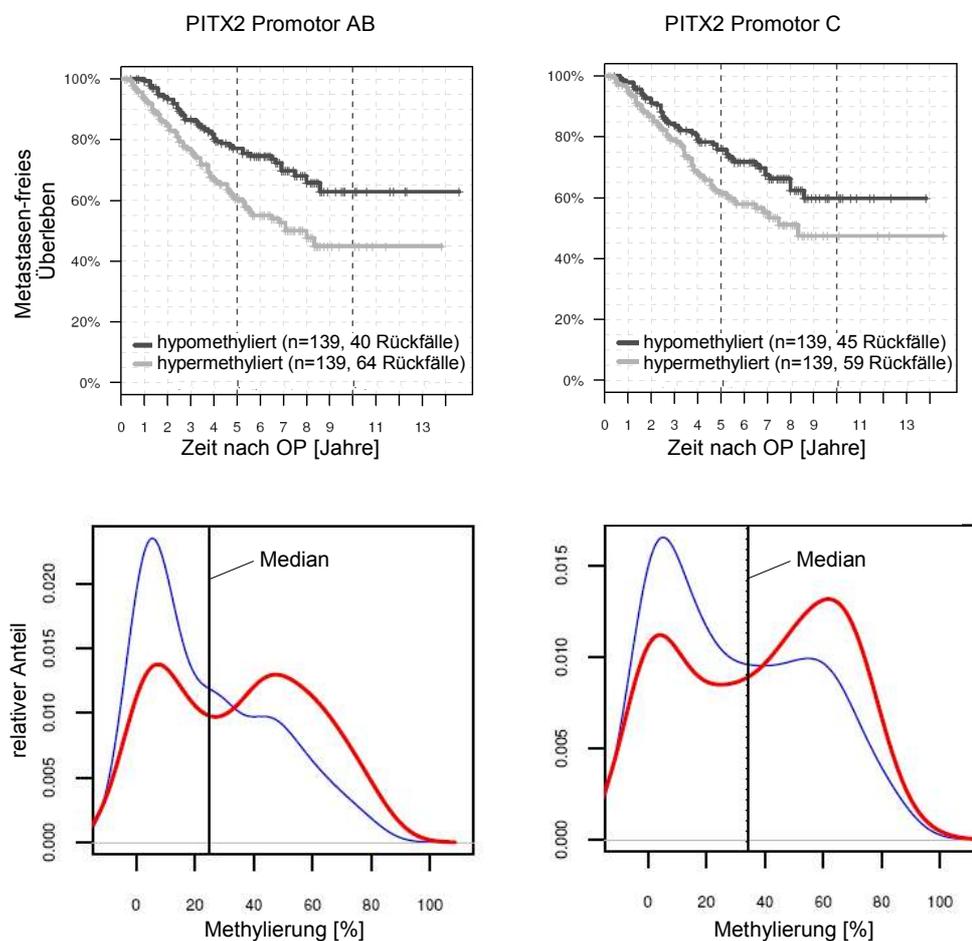


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebenskurven (oben) und Verteilung der Methylierung (unten) in der Subpopulation der ER positiven Patientinnen (278 Patientinnen) für beide PITX2 Promotoren (AB und C).

Auch die Verteilung der Methylierung innerhalb der ER positiven Patientinnensubpopulation (Abbildung 11 unten) zeigt ein sehr ähnliches Bild, wie bereits in der Gesamtpopulation.

Anhand der in den Abbildungen 10 und 11 dargestellten Kaplan-Meier-Überlebenskurven und Verteilungsdiagrammen ist das prognostische Potenzial der Methylierung beider Promotoren bereits gut zu erkennen. Eine weitere statistische Größe, über die die Qualität eines Markers beurteilt werden kann, ist die *Area Under the Curve* (AUC) der *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Als ROC wird im Rahmen dieser

Arbeit eine graphische Darstellung bezeichnet, bei der für alle möglichen Schwellenwerte (0%-100% Methylierung) des untersuchten Loci die Sensitivität über die Spezifität (genauer 100% - Spezifität) aufgetragen wird. Anders formuliert bedeutet das die Auftragung der richtig positiv über die falsch positiv klassifizierten Patientinnen, also den Anteil von den Rückfallpatientinnen, die richtig in die schlechte Prognosegruppe eingeteilt wurden, über den Anteil von den rückfallfreien Patientinnen die auch (falsch) in die schlechte Prognosegruppe eingestuft wurden. Ist ein Gen keine Methylierungsmarker, so gilt aus statistischen Gründen, dass für jeden Methylierungsschwellenwert der Anteil der falsch positiven und der richtig positiven Patientinnen verhältnismäßig gleich ist. Die graphische Darstellung ist so angeordnet, dass in diesem Fall die Fläche unter dem Graphen (AUC) 0,5 beträgt. Bei einem perfekten Methylierungsmarker sind alle Patientinnen mit Rückfall zu 0% methyliert, während die ohne Rückfall zu 100% methyliert wären oder umgekehrt. In diesem Fall würde für alle Schwellenwerte zwischen 0% und 100% eine richtige Einstufung der Patientinnen möglich sein und die Fläche unter dem Graphen wäre eins. Der Wert der AUC (zwischen 0,5 und 1) stellt also das Vermögen eines Methylierungsmarkers dar, zwischen Patientinnen, von denen ein Teil einen Rückfall erleidet und der andere nicht, zu unterscheiden, ohne dass vorher ein Schwellenwert festgelegt werden muss.

Abbildung 12 zeigt die ROC der beiden Promotoren AB und C in der Gruppe der ER positiven Patientinnen nach einem Beobachtungszeit-raum von 72 Monaten nach der Operation. Dabei wird das bereits anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurven erkennbare Ergebnis bestätigt: Die Methylierung beider Promotoren ist ein prädiktiver Marker, allerdings ist die des Promotors AB etwas besser ($AUC_{AB}=0,64$ versus $AUC_C=0,59$) geeignet.

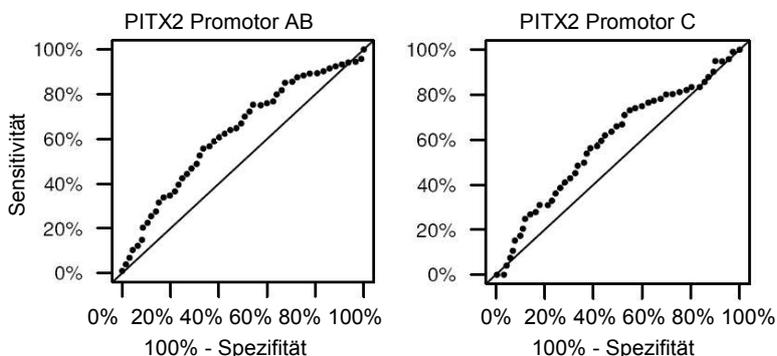


Abbildung 12: ROC Darstellung für beide PITX2 Promotoren (AB und C) nach 72 Monaten in der Östrogenrezeptor-positiven Subpopulation. ($AUC_{AB}=0,64$ versus $AUC_C=0,59$).

In Tabelle 3 sind zusammenfassend alle statistischen Kenngrößen für beide Promotoren des PITX2 Gens aufgelistet. Neben den bereits in Abbildung 12 gezeigten AUC nach 72 Monaten sind dort auch die AUC nach 36, 48 und 60 Monaten, sowie der p-Wert des Cox Proportional Hazard Models (ermittelt durch den Likelihood-

Ratio Test), die Separationscores (Effektgröße) nach Royston und Sauerbrei (2004) und der Konkordanzindex (AUC für Überlebensdaten) nach Harrell (1982) aufgelistet. Dabei wurden diese Analysen wieder sowohl in der Gesamtpopulation, als auch im Anteil der ER positiven Patientinnen durchgeführt.

Tabelle 3: Statistische Kenngrößen für beide Promotoren von PITX2 (AB und C). Dargestellt sind die zeitabhängigen AUC der ROC, der Konkordanzindex, der Separationscore und der p-Wert des Cox-Modells.

Population	Marker	Separations- score	Konkordanz- index	AUC (36 Monate)	AUC (48 Monate)	AUC (60 Monate)	AUC (72 Monate)	p-Wert
Gesamt	PITX2 AB	0,43	0,58	0,59	0,59	0,6	0,62	0,00020
	PITX2 C	0,11	0,52	0,5	0,53	0,54	0,54	0,084
ER positiv	PITX2 AB	0,55	0,61	0,63	0,63	0,63	0,64	0,00026
	PITX2 C	0,39	0,58	0,58	0,6	0,6	0,59	0,009

Die statistischen Kenngrößen in Tabelle 3 bestätigen die Erkenntnis, die schon anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurven optisch zu erkennen war, dass beide Promotoren in dieser Patientinnenpopulation zwar prognostische Marker sind, der Promotor C von PITX2 jedoch signifikant schlechtere Ergebnisse liefert. Gerade in der Gesamtpopulation ist der Promotor C kaum als Marker geeignet. Dies kann man gut anhand der AUC nach 36 Monaten erkennen. Diese beträgt 0,5, genau der AUC Wert einer ROC, der auf reinem Zufall basiert. Zwar nimmt dieser AUC Wert dann bis zum 72. Monat des Beobachtungszeitraums zu, jedoch ist der Wert nach 36 Monaten sehr aussagekräftig, da sich zu diesem Zeitpunkt noch die meisten Patientinnen unter Beobachtung befanden. Etwas besser ist der Promotor C in der Subpopulation der ER positiven Patientinnen als prognostischer Marker geeignet. Dort liegen die AUC für alle vier untersuchten Zeitpunkte zwischen 0,58 und 0,6, sind im Vergleich zu dem Promotor AB mit 0,61 bis 0,64 jedoch immer noch geringer. Dies lässt sich auch am p-Wert des Cox Modells erkennen, der den Promotor C zwar mit 0,009 statistisch signifikant als prognostischen Marker ausweist, allerdings liegt dieser p-Wert um ca. 1,5 Zehnerpotenzen höher als der für den Promotor AB. Diese Ergebnisse werden außerdem durch den Konkordanzindex und den Separationscore bestätigt.

5.2 Identifizierung neuer prognostischer und prädiktiver Methylierungsmarker

Die bereits in Kapitel 5.1.1 untersuchten Brustkrebs-Zelllinien wurden dazu verwendet, um neue potentiell prognostische Methylierungsmarker zu identifizieren. Dafür wurden zunächst Gene ausgesucht, die in einem biologischen Zusammenhang mit dem bekannten Marker PITX2 stehen könnten. Diese wurden dann mittels Bisulfit-Sequenzierung analysiert. Gene, die in den Zelllinien eine ähnliche Methylierung wie PITX2 aufwiesen, wurden dann weiter bei Patientinnenproben untersucht.

5.2.1 Identifizierung potentieller Methylierungsmarker in Zelllinien

Fünf verschiedene Gene (LHX3, LHX4, DLX4, PITX1 und PITX3) wurden ausgewählt, die in Zusammenhang mit PITX2 stehen könnten. Bei diesen fünf Genen handelte es sich ausschließlich wie bei PITX2 um Homeobox-Gene. LHX3, ein Gen, das durch PITX2 reguliert wird (Charles *et al.* 2005) besitzt mindestens zwei verschiedene Transkriptvarianten (A und B), deren Expression wahrscheinlich über zwei verschiedene Promotoren reguliert wird. Im Bereich der 5' UTRs beider Transkripte befindet sich jeweils eine CpG Insel, die beide untersucht wurden. Ebenfalls zwei alternative Promotoren besitzt auch PITX3, ein Gen der PITX Familie mit hoher Homologie zu PITX2 (Tremblay *et al.* 2000). Auch bei diesem Gen wurden diese beiden Promotoren analysiert. PITX1, das dritte und - soweit bekannt – letzte Gen der PITX Familie unterscheidet sich im Aufbau von PITX2 und PITX3, hat aber eine sehr ähnliche Funktion wie PITX2 (Tremblay *et al.* 2000). Es besitzt nur einen Promotor. Des Weiteren wurden LHX4 und DLX4 untersucht, die ebenfalls im Zusammenhang mit PITX2 stehen könnten (Schwartz *et al.* 2003, Mullen *et al.* 2007).

Abbildung 13 zeigt oben die Methylierung von PITX2 (Promotor AB) in den 35 untersuchten Zelllinien. Die Zelllinien sind dabei nach der PITX2 Methylierung sortiert: von links nach rechts nimmt die Methylierung von PITX2 ab. Unter PITX2 ist die Methylierung der beiden Gene uPA und TFF1 dargestellt, deren Eigenschaft als prognostische Biomarker bereits bekannt ist (Maier *et al.* 2005b, Jänicke *et al.* 2001). Zunächst kann man erkennen, dass bei den nach PITX2 Methylierung sortierten Zelllinien tendenziell auch die Methylierung von uPA dort höher ist, wo die PITX2 Methylierung am höchsten ist (links). Dies steht im Einklang mit dem bekannten Wissen, dass ebenfalls wie bei PITX2 eine hohe Methylierung von uPA mit einer schlechten Prognose korreliert. Diese Korrelation ist genau umgekehrt für TFF1. Eine erhöhte Methylierung in TFF1 korreliert mit einer guten Prognose. Dementsprechend sind die Zelllinien mit der erhöhten TFF1 Methylierung auch tendenziell eher rechts bei den nach PITX2 Methylierung sortierten Zelllinien zu finden. Dieser beschriebene Zusammenhang der Methylierung dieser drei prognostischen Marker ist wohl aufgrund der geringen Zahl von untersuchten Zelllinien statistisch nicht signifikant, jedoch augenscheinlich auffällig.

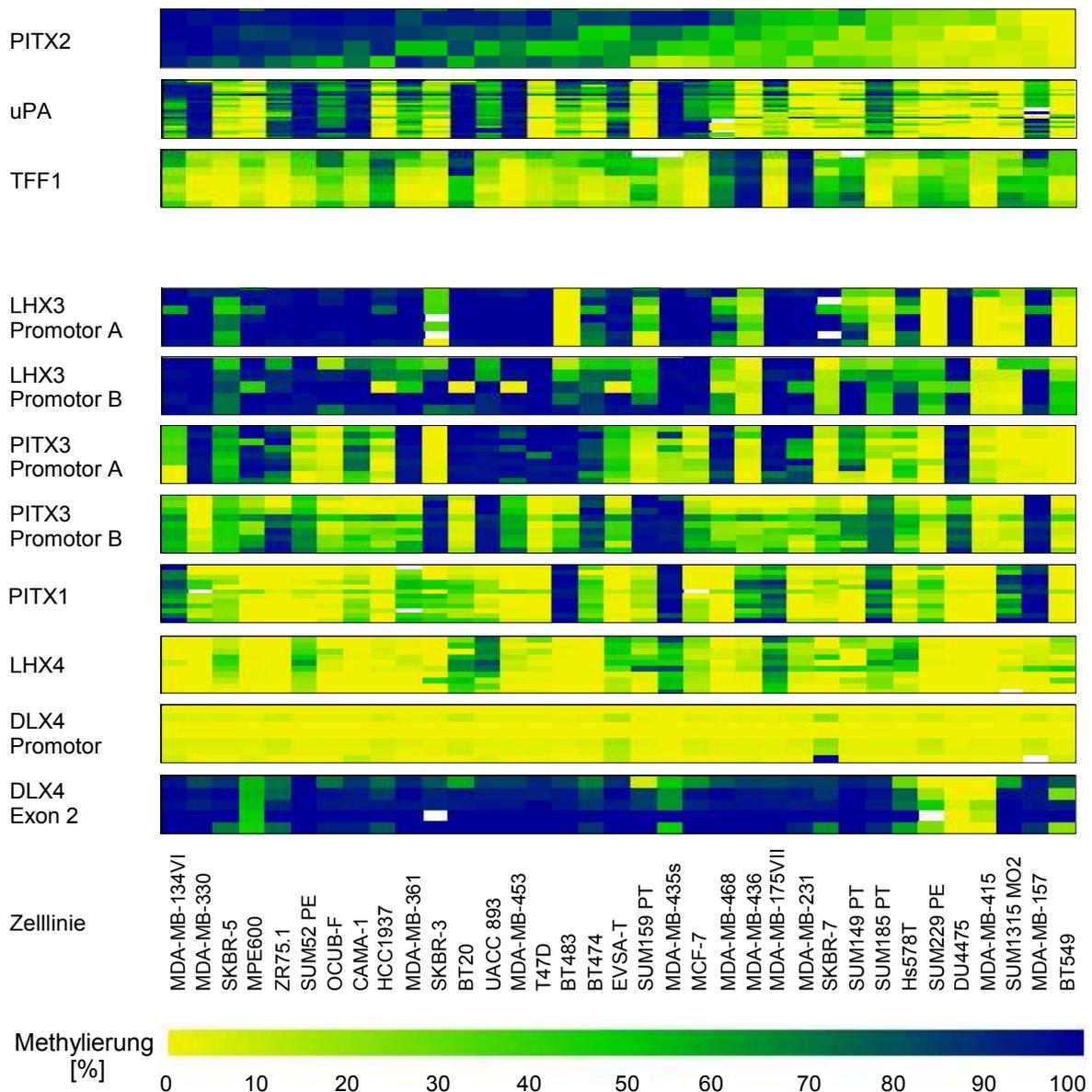


Abbildung 13: Methylierung von 8 verschiedenen Genen in 35 Brustkrebszelllinien. Die Zelllinien sind nach Methylierung im PITX2 Gen (Promotor AB) sortiert, die Methylierung nimmt von links nach rechts ab. Jede Spalte stellt eine analysierte Zelllinie dar. Jede farbige Zeile innerhalb eines Gens stellt ein CpG dar.

Unter der Methylierung der drei prognostischen Marker PITX2, uPA und TFF1 ist in Abbildung 13 die Methylierung der anderen untersuchten Gene aufgetragen. Die beiden Promotoren von LHX3 sind insgesamt in mehr Zelllinien methyliert, als es bei PITX2 der Fall ist. Dabei korreliert die Methylierung der beiden Promotoren von LHX3 miteinander in den jeweiligen Zelllinien bis auf wenige Ausnahmen sehr gut. Insgesamt sind die Zelllinien, die in LHX3 nicht methyliert sind, in Abbildung 13 auch eher rechts zu finden, d.h. dort, wo sich auch die Zelllinien befinden, die in PITX2 wenig methyliert sind. Es könnte auch hier eine Korrelation der Methylierung der beiden Gene PITX2 und LHX3 geben.

Betrachtet man in Abbildung 13 die Methylierung der beiden Promotoren von PITX3 in den Zelllinien, dann

kann man zunächst erkennen, diese nicht korrelieren. Insgesamt ist der Promotor B wesentlich weniger methyliert als der Promotor A. Viele der Zelllinien, die in PITX3 Promotor B methyliert sind, sind im Promotor A hingegen unmethyliert. Auch eine Korrelation der Methylierung der beiden PITX3 Promotoren mit der Methylierung von PITX2 ist nicht zu erkennen. Vergleicht man allerdings die Methylierung von PITX3 (Promotor A) mit der Methylierung der beiden LHX3 Promotoren, so fällt auf, dass PITX3 zwar weniger methyliert ist als LHX3, dafür aber fast alle Zelllinien, bei denen PITX3 (Promotor A) methyliert ist, auch LHX3 methyliert ist. Es könnte also einen Zusammenhang der Regulation dieser beiden Gene geben.

Die außerdem untersuchten Gene LHX4 und PITX1 sind in den untersuchten Zelllinien eher wenig methyliert. Einen Zusammenhang mit der PITX2 Methylierung scheint es bei diesen beiden Genen nicht zu geben.

Von DLX4 wurde sowohl eine CpG-Insel im Bereich des Promotors, als auch eine im Bereich des zweiten Exons untersucht. Abbildung 13 zeigt, dass der Promotor von DLX4 in allen Zelllinien nur sehr gering methyliert ist, wohingegen das Gen im Bereich des zweiten Exon sehr stark methyliert ist. Im Fall von DLX4 konnte also wieder eine ähnliche Beobachtung gemacht werden, wie es schon für PITX2 der Fall war: hohe Methylierung der CpG Inseln im Bereich der Exons, die nicht im Transkriptionsstartbereich liegen. Ein Zusammenhang zwischen der Methylierung einer der beiden DLX4 Loci mit der PITX2 Methylierung ist wiederum nicht zu erkennen.

5.2.2 Markervalidierung mit Patientinnenproben

Drei der Gene (LHX3, PITX1 und PITX3), deren Methylierung in den 35 Brustkrebszelllinien untersucht wurden, wurden nun in Patientinnenproben analysiert, um die Ergebnisse von 5.2.1 zu bestätigen.

Untersucht wurden wieder die in vier Gruppen aufgeteilten 94 ausgewählten Brustkrebspatientinnen, die schon in Kapitel 5.1.3 verwendet wurden. Allerdings wurde die Methylierung nun mittels Bisulfitsequenzierung analysiert. Die erhaltenen Methylierungswerte für jedes CpG wurden für jedes PCR Amplifikat gemittelt. Abbildung 14 zeigt das Ergebnis der Bisulfitsequenzierung der drei Gene PITX3, PITX1 und LHX3 in den vier verschiedenen Patientinnengruppen. Zusätzlich ist im linken Boxplot die Methylierung von PITX2 innerhalb dieser Patientinnengruppen dargestellt. Diese wurde innerhalb dieses Experimentes nicht nochmals gemessen. Auch die Gruppierung der 94 Patientinnen ist wieder dieselbe wie in Kapitel 5.1.3, d.h. eine Gruppe aus 16 Patientinnen, die eine geringe Methylierung von PITX2 vorweisen und keinen Rückfall erlitten haben (Gruppe A), eine Gruppe aus 17 Patientinnen mit hoher PITX2 Methylierung und rückfälligem Krankheitsverlauf (Gruppe B), einer Gruppe aus 31 Patientinnen mit geringer PITX2 Methylierung und erlittenem Rückfall (Gruppe C) und letztlich eine Gruppe aus 30 Patientinnen mit hoher PITX2 Methylierung und ohne Rückfall (Gruppe D). Dabei spiegeln die beiden kleineren aus 16 und 17 Patientinnen bestehenden Gruppen wieder die Patientinnen dar, deren Krankheitsverlauf durch PITX2 Methylierung als Biomarker richtig prognostiziert würde, wohingegen die beiden anderen, größeren Gruppen, diejenigen Patientinnen sind, bei denen ein solcher Test versagen würde.

Beim Vergleich der Methylierung von LHX3, PITX3 und PITX1 mit der Methylierung von PITX2 ist allerdings zu bedenken, dass PITX2 im Gegensatz zu den anderen Genen mit einem QM Assay gemessen wurde und somit die Absolutwerte der Methylierung nur bedingt vergleichbar sind.

Insgesamt konnten die bei der Analyse der Zelllinien gemachten Beobachtungen nach Sequenzierung der 94

Patientinnenproben bestätigt werden. So zeigt Abbildung 14, dass die Methylierung von LHX3 sich innerhalb der vier Patientinnengruppen ähnlich verhält, wie die Methylierung PITX2: Die Gruppen B und C sind tendenziell stärker methyliert, die Gruppen A und D. Die Korrelation der Methylierung beider Gene, die bei den Zelllinien beobachtet wurde, konnte also bestätigt werden. Bei PITX3 ist sehr auffällig, dass gerade Gruppe C, also die Gruppe der Patientinnen, die trotz hoher PITX2 Methylierung eine gute Prognose haben, im Vergleich zu Gruppe B niedriger methyliert ist. Folglich könnte PITX3 ein besserer prognostischer Marker als PITX2 sein, da weniger Patientinnen falsch positiv klassifiziert werden.

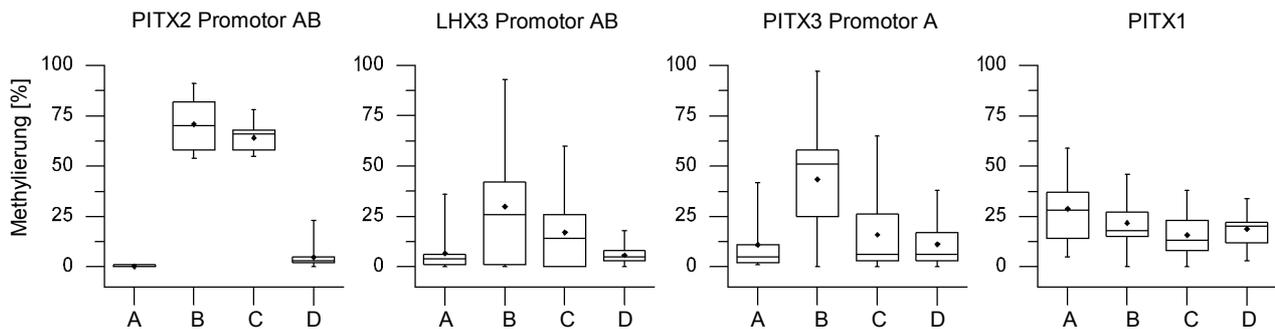


Abbildung 14: Methylierung der Gene PITX2 (Promotor AB), LHX3 (Promotor A), PITX3 (Promotor A) und PITX1 in vier Patientinnengruppen. Gruppe A: 16 Patientinnen mit niedriger Promotor AB Methylierung und guter Prognose; Gruppe B: 17 Patientinnen mit hoher Promotor AB Methylierung und schlechter Prognose; Gruppe C: 31 Patientinnen mit hoher Promotor AB Methylierung und guter Prognose; Gruppe D: 30 Patientinnen mit niedriger Promotor AB Methylierung und schlechter Prognose. Patientinnen der Gruppen A und B sind durch Promotor AB Methylierung richtig, Patientinnen der Gruppen C und D falsch klassifiziert worden. Die Daten für PITX2 beruhen auf einer QM Assay Bestimmung, nach der diese Proben ausgewählt wurden. Die anderen Gene wurden mittels Bisulfidsequenzierung untersucht.

Auch im Fall von PITX1 konnten die unter 5.2.1 gemachten Beobachtungen bestätigt werden: Insgesamt ist dieses Gen geringer methyliert als die anderen untersuchten Gene und es gibt keine Korrelation mit der PITX2 Methylierung und demzufolge auch wahrscheinlich nicht mit der Prognose der Patientinnen nach der Brustkrebsoperation.

5.2.3 Analyse weiterer Kandidatengene in Patientenproben

Die Ergebnisse aus 5.2.1 und 5.2.2 zeigten, dass es mit Zelllinien und ausgewählten Patientinnenproben als Modell möglich ist, schnell und kostengünstig neue potentielle Marker zu identifizieren. Um eine noch höhere Zahl von Markerkandidaten untersuchen zu können, wurde diese Vorgehensweise noch weiter vereinfacht. Dazu wurden 12 Patientinnenproben aus der Population von 94 Patientinnen gewählt, die bereits unter 5.1.3 und 5.2.2 verwendet wurden. Von den zwölf ausgewählten Proben kamen jeweils vier aus den Gruppen A, B und C. Aus der Gruppe der Patientinnen, die trotz geringer PITX2 Methylierung einen Rückfall bekamen (Gruppe D), also falsch klassifiziert wurden, wurden keinen Proben gewählt. Diese Entscheidung beruhte darauf, dass in dieser Gruppe die fehlende PITX2 Methylierung einfach auf einen zu geringen Anteil an Tumorzellen zurückzuführen sein könnte, sodass auch weitere potentielle Marker dort ebenfalls unauffällig wären. Dies sollte unbedingt vermieden werden, da eine Anzahl von zwölf Proben ohnehin zu gering war, um eine statistisch haltbare Aussage zu treffen und nur Gene identifiziert werden sollten, die in der untersuchten

Patientinnenpopulation überhaupt Unterschiede der Methylierung zeigten und somit in dieser Fragestellung eine Rolle spielen könnten.

Insgesamt wurden für 52 verschiedene Gene 74 PCR Amplifikate entworfen und anschließend die zwölf Patientinnenproben sequenziert. Nach der Sequenzierung wurden das Potenzial dieser Gene ein Marker zu sein bewertet. Dazu wurden vier verschiedene Ränge, je nach Methylierung in diesen zwölf Proben, vergeben:

- Rang 1: ähnliche Methylierung wie PITX2
- Rang 2: (große) Unterschiede in der Methylierung jedoch nicht ähnlich wie PITX2
- Rang 3: (kleine) Unterschiede in der Methylierung, ebenfalls nicht ähnlich wie PITX2
- Rang 4: keine differentielle Methylierung
- Rang 5: nicht analysierbar wegen schlechter Sequenzierbarkeit der PCR Amplifikate

Die analysierten Gene und ihre Einteilung nach Rängen ist in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Liste der in 12 ausgewählten Brustkrebsproben untersuchten Gene. Pro Gen wurden bis zu 4 Amplifikate untersucht. Die Gene wurden je nach Methylierung der zwölf Proben mit Rang 1-5 bewertet (Definition der Ränge siehe Text). Gene, die weiter in einer Chipstudie untersucht wurden, sind mit „x“ markiert.

Gene	Amplifikat No.	Rang	Chip	Gene	Amplifikat	Rang	Chip	Gene	Amplifikat No.	Rang	Chip
BARX1	1	1	x	LHX4	2	2		LDB1	2	4	
BARX1	2	1		NR5A1	1	2	x	LMX1B	1	4	
BMP2	1	1	x	PITX3	2	2		LMX1B	2	4	
BMP4	1	1	x	DLX2	1	3		MSX1	1	4	
GAD1	1	1	x	DLX2	2	3		MSX2	1	4	
GATA4	1	1		FGF8	1	3		NCOR1	1	4	
GATA4	2	1		GATA2	1	3		NR0B1	2	4	
GATA4	3	1		LEF1	1	3		PAX2	2	4	
GATA4	4	1	x	LMO4	2	3		PAX9	1	4	
ISL1	1	1	x	NR0B1	1	3		PITX1	1	4	
LHX3	1	1		PAX2	1	3		PROP1	1	4	
LHX3	2	1	x	TCF1	1	3		SMAD4	1	4	
LHX3	3	1		BRMS1	1	4		TCF7L1	1	4	
LHX4	1	1	x	CCND1	1	4		TDGF1	1	4	
LMO2	1	1	x	CITED2	1	4		TGFB1	1	4	
LMX1A	1	1	x	CREBBP	1	4		TRRAP	1	4	
PITX3	1	1	x	CTNNB1	1	4		DLX4	1	5	
POU4F1	1	1	x	EP300	1	4		DLX4	2	5	
TCF4	1	1	x	FGFR1	1	4		HDAC1	2	5	
ZFN1A1	1	1	x	GATA3	1	4		LDB1	3	5	
CCND2	1	2	x	GATA6	1	4		LEF1	2	5	
FGF4	1	2	x	HDAC1	1	4		NODAL	1	5	
GAD1	2	2		HTATIP	1	4		POU4F2	1	5	
GATA4	5	2		HTATIP	2	4		TGFB1	2	5	
LHX3	4	2		LDB1	1	4					

Dabei wurden für einige Gene mehrere Amplifikate untersucht, da in diesen Genen entweder mehr als eine CpG Insel vorkam oder sich ein Design von PCR Amplifikaten als schwierig erwies. Da Gene, die sich nach diesem Experiment als mögliche Marker Kandidaten erweisen, anschließend in einer DNA Chip Studie untersucht werden sollten, wurden auch für die Gene LHX3 und PITX3 neue PCR Amplifikate entworfen und in diesem Experiment untersucht. Dies ist darin begründet, dass für PCR Amplifikate, die für eine Chipstudie geeignet sind, eine bestimmte Mindestlänge und CpG-Dichte notwendig ist, die die bisher verwendeten Amplifikate nicht aufwiesen.

Von den insgesamt 52 verschiedenen untersuchten Genen konnte von 49 Genen mindestens ein Amplifikat erfolgreich analysiert werden. Dabei zeigten 17 Gene bei mindestens einem Amplifikat eine differentielle Methylierung nach Rang eins und zwei (Tabelle 4). Von diesen 17 Genen wurde jeweils das Amplifikat für eine weitere Untersuchung ausgewählt, dessen Methylierung der von PITX2 am ähnlichsten war und in einer folgenden Chip-Studie weiter untersucht. Diese ausgewählten Amplifikate sind in Tabelle 4 markiert.

5.2.4 DNA-Chip Studie

Für eine statistisch valide Beurteilung der Qualität eines Biomarkers ist die Untersuchung einer größeren Patientenpopulation notwendig. Um die in dieser Arbeit bisher gefundenen potentiellen Marker Kandidaten in einer solchen Population untersuchen zu können, wurde eine DNA Chipstudie konzipiert. Dabei wurde das gleiche Patientinnenmaterial verwendet, das bereits für die Untersuchung der beiden PITX2 Promotoren in der Real-Time PCR Studie (5.1.4) verwendet wurde. Bei dieser Chipstudie wurden insgesamt 64 PCR Amplifikate von unterschiedlichen Loci untersucht. Neben Genen, die für diese Arbeit keine Rolle spielten und hier nicht weiter berücksichtigt werden, wurden die 17 in Kapitel 5.2.3 identifizierten Marker Kandidaten untersucht. Als Vergleich wurden zusätzlich beide PITX2 Promotoren, sowie die Gene TFF1 und uPA analysiert, sodass insgesamt 21 PCR Amplifikaten untersucht wurden, die im Rahmen dieser Arbeit relevant sind. Jedes dieser Amplifikate wurde durch drei bis fünf verschiedenen Oligopaare, d.h. jeweils einem Oligo für den methylierten und ein Oligo für den unmethylierten Zustand an der entsprechenden Position, abgedeckt. Für die statistische Beurteilung der einzelnen Marker Kandidaten wurden sowohl die Ergebnisse der Oligopaare einzeln, als auch über das Amplifikat gemittelt betrachtet. Als Mittel der Oligopaare wurde dabei der Median gewählt, um den Einfluß möglicher Ausreißer zu minimieren. Zur statistischen Bewertung der Daten wurden wieder die Modelle verwendet, die bereits unter 5.1.4 kurz beschrieben sind, d.h. es wurde der p-Wert für das Cox Proportional Hazard Modell berechnet, die AUC der ROC nach 36, 48, 60 und 72 Monaten Nachbeobachtungszeit, der Konkordanzindex und die prognostische Separationscore bestimmt. Wie auch schon bei der Real-Time PCR basierten Analyse der beiden Promotoren für PITX2 wurde sowohl die gesamte Patientinnenpopulation, als auch die beiden Subpopulationen der ER negativen bzw. positiven Patientinnen betrachtet.

In den Tabellen 5-7 sind die statistischen Kenngrößen für die 21 verschiedenen Loci in der gesamten und in den entsprechenden Patientinnen-Subpopulationen aufgelistet. Dabei sind die Loci nach aufsteigendem p-Wert des Cox Proportional Hazard Modells sortiert. Folglich sind die nach diesem Modell besten Marker in der Liste ganz oben zu finden. Dargestellt sind in diesen Tabellen nur die Ergebnisse für das jeweilige gesamte PCR Amplifikat und nicht für die einzelnen Oligopaare. Die Ergebnisse für die einzelnen Oligopaare

in den betrachteten Populationen sind im Anhang aufgelistet (Seite 163, Tabelle 18).

Zunächst sieht man, dass in der Gesamtpopulation (Tabelle 5) das Ergebnis der Real-Time PCR Studie (5.1.4) für den Promotor AB von PITX2 auch in der Chipstudie bestätigt werden konnte. Die Methylierung dieses Promotors ist ein prädiktiver Marker in dieser Patientinnenpopulation (p-Wert = 0,0022). Im Gegensatz dazu konnte der Promotor C jedoch nicht als statistisch signifikanter Marker bestätigt werden (p-Wert = 0,24). Es konnte ebenfalls der als prognostisch bekannte Marker uPA bestätigt werden (p-Wert 0,0026), nicht jedoch TFF1, der ebenfalls als prädiktiver Marker für eine Behandlung mit Tamoxifen bekannt war (p-Wert = 0,34). Berücksichtigt man alle erhobenen statistischen Kenngrößen, so erweisen sich uPA und PITX2 (Promotor AB) als vergleichbar gute Marker in dieser Patientinnenpopulation. Zusätzlich konnten in dieser Chipstudie neue Marker identifiziert werden, die ebenfalls eine vergleichbar gute Prognose zulassen. Besonders die Gene NR5A1, FGF4 und CCND2 zeigen nahezu die gleichen statistischen Merkmale wie PITX2 und uPA. Mit BMP4 konnte jedoch auch ein Gen gefunden werden, welches ein signifikant besserer Marker ist als uPA und PITX2. Dies wird ausnahmslos durch alle statistischen Modelle bestätigt. Insgesamt konnten in dieser Studie neben PITX2 (Promotor AB) und uPA neun neue Gene gefunden werden, die einen p-Wert von kleiner als 0,05 zeigten. Ein guten Hinweis darauf, dass es sich bei diesen Ergebnissen nicht um Artefakte handelt, gibt die Tatsache, dass bei den Genen mit niedrigen p-Wert für die gemittelten (Median) Oligodaten in der Regel auch die einzelnen Oligos selbst konkordant niedrige p-Werte zeigten (siehe Anhang).

Tabelle 5: Ergebnisse der Chipstudie in der Gesamtpopulation (384 Patientinnen). Dargestellt sind für jedes untersuchte Gen der Konkordanzindex, die Separationscore, die zeitabhängigen AUCs und der p-Wert des Cox Modells. Die Ergebnisse basieren auf dem Median aller Oligos eines PCR Amplifikates.

Gen	Separations- score	Konkordanz- index	AUC (36 Monate)	AUC (48 Monate)	AUC (60 Monate)	AUC (72 Monate)	p-Wert
BMP4	0,44	0,59	0,62	0,64	0,61	0,61	0,00056
PITX2 ^a	0,36	0,58	0,6	0,59	0,6	0,6	0,0022
uPA	0,4	0,57	0,58	0,59	0,58	0,59	0,0026
NR5A1	0,41	0,56	0,59	0,58	0,58	0,59	0,0030
FGF4	0,4	0,57	0,58	0,59	0,6	0,6	0,0030
CCND2	0,35	0,58	0,6	0,61	0,59	0,6	0,0034
GATA4	0,34	0,58	0,61	0,6	0,6	0,6	0,0094
LMX1A	0,33	0,57	0,6	0,59	0,58	0,58	0,013
ZNFN1A1	0,3	0,55	0,56	0,56	0,55	0,56	0,020
BARX1	0,27	0,55	0,55	0,56	0,57	0,57	0,030
LHX4	0,18	0,53	0,54	0,53	0,52	0,54	0,036
LHX3	0,25	0,54	0,55	0,55	0,54	0,54	0,052
TCF4	0,19	0,54	0,54	0,53	0,52	0,54	0,066
BMP2	0,19	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,074
ISL1	0,17	0,53	0,51	0,54	0,54	0,54	0,13
LMO2	0,18	0,54	0,58	0,55	0,53	0,54	0,20
POU4F1	0,17	0,53	0,53	0,54	0,54	0,56	0,21
GAD1	0,17	0,52	0,53	0,54	0,52	0,52	0,24
PITX2 ^c	0,15	0,54	0,53	0,55	0,55	0,55	0,24
TFF1	0,16	0,52	0,49	0,5	0,52	0,53	0,34
PITX3	0,04	0,5	0,51	0,52	0,49	0,49	0,53

^a Promotor der Transkripte A und B, ^c Promotor des Transkripts C

Tabelle 5 zeigt auch, dass die beiden im Rahmen der Experimente mit den Brustkrebszelllinien identifizierten (5.2.1) und bereits auf einigen ausgewählten Patientinnenproben validierten (5.2.2) Marker LHX3 und PITX3 nicht als prädiktive Marker für eine Behandlung mit Anthrazyklin bestätigt werden konnten. Diese Beobachtung wird auch durch die beiden statistischen Kenngrößen Konkordanzindex und Separationscore bestätigt.

Die Ergebnisse in der Population der 284 ER positiven Patientinnen ist in Tabelle 6 dargestellt. Da diese Subpopulation mit 74 % den Großteil der Gesamtpopulation darstellt, sind auch dort die Ergebnisse zu beobachten, die schon für die Gesamtpopulation beschrieben wurden. Der Promotor AB von PITX2 und uPA sind (vergleichbar) gute Marker, TFF1 und der PITX2 Promotor C jedoch nicht. PITX3 konnte auch in dieser Subpopulation nicht als Marker bestätigt werden, dagegen zeigt die Methylierung von LHX3 eine statistisch signifikante Eigenschaft als Marker (p -Wert = 0,034).

Tabelle 6: Ergebnisse der Chipstudie in der Subpopulation der ER positiven Patientinnen (284 Patientinnen). Dargestellt sind für jedes untersuchte Gen der Konkordanzindex, die Separationscore, die zeitabhängigen AUCs und der p -Wert des Cox Modells. Die Ergebnisse basieren auf dem Median aller Oligos eines PCR Amplifikates.

Gen	Separations- score	Konkordanz- index	AUC (36 Monate)	AUC (48 Monate)	AUC (60 Monate)	AUC (72 Monate)	p -Wert
BMP4	0,64	0,62	0,67	0,68	0,64	0,63	0,000030
NR5A1	0,67	0,62	0,68	0,65	0,63	0,63	0,000046
BARX1	0,51	0,6	0,63	0,63	0,62	0,62	0,0015
FGF4	0,5	0,6	0,63	0,63	0,64	0,62	0,0017
PITX2 ^a	0,44	0,61	0,65	0,62	0,62	0,62	0,0019
ZNFN1A1	0,43	0,59	0,63	0,62	0,59	0,6	0,0029
LMX1A	0,45	0,6	0,67	0,64	0,6	0,61	0,0032
uPA	0,37	0,57	0,59	0,6	0,58	0,59	0,0046
LHX4	0,33	0,56	0,62	0,58	0,55	0,57	0,0060
GATA4	0,38	0,59	0,64	0,62	0,61	0,61	0,0067
CCND2	0,36	0,58	0,61	0,62	0,59	0,6	0,016
BMP2	0,25	0,55	0,58	0,56	0,56	0,57	0,024
TCF4	0,3	0,56	0,59	0,57	0,55	0,57	0,025
ISL1	0,32	0,56	0,57	0,58	0,57	0,56	0,030
LHX3	0,33	0,56	0,6	0,58	0,56	0,55	0,034
LMO2	0,26	0,55	0,61	0,57	0,55	0,56	0,091
POU4F1	0,23	0,56	0,58	0,58	0,57	0,58	0,13
PITX3	0,15	0,53	0,56	0,56	0,51	0,51	0,18
GAD1	0,19	0,53	0,56	0,55	0,52	0,52	0,23
PITX2 ^c	0,17	0,54	0,54	0,56	0,55	0,55	0,29
TFF1	0,18	0,52	0,5	0,5	0,52	0,52	0,35

^a Promotor der Transkripte A und B, ^c Promotor des Transkripts C

Zusätzlich zu BMP4, das bereits in der Gesamtpopulation eine durch alle statistischen Kenngrößen validierte bessere Markerqualität als PITX2 (Promotor AB) zeigte, konnte in der ER positiven Subpopulation mit NR5A1 ein weiteres solches Gen identifiziert werden. Das Gen FGF4, das bereits in der Gesamtpopulation ähnlich

gute Ergebnisse wie PITX2 zeigte, konnte auch in dieser Subpopulation als Marker so wiedergefunden werden. Dazu kommen mit BARX1 und ZNFN1A1 zwei weitere Gene mit ähnlichen Qualitäten wie PITX2 (Promotor AB). Im Gegensatz dazu hat CCND2 im Vergleich zu PITX2 (Promotor AB) in der Gruppe der ER positiven Patientinnen etwas schlechter abgeschnitten, als in der Gesamtpopulation. Von den 21 untersuchten Loci zeigten in dieser Subpopulation lediglich sechs einen p-Wert $> 0,05$, darunter der Promotor C von PITX2, TFF1 und PITX3.

Ein direkter Vergleich der Ergebnisse für beide PITX2 Promotoren in der Chipstudie ist in Abbildung 35 dargestellt. Dort sind sowohl die Kaplan-Meier-Überlebenskurven (basierend auf optimierten und medianem Schwellenwert) und die Verteilung der Methylierung in allen Patientinnen der ER positiven Subpopulation dargestellt. Diese Darstellung entspricht der Darstellung der QM Assay Ergebnisse (Seite 58, Abbildung 11) vergleichbar, bis auf den Unterschied, dass hier auch die Patientinnen in der Analyse berücksichtigt wurden, die in der QM Assay Studie entsprechend der Qualitätskriterien ausgeschlossen wurden. Der Vergleich beider Studien zeigt, dass die Ergebnisse für den Promotor AB sowohl mit QM Assay, als auch in dieser Chipstudie sehr ähnlich sind. In der QM Assay Studie führte eine Gruppierung mit dem Median als Schwellenwert zu zwei Gruppen mit jeweils 139 Patientinnen mit 29 % Rückfallwahrscheinlichkeit in der gute Prognosegruppe (40 von 139 Patientinnen) und 46 % in der schlechte Prognosegruppe (64 von 139 Patientinnen). Vergleichbar konnten in der Chipstudie zwei Gruppen gebildet werden mit 30 % (42 von 142 Patientinnen) und 44 % (62 von 142 Patientinnen) Rückfallwahrscheinlichkeit. Beide Technologien führen in diesem Fall also zu nahezu dem gleichen Resultat. Dies ist zusätzlich an der Verteilung der Methylierung in der Patientinnenpopulation zu erkennen (Abbildung 35, unten links). Auch diese Darstellung ist für den QM Assay und die Chipergebnisse sehr ähnlich, es sind bei den Patientinnen mit erlittenem Rückfall deutlich zwei Gruppen (lokale Maxima) zu erkennen. Diese beiden lokalen Maxima sind allerdings in der Darstellung für den Promotor C nicht mehr zu finden (Abbildung 35, unten rechts). Da jedoch die QM Assay Ergebnisse auch für diesen Promotor diese beiden lokalen Maxima zeigten, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass für diesen Promotor der Chip nicht so zuverlässig funktioniert hat. Dies spiegelt sich auch in der Aufteilung in die beiden gute und schlechte Prognosegruppen wider, die im Fall des QM Assays entsprechend 32 % (45 von 139) und 42 % (59 von 139) Rückfallwahrscheinlichkeit hatten, in der Chipstudie jedoch nur 34 % (48 von 142) und 39 % (56 von 142).

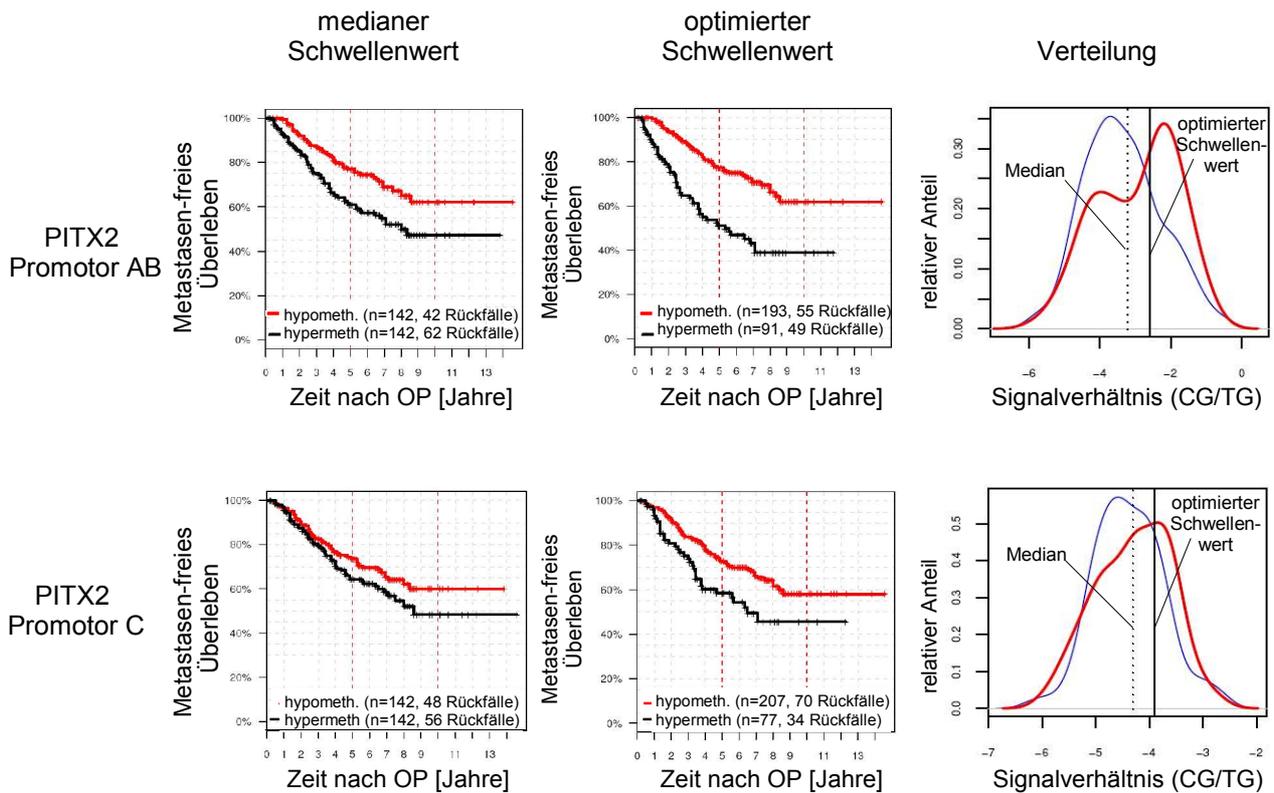


Abbildung 15: Vergleich der Ergebnisse der Chipstudie für beide PITX2 Promotoren in der Subpopulation der ER positiven Patientinnen. Links und Mitte: Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit medianem und optimiertem Schwellenwert; rechts: Verteilung der Methylierung beider Promotoren in der Population (Patientinnen mit [rot] und ohne Rückfall [blau]).

Eine Verwendung eines optimierten Schwellenwertes für die Gruppierung konnte ebenfalls nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse für den Promotor C im Vergleich zum Promotor AB führen. In diesem Fall ergeben sich für den Promotor AB zwei Gruppen mit 28 % (55 von 193) und 54 % (49 von 91) Rückfallwahrscheinlichkeit. Für den Promotor C hatte diese beiden Prognosegruppen eine Rückfallwahrscheinlichkeit von 34 % (70 von 207) und 44 % (34 von 77).

Für die beiden Gene BMP4 und NR5A1 sind in Abbildung 16 zusätzlich die Kaplan-Meier-Überlebenskurven (mit medianem und optimiertem Schwellenwert), sowie die Verteilung der Methylierung in der Patientinnenpopulation (ER negative Subpopulation) dargestellt. Anhand der Kaplan-Meier-Überlebenskurven lässt sich dabei gut das prognostische Potenzial dieser beiden Gene erkennen. So führt eine Klassifizierung mit BMP4 und Verwendung des optimierten Schwellenwertes zur Bildung von einer Gruppe mit 57 % Rückfallwahrscheinlichkeit (34 von 60 Patientinnen sind rückfällig) und einer Gruppe mit 31 % Rückfallwahrscheinlichkeit (70 von 224 Patientinnen sind rückfällig). Auch bei Anwendung des Medians der Methylierung als Schwellenwert ist mit BMP4 noch eine gute Klassifizierung der Patientinnen in eine gute und eine schlechte Prognosegruppe möglich. Hier haben diese beiden Gruppen mit jeweils 142 Patientinnen entsprechend 27% und 46 % Rückfallwahrscheinlichkeit (39 bzw. 65 Rückfälle in den beiden Gruppen). Die Verteilung der Methylierung zeigt auch bei BMP4 wieder ein ähnliches Bild, wie es schon bei PITX2 in der Real-Time PCR Studie gefunden wurde. Die Patientinnen, die einen Rückfall erlitten hatten, zeigen deutlich

zwei lokale Maxima bei niedriger und bei hoher Methylierung. Das zweite lokale Maximum bei hoher Methylierung ist in der Gruppe der Patientinnen ohne Rückfall nahezu nicht mehr zu erkennen.

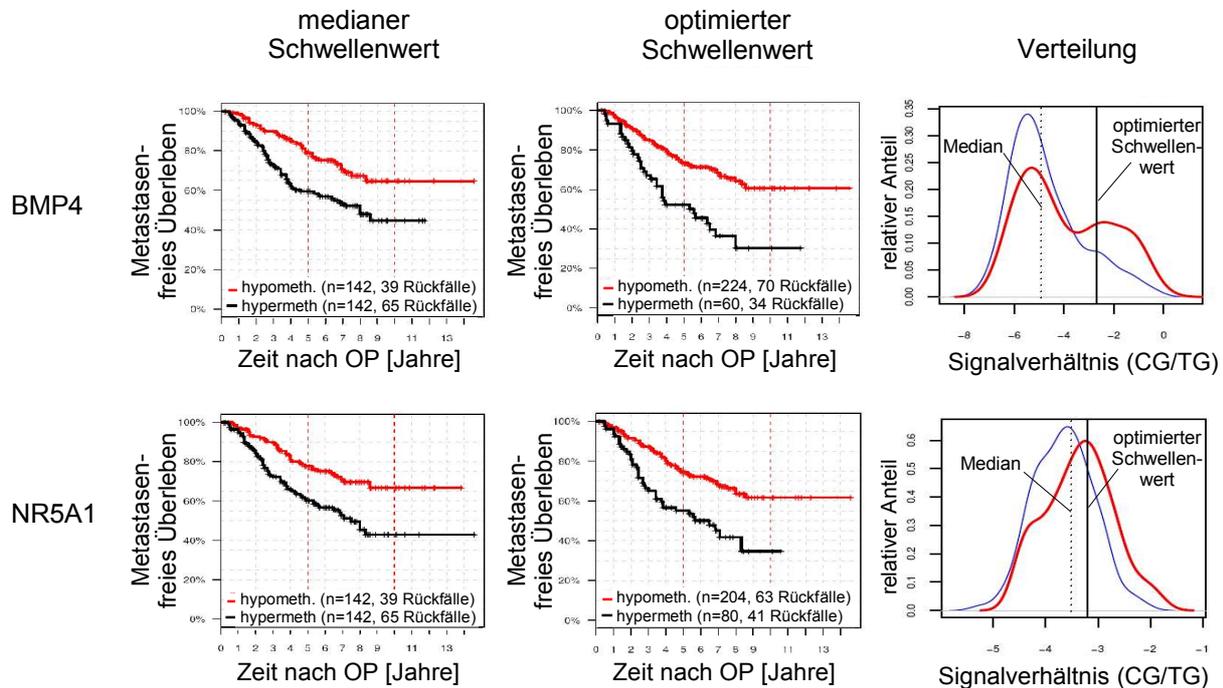


Abbildung 16: Ergebnisse der Chipstudie für die Gene BMP4 und NR5A1 in der Subpopulation der ER positiven Patientinnen. Links und Mitte: Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit medianem und optimiertem Schwellenwert; rechts: Verteilung der Methylierung beider Promotoren in der Population (Patientinnen mit [rot] und ohne Rückfall [blau]).

Die Einteilung in eine gute und eine schlechte Prognosegruppe ist unter Verwendung des medianen Schwellenwertes bei NR5A1 genauso gut möglich, wie auch bei BMP4. Auch hier können wieder zwei Gruppen mit 27 % und Rückfallwahrscheinlichkeit gebildet werden. Die Auftrennung nach verwendetem optimiertem Schwellenwert ist dann allerdings geringfügig schlechter als bei BMP4. In diesem Fall haben die beiden Prognosegruppen dann 31 % und 51 % Rückfallwahrscheinlichkeit. Der Grund für das etwas schlechtere Abschneiden bei optimiertem Schwellenwert könnte das Verteilungsdiagramm zeigen. Dort sieht man im Falle von NR5A1 nicht die für PITX2 und BMP4 beschriebenen zwei lokalen Methylierungsmaxima. Vielmehr ist die Gruppe der rückfälligen Patientinnen insgesamt höher methyliert als die Gruppe der Patientinnen ohne Rückfall. Die Maxima der Methylierung dieser beiden Gruppen liegen eng beieinander, sodass in diesem Fall der medianen Schwellenwert bereits nahe am optimierten Schwellenwert liegt.

Wie bereits beschrieben konnten die beiden in den vorhergehenden Experimenten gefundenen prognostischen Marker LHX3 und PITX3 in dieser Patientinnenpopulation nicht als Marker bestätigt werden. Dabei wurden bisher nur die medianen Ergebnisse aller für das jeweilige Amplifikat verwendeten Chipoligopaare betrachtet. In Tabelle 18 (Anhang Seite 163) sind zusätzlich alle berechneten statistischen Kenngrößen für die jeweiligen einzelnen Oligopaare aufgelistet. Dort ist zu erkennen, dass die p-Werte des Cox Proportional Hazard Modells bei den fünf Oligopaaren für PITX3 zwischen 0,026 und 0,91 liegen (in der ER positiven Gruppe). Bei LHX3 liegt diese Varianz der p-Werte zwischen den fünf Oligopaaren bei 0,034 bis 0,62. Diese höhere Varianz könnte das Ergebnis der Chipstudie für diese beiden Gene beeinflusst haben.

In Tabelle 7 das Ergebnis aller untersuchten Gene in der ER negativen Subpopulation dargestellt. Mit nur 97 Fällen ist diese Subpopulation jedoch sehr klein, sodass es kaum möglich ist, hier eine eindeutige Aussage über die Qualität der potentiellen Marker zu treffen. Die besten Ergebnisse erzielten in dieser Subpopulation die beiden Gene CCND2 und uPA.

Tabelle 7: Ergebnisse der Chipstudie in der Subpopulation der ER negativen Patientinnen (97 Patientinnen). Dargestellt sind für jedes untersuchte Gen der Konkordanzindex, die Separationscore, die zeitabhängigen AUCs und der p-Wert des Cox Modells. Die Ergebnisse basieren auf dem Median aller Oligos eines PCR Amplifikates.

Gen	Separations- score	Konkordanz- index	AUC (36 Monate)	AUC (48 Monate)	AUC (60 Monate)	AUC (72 Monate)	p-Wert
CCND2	0,4	0,59	0,61	0,59	0,59	0,59	0,077
uPA	0,64	0,63	0,65	0,64	0,64	0,64	0,11
PITX2 ^a	0,26	0,56	0,57	0,57	0,57	0,57	0,17
FGF4	0,33	0,55	0,57	0,57	0,57	0,57	0,21
PITX2 ^c	0,32	0,57	0,59	0,59	0,59	0,59	0,24
GATA4	0,36	0,59	0,61	0,6	0,6	0,6	0,29
LHX3	0,25	0,55	0,54	0,55	0,55	0,55	0,30
POU4F1	0,28	0,55	0,56	0,57	0,57	0,57	0,33
GAD1	0,29	0,55	0,55	0,57	0,57	0,57	0,40
TFF1	0,32	0,56	0,56	0,58	0,58	0,58	0,40
PITX3	0,15	0,53	0,55	0,54	0,54	0,54	0,45
LHX4	0,06	0,5	0,54	0,49	0,49	0,49	0,62
LMO2	0,13	0,51	0,53	0,54	0,54	0,54	0,63
BARX1	0,07	0,51	0,53	0,51	0,51	0,51	0,77
LMX1A	0,12	0,52	0,53	0,54	0,54	0,54	0,80
ZNFN1A1	0,22	0,54	0,54	0,54	0,54	0,54	0,80
NR5A1	0,1	0,53	0,53	0,54	0,54	0,54	0,84
BMP2	-0,05	0,51	0,5	0,48	0,48	0,48	0,88
ISL1	-0,03	0,5	0,5	0,53	0,53	0,53	0,92
BMP4	0,02	0,49	0,48	0,48	0,48	0,48	0,93
TCF4	-0,08	0,49	0,46	0,45	0,45	0,45	0,99

^a Promotor der Transkripte A und B, ^c Promotor des Transkripts C

5.3 Methylierungsheterogenität innerhalb von Patientenproben

Ein Tumor ist hinsichtlich seiner Zusammensetzung sehr heterogen. Wie im normalen Gewebe kommen dort Zelltypen wie Stroma-, Fett-, Muskel- und Epithelzellen vor. Im Tumor treten zusätzlich entartete Epithelzellen (Tumorzellen) und gegebenenfalls Tumor-infiltrierende Lymphozyten auf. DNA Methylierung ist bekannt dafür, eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung zu spielen (Riggs 1997, Bird 1986) und ist somit offensichtlich zelltypabhängig. Zusätzlich ist denkbar, dass innerhalb eines Zelltyps je nach Umfeld oder Position im Tumor oder bei Tumorzellen auch je nach Zellgeneration, sich die Methylierung ändert.

Untersucht man nun die Methylierung in einem Teil des Tumors, und verwendet dabei Dünnschnitte des Tumors oder Biopsien, so entspricht das Ergebnis dem gewichteten Durchschnitt der Methylierung aller in der Probe enthaltenen unterschiedlichen Zelltypen. Wie sich dies im Detail auf das Ergebnis der Methylierungsanalyse auswirkt, wurde im folgenden auf verschiedenen Ebenen untersucht. Zunächst wurden dazu serielle Dünnschnitte von drei verschiedenen Prostatakrebsproben mit zwei QM Assays untersucht (5.3.1). Dies sollte einen ersten Hinweis darauf geben, wie sehr sich die Methylierung innerhalb eines Tumors ändert. Anschließend wurde eine Technologie entwickelt und validiert, die es ermöglicht eine Mehrzahl von Genen in Proben mit sehr geringer DNA Menge zu analysieren (5.3.2.1) um dann letztlich die Methylierungsheterogenität innerhalb eines Tumors in einer Mikrodisektionsstudie genau zu charakterisieren (5.3.2.2.2).

5.3.1 Makroskopische Methylierungsheterogenität

Für eine erste, grobe Einschätzung der Methylierungsheterogenität in einer biologischen Probe wurden Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Prostatektomieproben von drei Patienten untersucht. Dazu wurden zwei QM Assays zur quantitativen Methylierungsbestimmung der beiden Gene PITX2 (Promotor AB) und ABHD9 verwendet. Mit diesen beiden Assays wurde zunächst die Methylierung in Standard DNA mit bekannter Methylierung bestimmt, um die Leistungsfähigkeit dieser beiden Assays zu bestimmen und den Erfolg des Experimentes einschätzen zu können. Bei den verwendeten Standard-DNAs handelte es sich um Mischungen von MDA DNA und künstlich methylierter MDA DNA. Diese wurden in entsprechenden Verhältnissen gemischt, sodass diese Mischungen eine Methylierung von 0, 5, 10, 25, 50, 75 und 100% vorweisen. Abbildung 17 zeigt Kalibrierkurven der beiden Assays. Beide verwendete Assays ermöglichen die Methylierung der verwendeten Standard-DNAs zu quantifizieren. Auch im Bereich geringer Methylierung (0, 5 und 10 %) konnten diese Unterschiede in der Methylierung eindeutig aufgelöst werden.

Die drei untersuchten Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Prostatektomieproben wurden zunächst komplett in 10 µm Schnitte geschnitten. Jeweils drei direkt aufeinander folgende Schnitte wurden jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt. In einem Reaktionsgefäß war somit das Material von ca. 30 µm der Prostatektomieprobe (3 Schnitte á 10 µm). Die Reaktionsgefäße wurden entsprechend der Reihenfolge, in der die Schnitte generiert wurden, nummeriert. Insgesamt resultierten von den drei Fällen 60 (Patient A), 35 (Patient B) und 55 (Patient C) Reaktionsgefäße mit jeweils 3 Dünnschnitten. Dabei spiegelt die Nummer jeder Probe direkt die ursprüngliche Position der drei Schnitte in der Prostatektomieprobe wider. Von diesen Proben wurden nun insgesamt 74 für eine weitere Analyse ausgewählt, sodass alle drei

Prostatektomieproben über die gesamte Breite abgedeckt wurden. Die gewählten Proben wurden nun zunächst lysiert und anschließend einige davon extrahiert. Die Extrakte bzw. die Lysate wurden dann Bisulfit-konvertiert und die resultierende konvertierte DNA mit einem Real-Time Assay quantifiziert. Dadurch, dass

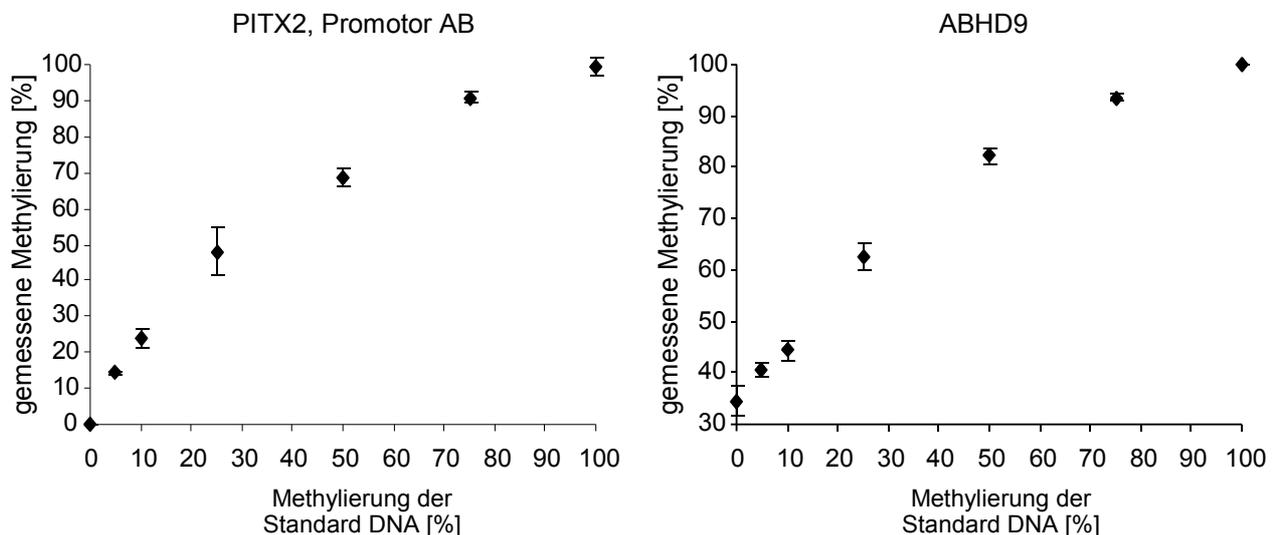


Abbildung 17: Analyse von Standard DNAs (0, 5, 10, 25, 50, 74 und 100% Methylierung) mit zwei QM Assays. Diese Assays sind spezifisch für die Gene PITX2 (Promotor AB) und ABHD9. Alle Messwerte sind Mittelwerte eine Dreifachbestimmung inklusive Standardabweichung.

einige der Proben extrahiert wurden und andere nicht, sollte zum einen der Einfluß der Extraktion auf das Ergebnis der quantitativen Methylierungsbestimmung untersucht werden, zum anderen sollte so sicher gestellt werden, dass ein eventuell hoher DNA Verlust bei der Extraktion sich nicht negativ auf das Ergebnis diese Experiments auswirkt.

Jede der konvertierten Proben wurde nun jeweils in einer Dreifachbestimmung mit den entsprechenden QM Assays auf den Methylierungsstatus der Gene PITX2 (Promotor AB) und ABHD9 untersucht. In demselben Experiment, in dem die Patientenproben untersucht wurden, wurden auch die oben beschriebenen Standard DNAs untersucht. Das heißt, dass sowohl die Standard DNAs, als auch die Patienten-DNAs exakt unter den gleichen experimentellen Bedingungen untersucht wurden. Dadurch konnte sichergestellt werden, dass nicht nur die Konkordanz der Dreifachbestimmung hoch war, sondern zusätzlich auch der gemessene Methylierungswert zuverlässig der in Abbildung 17 dargestellten Assaycharakteristik entspricht.

Das Verhalten der Methylierung der beiden Gene PITX2 (Promotor AB) und ABHD9 über den Querschnitt der drei untersuchten Prostatektomiefälle ist in Abbildung 18 dargestellt. Dabei ist ebenfalls aufgetragen, wie hoch die DNA Ausbeute aus den entsprechenden Proben war. Proben, die extrahiert wurden, sind in diesem Diagramm durch schwarz ausgefüllte Quadrate gekennzeichnet.

Betrachtet man in Abbildung 18 zunächst die Ausbeute an DNA für die einzelnen Proben der drei Fälle, so sieht man, dass wie zu erwarten die DNA Ausbeute bei den Proben, die extrahiert wurden, geringer ist, was auf den Verlust bei der Extraktion zurückzuführen ist. Ansonsten liegen die DNA Ausbeuten im wesentlichen über die gesamte Breite der Prostatektomien im Bereich zu erwartender Schwankungen. Lediglich bei einem Patienten (C) ist eine deutliche Abnahme der DNA Ausbeute über den Querschnitt zu erkennen. Dort ist ab Probe 48 kaum noch DNA in den Dünnschnitten vorhanden. Dies lässt darauf schließen, dass sich in dieser Richtung entweder die Größe der Probe oder die Zusammensetzung des Gewebes verändert hat. Betrachtet

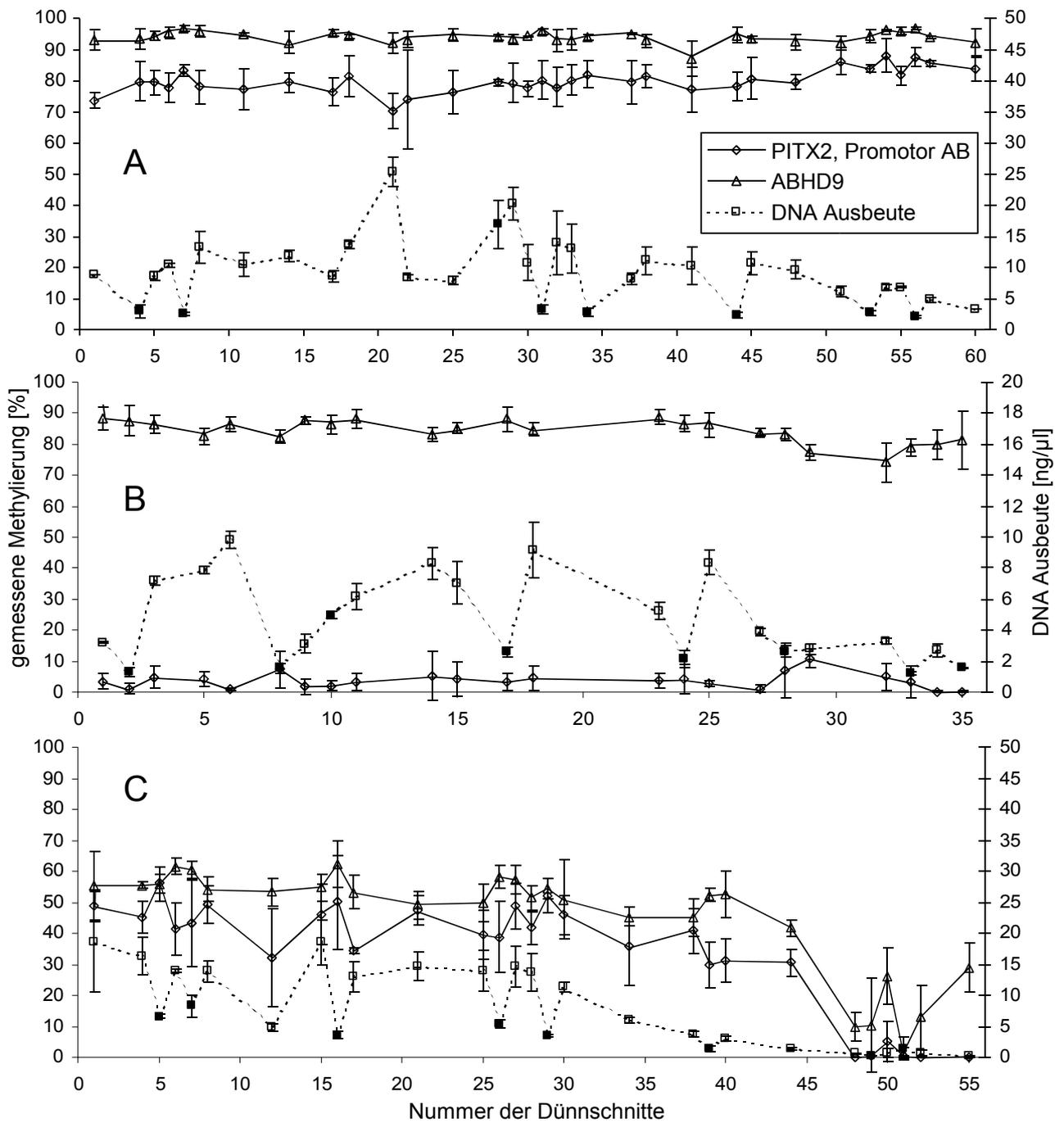


Abbildung 18: Änderung der Methylierung der Gene PITX2 und ABHD9 über den Querschnitt von drei Prostataktomiefällen (A-C) und DNA Ausbeute von den entsprechenden Proben. Die Position der Proben innerhalb der Prostataktomie ist über die Nummer der Dünnschnitte gekennzeichnet. Proben, die vor der Bisulfit-Konvertierung extrahiert wurden, sind durch gefüllte schwarze Quadrate gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte von drei Messwerten \pm Standardabweichung.

man in Abbildung 18 das Verhalten der Methylierung der beiden Gene PITX2 und ABHD9 über den Querschnitt der Prostataktomien, so sieht man ein ähnliches Bild wie bei der DNA Ausbeute. Bei Patient A sind beide Gene stark methyliert. Dabei ist die Methylierung über die gesamte Breite des Gewebes relativ

konstant. Lediglich bei PITX2 kann man eine leichte Zunahme der Methylierung von links nach rechts beobachten, allerdings liegt diese Zunahme im Bereich der Standardabweichung. Bei Patient B ist PITX2 niedrig und ABHD9 hoch methyliert. Wiederum ist die Methylierung beider Gene über den Querschnitt der Prostatektomie im Rahmen der Standardabweichung konstant. Eine Änderung der Methylierung über den Querschnitt ist bei Patient C für beide analysierten Gene zu sehen. Dort ist zunächst die Methylierung beider Gene zwischen den Proben eins und 44 konstant und nimmt dann ab Probe 48 sprunghaft ab. Probe 48 ist ebenfalls die Probe, bei der auch eine sprunghafte Abnahme der DNA Ausbeute zu sehen war. Diese beiden Beobachtungen zusammen lassen darauf schließen, dass in diesem Bereich sich die Zusammensetzung des Gewebes ändert. Eine Abnahme der Größe des Gewebes dort würde zwar eine Abnahme der DNA Ausbeute erklären, nicht jedoch eine Abnahme der Methylierung. Eine Abnahme der Methylierung und eine Abnahme der DNA Ausbeute dagegen könnte ein Indikator dafür sein, dass sich der Zelltyp hin zu Zellen mit großen Volumen und entsprechend geringen DNA / Volumen Verhältnis geändert hat. Die Abnahme der Methylierung könnte allerdings auch darauf zurückzuführen sein, dass durch die unterschiedliche Menge an eingesetztem Templat in die PCR die Messung beeinflusst wurde, da jeweils das gleiche Volumen (5 µl) und nicht die gleiche Menge an DNA in die Messung eingesetzt wurde. Allerdings ist auch bei den beiden anderen Patienten die Schwankungsbreite der pro Probe eingesetzten Templatmenge groß und trotzdem kein systematischer Fehler (niedrigere Methylierungswerte bei geringerer Templatmenge) zu erkennen. Generell scheint die Methylierung über den Querschnitt des Gewebes konstant zu bleiben. Lediglich bei einem Patienten ist eine Veränderung der Methylierung zu erkennen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass sich dort die Zusammensetzung des Gewebes verändert hat und demnach verschiedene Zelltypen eine unterschiedliche Methylierung aufweisen können. Allerdings ist auch zu beachten, dass auch bei dem Patient A, bei dem der Querschnitt des Gewebes durch insgesamt 60 Proben repräsentiert wird, nur ca. 1,8 mm (60 Proben á drei 10 µm Schnitten) Gewebe abgedeckt wurden. Um nun in der Lage zu sein, die unterschiedlichen vorkommenden Zelltypen zu analysieren, wurde im folgenden eine Methode entwickelt, die es erlaubt die Methylierung in mikrodissiziertem Material zu bestimmen.

5.3.2 Mikroskopische Methylierungsheterogenität

Wie unter 5.3.1 beschrieben, scheint die makroskopische Heterogenität der Methylierung gering zu sein. Allerdings lieferte dieses Experiment auch einen ersten Hinweis darauf, dass die Methylierung von dem vorliegenden Zelltyp abhängig sein könnte. Aus diesem Grund soll im folgenden die mikroskopische Methylierungsheterogenität, d.h. die Unterschiede in der Methylierung zwischen verschiedenen Zelltypen und innerhalb eines Zelltypes an verschiedenen Orten im Gewebe untersucht werden.

5.3.2.1 Methodenentwicklung

Für die Analyse der Methylierung in verschiedenen Zelltypen bietet sich die Mikrodissektion an, die es ermöglicht, ganz bestimmte Zellen aus einem heterogenen Gewebe zu isolieren und zu analysieren. Um eine

möglichst genaue Mikrodisektion der interessanten Zellen zu ermöglichen, ist eine gut erhaltene Morphologie nötig, wie sie besonders in Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe gegeben ist. Um außerdem in der Lage zu sein, die Methylierung innerhalb eines Zelltypes aber an verschiedenen Orten des Gewebes zu analysieren, sollte versucht werden, auch geringe Mengen an Zellen (und damit geringen DNA Mengen) zu analysieren. Aus diesen Gründen wurde im folgenden zunächst die DNA aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe näher charakterisiert, um das Arbeiten damit zu optimieren. Anschließend wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, die Methylierung von einer Vielzahl von Genen bei einer sehr geringen Menge an vorhandener DNA zu analysieren.

5.3.2.1.1 Charakterisierung von DNA aus FFPET

Für eine genauere Charakterisierung der DNA aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebetteten Geweben wurden 22 PCR Amplifikate unterschiedlicher Länge entworfen (185 - 711 bp). Diese 22 Amplifikate wurden zunächst mit hochmolekularer, Bisulfit-konvertierter DNA aus Blut (Referenz DNA) als Templat PCR-amplifiziert. Dabei konnten alle Amplifikate erfolgreich amplifiziert werden (Abbildung 19, A). Verwendet man jedoch Bisulfit-konvertierte DNA aus FFPET als Templat, dann können von diesen Amplifikaten nur noch die kurzen bis zu einer Länge von ca. 300 bp erfolgreich amplifiziert werden (Abbildung 19, B). Als FFPET DNA wurde dabei die unter 4.1.2.4 hergestellte Referenz-DNA verwendet. Diese stammt von mehreren verschiedenen FFPETs und sollte somit repräsentativ für FFPETs sein, da die individuellen Eigenschaften der einzelnen FFPETs dort nur noch geringen Einfluß haben sollten. Um nun näher zu untersuchen, ob die misslungene Amplifikation längerer Amplifikate durch Fehlen von amplifizierbarer, nativer DNA entsprechender Integrität oder eher durch das Vorhandensein von inhibierenden Substanzen zu erklären ist, wurde die Amplifikation der hochmolekularen Blut DNA wiederholt. Allerdings wurde diesmal extrahierte, nicht Bisulfit-konvertierte DNA aus FFPET ebenfalls dazu gegeben. Da diese DNA nicht konvertiert war, konnte sie nicht als Templat für die PCR dienen. Das Resultat dieser Amplifikation (Abbildung 19, C) ähnelt sehr dem der Amplifikation von Bisulfit-konvertierter FFPET DNA (Abbildung 19, B). Da bei diesen PCRs genügend hochmolekulare DNA als Templat vorhanden war, kann die misslungene Amplifikation langer PCR-Fragmente nur auf der Anwesenheit einer inhibierenden Substanz in der FFPET DNA beruhen. Um die Natur dieses Inhibierungsprinzips weiter aufzuklären, wurde die Amplifikation der hochmolekularen Blut DNA im Beisein von unkonvertierter FFPET DNA wiederholt, jedoch mit dem Unterschied, dass diese unkonvertierte FFPET DNA zuvor durch eine Behandlung mit DNase I hydrolysiert wurde. In Abbildung 19 (D) ist zu erkennen, dass nach Degradierung der FFPET DNA wieder fast alle Amplifikate bis zu der Länge von 711 bp erfolgreich amplifiziert werden konnten. Der inhibierende Effekt der FFPET DNA konnte also durch eine DNase I Behandlung stark vermindert werden. Dies zeigt, dass die DNA aus FFPET selbst als potenter PCR Inhibitor wirksam ist und nicht etwaige Verunreinigungen für die gescheiterte Amplifikation langer PCR Fragmente verantwortlich ist.

Nun wurde untersucht, wie sich eine Erhöhung der Polymerasekonzentration in der PCR auf die Amplifikation von FFPET DNA auswirkt. Dazu wurde die Polymerasekonzentration von einem Unit auf drei Units verdreifacht. Nach dieser Erhöhung konnten Amplifikate mit einer Länge von bis zu ca. 500 bp anstelle von zuvor nur 300 bp mit FFPET DNA als Templat erfolgreich amplifiziert werden (Abbildung 19 (E)).

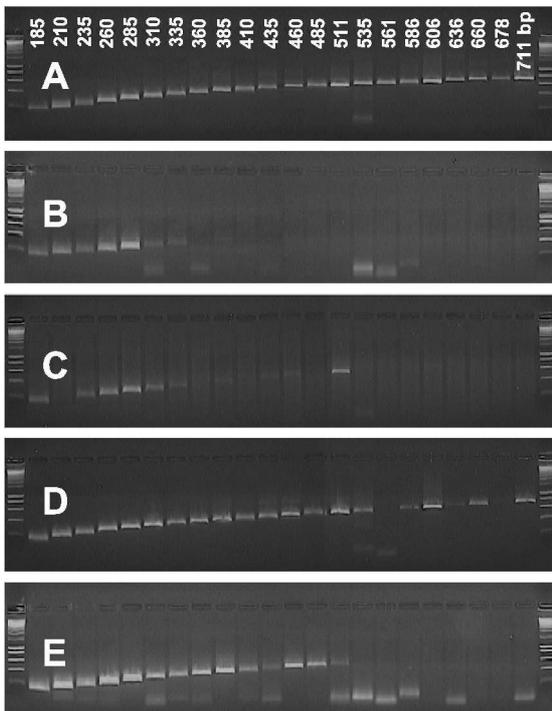


Abbildung 19: PCR Amplifikation von bisulfit-spezifischen Amplifikaten im Größenbereich von 185 bis 711 bp. A: Bisulfit-konvertierte hochmolekulare Templat-DNA (10 ng, 1 U *Taq* Polymerase). B: Bisulfit-konvertierte Templat-DNA aus FFPET (30 ng, 1 U *Taq* Polymerase). C: Bisulfit-konvertierte hochmolekulare Templat-DNA (10 ng, 1U *Taq* Polymerase) in Anwesenheit von 90 ng unkonvertierter FFPET DNA. C: Bisulfit-konvertierte hochmolekulare Templat-DNA (10 ng, 1 U *Taq* Polymerase) im Beisein von 90 ng unkonvertierter, DNase I hydrolysiertes FFPET DNA. E: Bisulfit-konvertierte Templat-DNA aus FFPET (30 ng, 3 U *Taq* Polymerase)

Um den Effekt der PCR Inhibierung noch weiter zu untersuchen, wurde eine bisulfit-spezifische quantitative Real-Time PCR durchgeführt. Dazu wurden verschiedenen Mengen (3 ng - 400 ng) Bisulfit-konvertierter FFPET DNA als Templat eingesetzt. Für die Amplifikation wurden zum einen 1 U *Taq* Polymerase (wie vom Hersteller empfohlen) und zum anderen 3 U *Taq* Polymerase verwendet. Abbildung 20 zeigt, dass die Real-Time PCR sowohl bei 1 U *Taq* Polymerase, als auch bei 3 U *Taq* Polymerase über eine große Bandbreite eingesetzter verschiedener Templatmengen linear ist, d.h. die gemessene Menge stimmt mit der tatsächlich eingesetzten Menge überein.

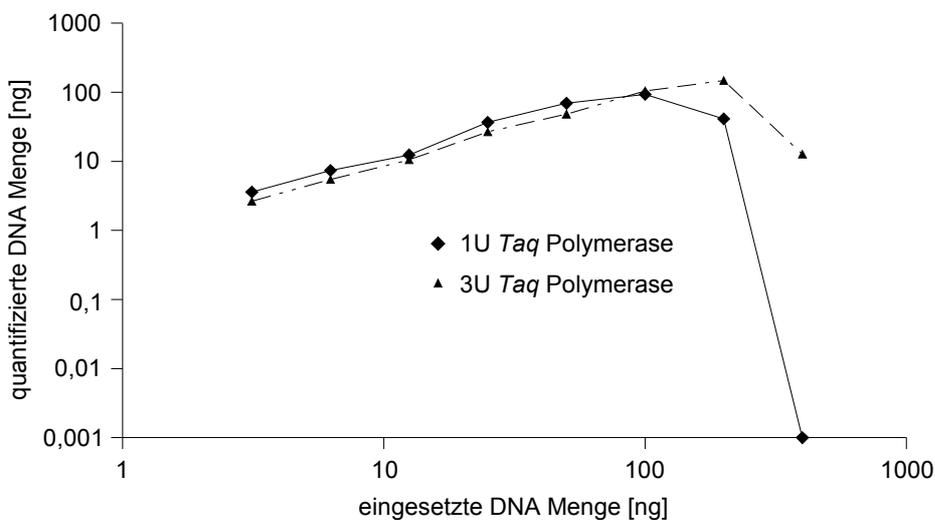


Abbildung 20: Quantitative Real-Time PCR mit verschiedenen Mengen Bisulfit-konvertierter FFPET DNA. Verwendet wurden 1 U und 3 U *Taq* Polymerase. Dargestellt sind Mittelwerte aus zwei Messwerten.

Bei einer Templatmenge von mehr als 100 ng wird die Real-Time PCR mit 1 U *Taq* Polymerase nahezu vollständig inhibiert. Im Gegensatz dazu ist diese Inhibition wesentlich geringer, wenn 3U *Taq* Polymerase verwendet werden.

Diese Ergebnisse zeigen aber auch, dass bei Verwendung von sehr geringen Mengen von DNA aus FFPET, wie z.B. aus mikrodisszierten Proben, keine weiteren Optimierungen der PCR Konditionen nötig sind. Allerdings sollte die Länge von PCR Produkten möglichst gering sein, um trotz der Fragmentierung der DNA aus FFPET ein möglichst hohe Menge an Templatmenge für das jeweilige Amplifikat zur Verfügung zu haben.

5.3.2.1.2 Quantitative Bisulfitsequenzierung

Basierend auf der Sequenziermethode nach Sanger *et al.* (1977) wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, Methylierung mit hoher Auflösung zu quantifizieren. Das Prinzip der neuen Methode ist in Abbildung 21 dargestellt und beruht auf der Einführung eines Normalisierungssignals in das PCR Produkt. Eine Umwandlung der DNA durch Bisulfit führt dazu, dass alle Cytosine zu Uracil umgewandelt werden. Lediglich methylierte Cytosine bleiben von dieser Reaktion unbeeinflusst. Folglich enthält die DNA nur noch dort Cytosine, wo sich vorher Methylcytosine befanden (Abbildung 21, I). Nun wird diese DNA in einer PCR amplifiziert, wobei man einen Rückwärtsprimer verwendet, der an seinem 5' Ende eine Gen-unspezifische Domäne mit Guanosinen enthält (Abbildung 21, II). Dadurch generiert man einen Strang, der neben den von den Methylcytosinen abstammenden Cytosinen an seinem 3' Ende zusätzliche Cytosine enthält, die von der Domäne des verwendeten Rückwärtsprimers abstammen (Abbildung 21, III). Betrachtet wird dabei nur das Sequenzsignal der Cytosine, die drei anderen Basen können vernachlässigt werden. Die zusätzlichen Cytosine am Ende des PCR Produktes sind unabhängig von der ursprünglichen relativen Methylierung in jedem einzelnen DNA Molekül des PCR Produktes vorhanden. Sie verhalten sich somit wie Cytosine, die in der ursprünglichen DNA zu 100 % methyliert waren und können zur Normalisierung der eigentlichen Methylierungssignale verwendet werden.

In Abbildung 21 ist das Prinzip dieser Methode für die Sequenzierung mit dem Vorwärtsprimer dargestellt. Da die Bisulfit-konvertierte Templat-DNA keine Cytosine außer an vorher methylierten CpG Positionen enthält, enthält auch dieser Vorwärts-Primer keine Cytosine, er ist also relativ reich an Guanosinen. Die Richtung der Sequenzierung ist deswegen im folgenden als G-reiche Sequenzierung benannt. Die Methode lässt sich gleichermaßen durch eine Sequenzierung mit dem Rückwärtsprimer realisieren. Diese Sequenzierung über diesen C-reichen Primer ist im folgenden entsprechend als C-reiche Sequenzierung benannt. Im Falle der C-reichen Sequenzierung wird das Normalisierungssignal im PCR Produkt entsprechen so generiert, indem der G-reich Vorwärtsprimer an seinem 5'-Ende eine Domäne mit einigen Cytosinen enthält.

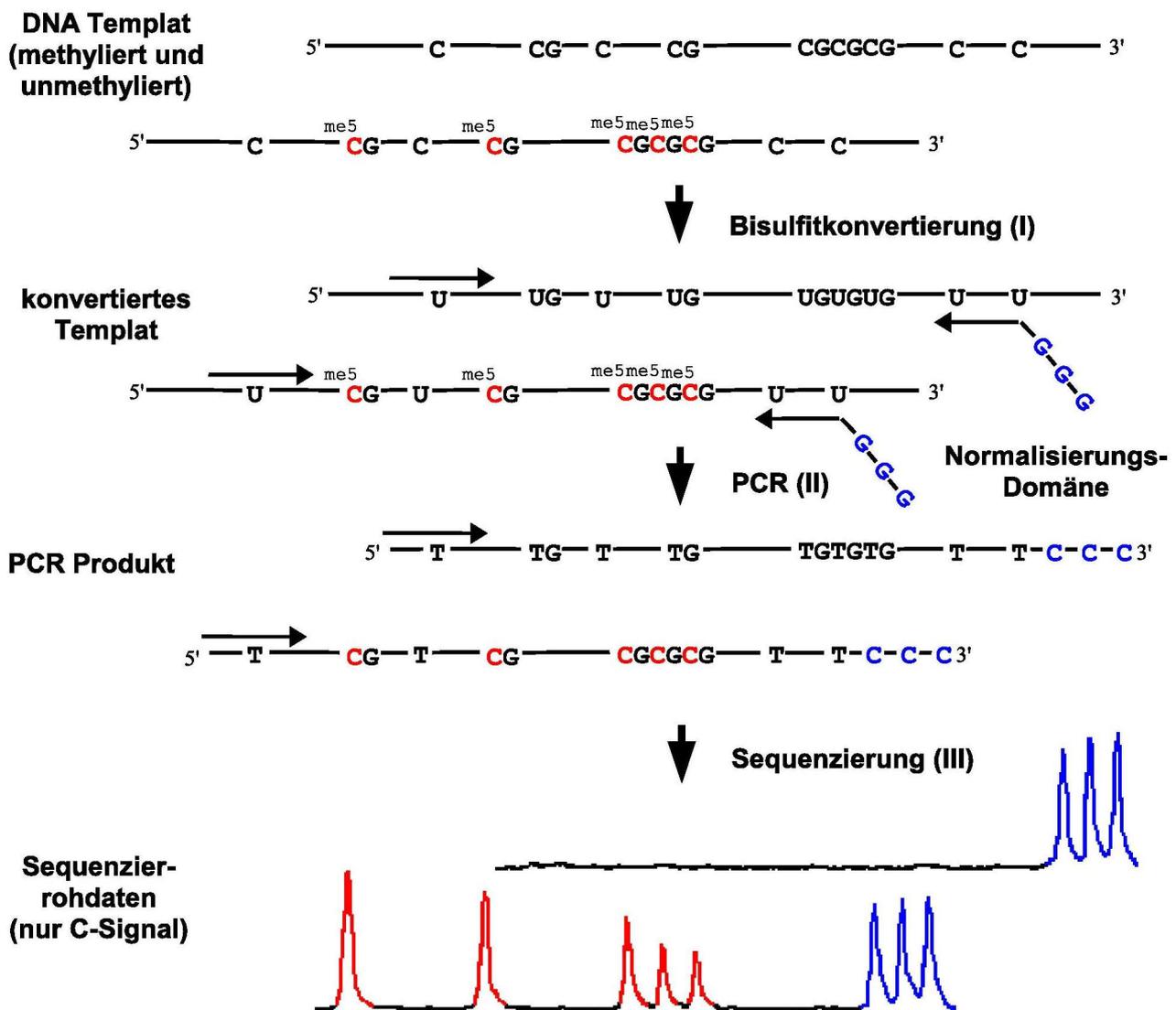


Abbildung 21: Prinzip der quantitative Bisulfitsequenzierung am Beispiel der G-reiche Sequenzierung über den Vorwärtsprimer. I: Bisulfitkonvertierung: Cytosin desaminiert zu Uracil während Methylcytosin erhalten bleibt. II: PCR mit einem Rückwärtsprimer, der an 5' drei Guanosine enthält (Normalisierungssignal). Somit erfolgt ein Einbau von drei Cytosinen am Ende des PCR Produkts. III: Sequenzierung. Die Sequenzhistogramme von jedem PCR Produkt, unabhängig von der Methylierung der Ausgangs-DNA, enthalten nun ein Normalisierungssignal. Dabei wird nur das Sequenzsignal des Cytosins beachtet.

Die Signalnormalisierung ist in Abbildung 22 dargestellt. In dieser Abbildung sind die Cytosinsignale aus der Sequenzierung von fünf unterschiedlich methylierten Standard DNAs (0, 5, 15, 50 und 100 % methyliert) dargestellt. Man erkennt, dass ohne vorhergehende Normalisierung (Abbildung 22, oben) keine Korrelation der Peakhöhe und -fläche der Methylierungssignale mit der Methylierung der Ausgangs-DNA existiert. Normalisiert man die Signale allerdings in der Form, dass die künstlich in das PCR Produkt eingebrachten Cytosine (Normalisierungssignal) alle eine einheitliche Größe haben, so ist die Korrelation der Peakhöhe und -fläche mit der Methylierung der Ausgangs-DNA gut zu erkennen (Abbildung 22, unten).

Die prinzipielle Vorgehensweise bei der Auswertung der Sequenzierdaten mittels des Normalisierungssignals ist bereits in Abbildung 22 schematisch dargestellt und im folgenden detailliert beschrieben. Zunächst wurden die vom Sequenziergerät erzeugten Daten in ein geeignetes Format überführt, um diese für die weitere

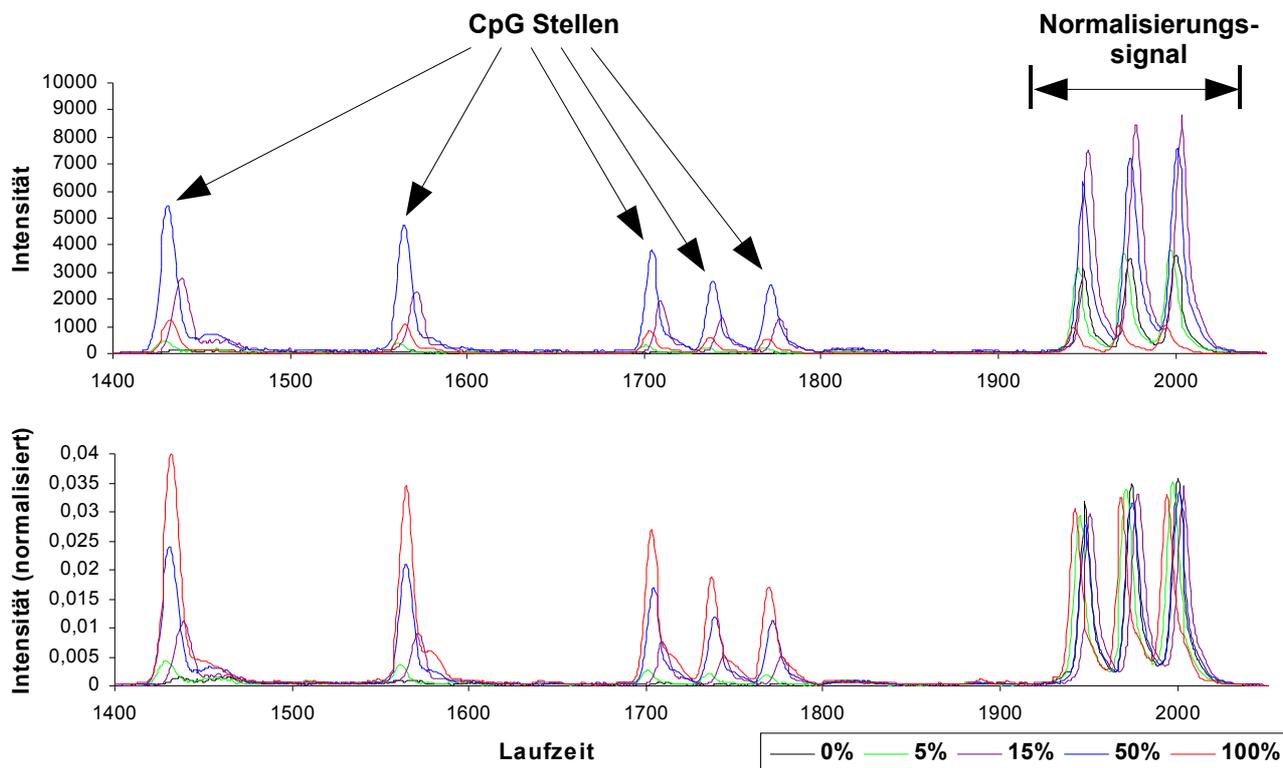


Abbildung 22: Prinzip der Normalisierung. Darstellung der Sequenzhistogramme (nur C-Signal) von fünf verschiedenen Methylierungsmischungen - oben vor und unten nach der Normalisierung. Das Normalisierungssignal in jeder Probe wird identifiziert und die Intensitäten zu jedem Messpunkt durch die Fläche des Normalisierungssignals dividiert. Sowohl die Höhen, als auch die Flächen der Peaks an den CpG-Positionen korrelieren nach der Normalisierung mit der Methylierung der Methylierungsmischungen.

Analyse zugänglich zu machen. Das öffentlich zugängliche Programm „Chromas“ bietet die Möglichkeit, das Sequenzhistogramm als Textdatei zu exportieren. In dieser Textdatei befinden sich die Fluoreszenzintensitäten der vier Farbstoffe aller vier Basen zu jedem Messpunkt. Da jeder Messpunkt einen Zeitpunkt darstellt, lässt sich diese Datei als Funktion der Fluoreszenzintensität von der (Lauf-) Zeit in der Kapillargelelektrophorese darstellen. Dazu wurde das Tabellenkalkulationsprogramm „Excel“ verwendet. Für die Auswertung ist dabei lediglich die Information desjenigen Fluoreszenzfarbstoffes vonnöten, der die Methylierungsinformation trägt. Im Falle der G-reiche Sequenzierung ist das das C-Signal, im Falle der C-reichen Sequenzierung das G-Signal (siehe Abbildung 21). Die Signale der verbleibenden Farbstoffe wurden nicht weiter betrachtet. Nun wurden in einem Diagramm die Methylierungsinformation-tragenden Signale aller Proben dargestellt, wie in Abbildung 22 gezeigt. Da es während der Kapillarelektrophorese von Probe zu Probe zu leichten Unterschieden im Laufverhalten kommt, wurden diese Signale entlang der x-Achse (Laufzeitachse) so verschoben, dass die Normalisierungssignale übereinander lagen – so wie in Abbildung 22. Nun erfolgte die Normalisierung. Dazu wurde ein Bereich der x-Achse identifiziert, der das gesamte Normalisierungssignal umfasst. In Abbildung 22 ist das z.B. der Bereich von 1900-2050 (Laufzeit). Die Fläche des Signals in diesem Bereich wurde bestimmt, indem die Fluoreszenzintensitäten in diesem Bereich summiert wurden (Integration). Die eigentliche Normalisierung erfolgte, indem die Fluoreszenzintensität zu jedem Messpunkt durch die Fläche des gesamten Normalisierungssignals geteilt wurde. Damit beträgt die Fläche des Normalisierungssignals nach der Normalisierung für jede Probe genau eins und alle Proben können direkt miteinander verglichen werden. Nach dieser Normalisierung ist die eigentliche quantitative

Methylierungsinformation sowohl in der Höhe der Peaks an den entsprechenden Methylierungspositionen, als auch in der Fläche dieser Peaks enthalten. In Abbildung 22 sieht man diesen Zusammenhang deutlich: Nach erfolgter Normalisierung (Abbildung 22, unten) korrelieren sowohl die Peakhöhen, als auch die Peakflächen an den CpG-Positionen sehr gut mit der Methylierung der eingesetzten Standard-DNAs. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die Peakflächen für eine weitere Auswertung verwendet. Hintergrund hierfür war die Überlegung, dass die Peakfläche durch die Summe mehrerer Messpunkte repräsentiert wird und nicht nur einen Messpunkt darstellt wie die Peakhöhe. Die Peakfläche sollte dadurch ein robusteres Signal geben als die Höhe. In Abbildung 22 ist auch zu erkennen, dass jede einzelne CpG-Stelle separat analysiert werden kann. Wenn nicht anders beschrieben, dann wurden im Rahmen dieser Arbeit die Summe der Flächen aller Peaks innerhalb eines PCR-Produktes verwendet, um die Robustheit des Signals weiter zu erhöhen. Die Definition der Peakfläche einer Methylierungsstelle (CpG-Stelle) wurde in dieser Arbeit wie folgt festgelegt: Fluoreszenz des lokalen Maximums plus die Fluoreszenzintensitäten der 15 vorhergehenden und der 15 nachfolgenden Messpunkte. Ein Peak ist damit die Summe von 31 Messwerten.

Ziel dieser Arbeit war es, die Methylierung von insgesamt 13 Loci in mikrodisszezierten Proben zu untersuchen. Da in mikrodisszeziertem Material offensichtlich nicht genügend DNA vorhanden ist, um diese 13 Loci separat voneinander zu analysieren, wurde die DNA zunächst in einer PCR voramplifiziert. Dazu wurde eine PCR durchgeführt, in der die Primer für alle 13 Loci enthalten waren (multiplex-PCR; mPCR). Anschließend wurde jeder einzelne der 13 Loci in einer separaten PCR reamplifiziert (singleplex-PCR, sPCR), wobei das Produkt der multiplex-PCR Voramplifikation als Templat diente. Primer mit den 5'-Domänen zur Generierung des Normalisierungssignals wurden erst in der sPCR Reamplifikation verwendet. Die Voramplifikation mit der multiplex-PCR erfolgte mit konventionellen Primern ohne Domäne. Bei der multiplexierten Voramplifikation stand vor allem die Spezifität im Vordergrund. Durch eine für mPCRs verhältnismäßig niedrige MgCl₂- und Primer Konzentration und eine hohe Primer-Annealing-Temperatur während der PCR sollte die Bildung von Nebenprodukten und Primerdimeren trotz hoher Zyklenzahl und geringer Templatmenge verhindert werden. Das Produkt dieser mPCR Voramplifikation war somit geeignet, um anschließend in einer sPCR reamplifiziert zu werden, ohne dass potentielle Nebenprodukte besser amplifiziert werden als die gewünschten Loci. Um die Bildung von Nebenprodukten während der Reamplifikation noch weiter zu minimieren, wurden Primer verwendet, die sich neben der 5'-Domäne auch am 3'-Ende durch zusätzliche Basen von den Primern der Voramplifikation unterschieden. Sofern es möglich war und die Primer der Voramplifikation nicht schon direkt an ein CpG angrenzten, wurden die Primer der Reamplifikation um bis zu drei Basen in das Amplifikat hinein verlängert. So sollte sichergestellt werden, dass nur das richtige Amplifikat vervielfältigt wurde.

Die Leistungsfähigkeit der beschriebenen neuen Methode wurde für die 13 zu untersuchenden Loci getestet. Dazu wurden Standard-DNAs (0, 5, 10, 25, 50, 75 und 100 % methyliert) entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise prozessiert. Die Standard-DNAs bestanden aus Mischungen von MDA DNA und künstlich methylierter MDA DNA in den entsprechenden Verhältnissen. Jeweils 20 ng der einzelnen Bisulfit-konvertierten Standard-DNAs wurden zunächst in der mPCR voramplifiziert und anschließend in den 13 einzelnen sPCRs reamplifiziert. Die PCR Produkte der Reamplifikation wurden sequenziert, wobei sowohl mit dem G-reichen Vorwärtsprimer, als auch mit dem C-reichen Rückwärtsprimer sequenziert wurde. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung der Standard-DNAs. Dabei ist zu sehen, dass für alle 13 Sequenzierassays die G-reiche und die C-reiche Sequenzierung die nahezu gleichen Ergebnisse liefern. Mit jedem dieser 13 Assays war es möglich, alle untersuchten Methylierungsstandards voneinander zu unterscheiden.

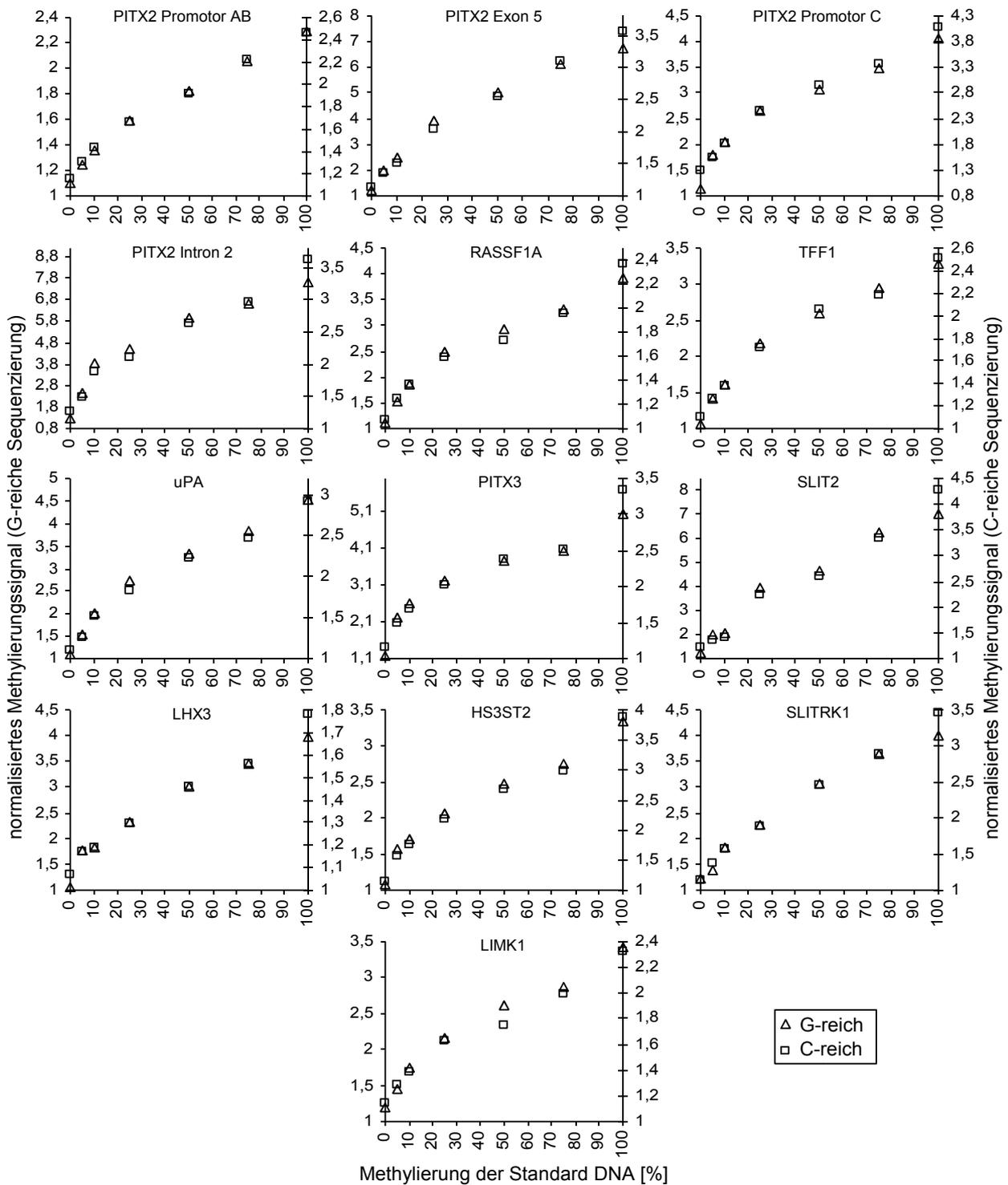


Abbildung 23: Abhängigkeit des normalisierten Methylierungssignals (Summe aller normalisierte Peakflächen) von der Methylierung der eingesetzten Standard-DNAs. Sequenziert wurden 13 verschiedenen Loci - sowohl über den G-reichen Vorwärtsprimer (primäre y-Achse), als auch den C-reichen Rückwärtsprimer (sekundäre y-Achse).

Als Vergleich zu konventionellen Methoden wurde für drei der 13 Loci (PITX2 Promotor AB, uPA und TFF1) die Methylierung zusätzlich durch die entsprechenden QM Assays bestimmt. Dabei wurden von jedem DNA Standard jeweils 20 ng Bisulfit-konvertierter DNA in jeden der drei QM Assays eingesetzt. Außerdem erfolgte die Messung mit dem QM Assay als Dreifachbestimmung, sodass insgesamt 240 ng pro Standard DNA für die drei QM Assays (3 x 20 ng für jeden der drei QM Assays) verwendet wurden, im Gegensatz zu nur 20 ng jedes Standards für alle 13 Sequenzierassays. Das Ergebnis dieses Technologievergleichs ist in Abbildung 24 dargestellt. Im Fall der Sequenziermethode ist in diesem Diagramm nur die Sequenzierung mit dem G-reichen Primer dargestellt.

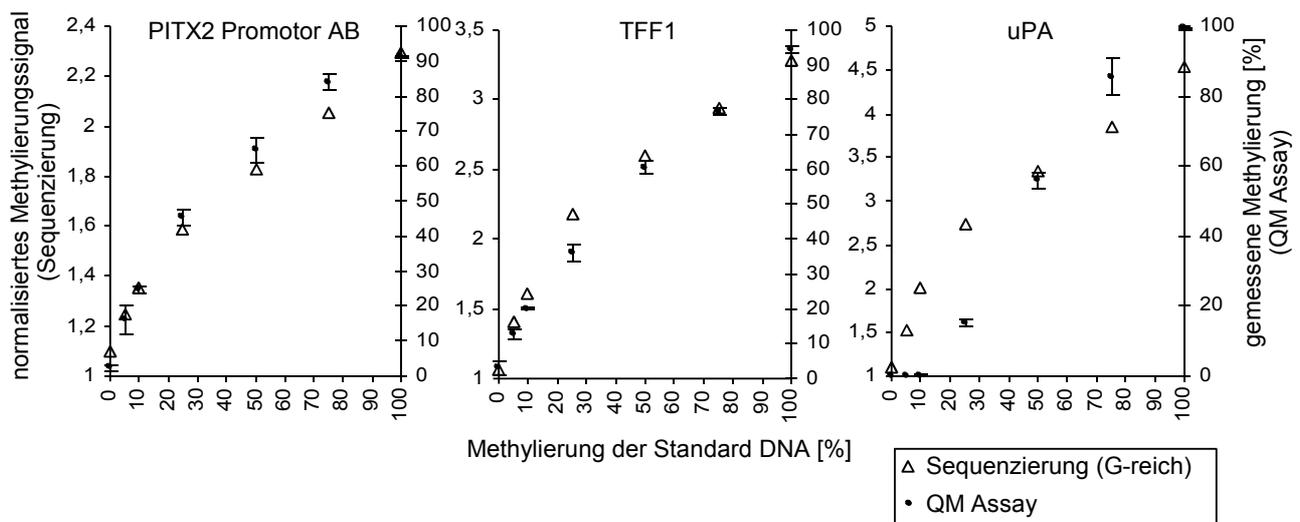


Abbildung 24: Vergleich der Sequenziermethode mit den entsprechenden QM Assays. Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse von drei Genen (PITX2, uPA und TFF1). Untersucht wurden Standard DNAs (0, 5, 10, 25, 50, 75 und 100 % methyliert). Die dargestellten Messwerte sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung \pm Standardabweichung (QM Assay, sekundäre y-Achse) und die Ergebnisse der Sequenzierung mit dem G-reichen Primer (Einfachbestimmung, primäre y-Achse).

Abbildung 24 zeigt deutlich, dass für die beiden Gene PITX2 und TFF1 die entsprechenden Sequenzierassays und QM Assays vergleichbaren Ergebnisse liefern. Bei den Assays für das Gen uPA sieht man in Abbildung 24, dass mit dem QM Assay im Bereich niedriger Methylierung (0 bis 10 %) eine Auflösung nur schwer möglich ist. Der Sequenzierassay hingegen zeigt auch in diesem Bereich die gleiche gute Auflösung, wie schon bei den beiden anderen Genen PITX2 und TFF1.

Ein QM Assay liefert bedingt durch die Methode der Auswertung, bei der die Signale der zwei Sonden in ein Verhältnis gesetzt wird, einen Wert zwischen 0 und 100 %. Dieser Wert wurde im Rahmen dieser Arbeit vereinfacht mit prozentualer Methylierung gleichgesetzt. Im Gegensatz dazu liefern die Sequenzierassays Werte, die von Assay zu Assay sehr unterschiedlich sein können. Da dieser Messwert die Summe der normalisierten Peakflächen an den CpG-Positionen widerspiegelt, ist ein solcher Messwert z.B. von der Anzahl der untersuchten CpG-Positionen abhängig. Des Weiteren sind die Fluoreszenzintensitäten, die eine Base bei der Sequenzierung liefert auch von der Position im DNA Fragment und von seiner Umgebung abhängig. Ein methyliertes Cytosin kann somit an der einen Position eine andere Signalintensität liefern, als ein methyliertes Cytosin an einer anderen Stelle. Um nun von den normalisierten Peakflächen zu prozentualer Methylierung zu kommen, wurden die in diesem Kapitel analysierten Standard-DNAs für eine

Kalibrierung der 13 Assays verwendet. Vereinfacht wurde dafür eine lineare Regression der in Abbildung 23 gezeigten Daten durchgeführt und anhand dieser Regression die normalisierten Methylierungssignale in prozentuale Methylierung umgerechnet. In den Folgenden Kapiteln sind daher keine normalisierten Methylierungssignale, sondern prozentuale Methylierung dargestellt. Dabei zeigte sich, dass nach dieser Kalibrierung auch Methylierungswerte $> 100\%$ und $< 0\%$ auftraten. Dies läßt sich anhand der zur Kalibrierung verwendeten Standard-DNAs erklären. Die hier verwendeten Standard-DNAs sind Mischungen aus künstlich methylierter genomweit amplifizierter DNA (MDA DNA) und nicht methylierter MDA DNA sind. Genomweite Amplifikation mit dem GenomicPhi[®] DNA Amplifikations Kit führt zu einem Amplifikationsprodukt, das teilweise einzelsträngig vorliegt und dadurch nicht komplett durch die Sss1 Methylase methyliert werden kann. Daher sind Mischungen aus diesen DNAs immer etwas niedriger methyliert, als dem Mischungsverhältnis entsprechen würde.

5.3.2.1.2.1 Methodvalidierung mit Patientenproben

Bei dem Vergleich der QM Technologie mit der quantitativen Sequenzierung ist zu beachten, dass diese jeweils eine etwas andere Information liefern. Da die QM Technologie auf Detektionssonden basiert, die mehrere CpGs abdecken, sollten nur solche DNA Moleküle detektiert werden, bei denen diese CpGs entweder einheitlich methyliert oder einheitlich unmethyliert sind (Komethylierung). Bei den in Kapitel 5.3.2.1.2 untersuchten Standard DNAs spielt dies keine Rolle, da diese Standard DNAs aus komplett methylierter und komplett unmethylierter DNA hergestellt wurden und damit Komethylierung vorliegt. Deswegen sind QM und Sequenzierassays auf Standard-DNAs direkt vergleichbar. Dies könnte im Fall von klinischen Proben anders sein. Außerdem wurde bei der Auswertung der Sequenzierhistogramme ein durchschnittlicher Wert über das gesamte Amplifikat gebildet, sodass in diesem Messwert auch Information enthalten ist, die durch den QM Assay nicht abgebildet wird. Im folgenden wurde daher die Übertragbarkeit und Anwendbarkeit der mit künstlich methylierten Standard-DNAs entwickelten und etablierten Sequenziermethode auf klinische Proben untersucht. Jeweils zehn Dünnschnitte ($10\ \mu\text{m}$) von Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Brustkrebstumoren von 13 verschiedenen Patientinnen wurden lysiert und die DNA extrahiert. Nach der Bisulfit-Behandlung dieser DNAs wurden diese wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben prozessiert, d.h. 20 ng von jeder Patientinnen-DNA wurden in einer mPCR voramplifiziert, anschließend jedes der 13 Amplikate in einer sPCR reamplifiziert und abschließend sequenziert. Die Sequenzierung erfolgt sowohl mit den G-reichen Vorwärts-, als auch mit den C-reichen Rückwärtsprimern. Die Sequenzierdaten wurden wie in Kapitel 5.3.2.1.2 beschrieben ausgewertet und die resultierenden normalisierten Methylierungssignale anhand der Standardreihen aus Kapitel 5.3.2.1.2 (Abbildung 23) kalibriert.

Zunächst wurden die Ergebnisse der C-reichen und der G-reichen Sequenzierung verglichen. Abbildung 25 zeigt, dass wie schon bei den in Kapitel 5.3.2.1.2 untersuchten Standard-DNAs die Ergebnisse dieser beiden Sequenzierungen sehr gut miteinander korrelieren (Regressionskoeffizient $R^2 = 0,96$).

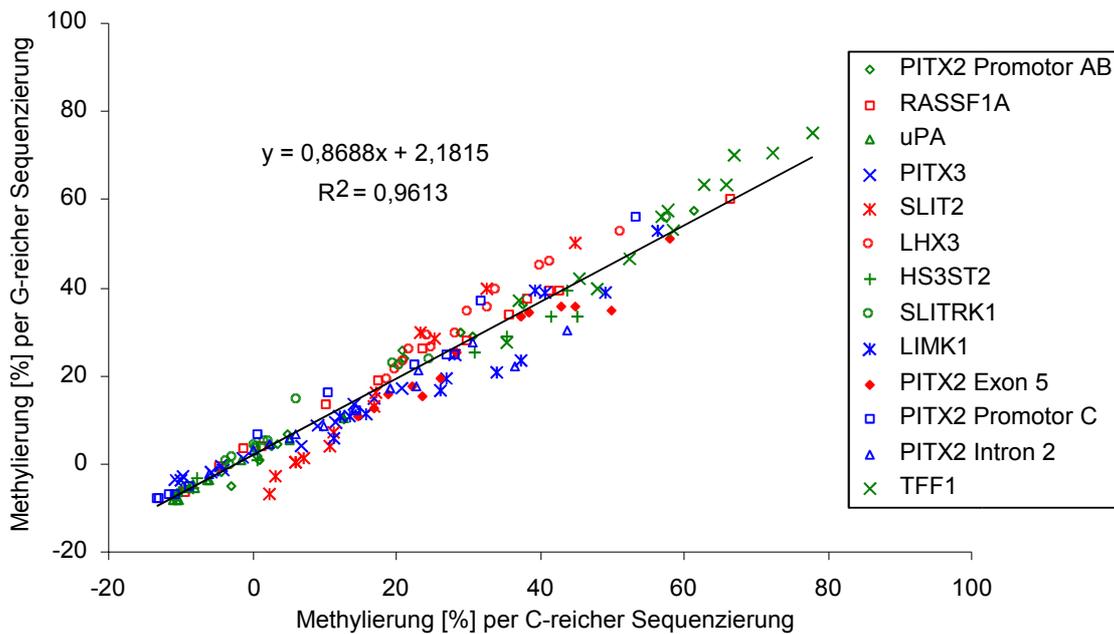


Abbildung 25: Korrelation von G-reicher und C-reicher Sequenzierung bei 13 klinischen Proben. Analysiert wurden 13 verschiedene Loci.

Für drei Genregionen (uPA, PITX2 und TFF1) wurde die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von QM Assay und Sequenzierassay untersucht. Dazu wurden jeweils 20 ng der Bisulfit-behandelten Patientinnen-DNA in die QM Assays eingesetzt. Abbildung 26 zeigt die Korrelation dieser beiden Assayformate. Beide zeigen eine sehr gute Korrelation (Regressionskoeffizient $R^2 = 0,96$). Lediglich bei zwei Messwerten (Patientin E / TFF1 und Patientin J / uPA) ist eine leichte Diskordanz zwischen Sequenziererergebnis und QM Assay Ergebnis zu sehen. Dadurch konnte prinzipiell gezeigt werden, dass die mit Modell-DNAs entwickelte und etablierte Technologie auch bei klinisch relevanten Patientenproben anwendbar ist und dass die DNA bei diesen Patientinnen offensichtlich hauptsächlich komethyliert vorliegt. Es scheinen vorwiegend methylierte und komplett unmethylierte DNA und keine Mischformen vorzukommen, da sonst die Ergebnisse von QM Assay und Sequenzierung diskordant wären. Dies gilt natürlich nur für diejenigen CpGs, die durch die Detektionssonden der QM Assays abgedeckt wurden.

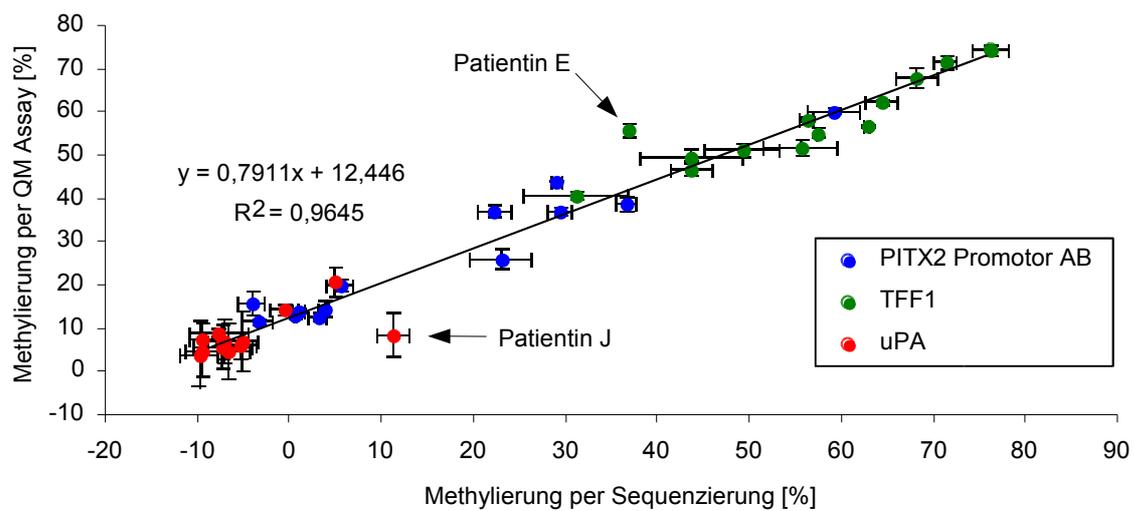


Abbildung 26: Korrelation der Ergebnisse von Sequenzierung und QM Assay bei klinischen Proben. Verglichen wurden die entsprechenden QM und Sequenzierassays für 3 verschiedene Gene (PITX2, uPA und TFF1) von 13 verschiedenen klinischen Proben. Dargestellt sind die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung (QM Assay), bzw. der Mittelwert von G-reicher und C-reicher Sequenzierung \pm Standardabweichung.

Die beiden Messwerte, bei denen die Ergebnisse beider Assayformate nicht genau korrelieren (Patientin E / TFF1 und Patientin J / uPA), sollen im folgenden näher betrachtet werden, um bewerten zu können, ob diese leichte Diskordanz technisch oder biologisch bedingt ist. Dazu wurde eine Analyse der einzelnen CpGs in den entsprechenden Amplifikaten untersucht. In Abbildung 27 sind zunächst die normalisierten Sequenzhistogramme von PITX2 dargestellt. Dort sieht man, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur quantitativen Bisulfitsequenzierung auch für die Analyse einzelner CpG-Positionen sehr gut geeignet ist. Dies ist daran zu erkennen, dass sich in Abbildung 27 (oben) für jede CpG-Position die entsprechenden MDA DNA Methylierungsmischungen voneinander unterscheiden lassen – mit einer Ausnahme: Bei der sechsten CpG-Stelle ist im Fall der 0 % Methylierungsmischung offensichtlich ein Nebenprodukt aufgetreten, sodass die normalisierte Peakfläche dort höher ist als die von den 5 %, 10 %, und 25 % Mischungen. Im Vergleich der Patientinnenproben mit den Standard-DNAs sieht man in Abbildung 27 (unten), dass die ersten drei CpGs im Amplifikat deutlich niedriger methyliert sind als die folgenden. Zwar erkennt man anhand der Standard-DNAs, dass die Fluoreszenzintensitäten durchaus von der Position des CpGs abhängen (das fünfte CpG weist beispielsweise eine tendenziell geringere Signalintensität auf), gerade für die ersten vier CpGs sind diese jedoch in den Standard-DNAs sehr ähnlich. Im Fall der Patientinnenproben zeigt jedoch gerade das vierte CpG eine deutlich höhere Methylierung als die ersten drei. Waren einige Patientinnenproben in den ersten drei CpGs noch nahezu unmethyliert, so zeigen sie doch alle beim vierten CpG eine erhöhte Methylierung. Demzufolge ist es nicht möglich, dass nur DNA Moleküle vorkommen, die komplett methyliert oder komplett unmethyliert sind, da in diesem Fall alle CpGs eine vergleichbare Methylierung aufweisen müssten. Es ist bemerkenswert, dass dieses Phänomen in nahezu allen Patientinnenproben so zu finden ist. Die im QM Assay verwendete Detektionssonde deckt gerade die CpG-Positionen zwei, drei und vier ab, also genau den Bereich, in dem von CpG-Stelle drei zu Stelle vier ein Anstieg der Methylierung zu beobachten ist. Trotzdem zeigen beide Technologien gerade für diese Gene eine gute Übereinstimmung der Messwerte, wie in Abbildung 26 gezeigt.

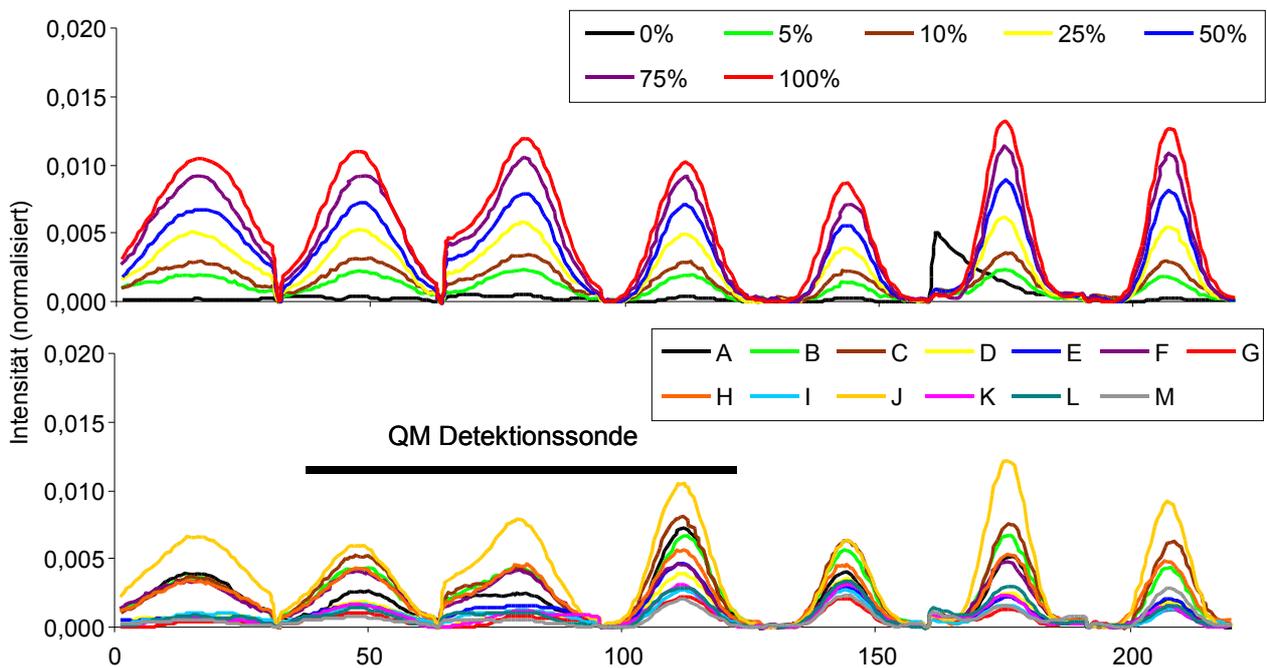


Abbildung 27: Normalisierte Sequenzhistogramme (nur CpG-Positionen) der MDA Standard DNA Mischungen (oben) und der 13 analysierten Patientinnenproben (A - M, unten) für das Gen PITX2 (Promotor AB) und Lage der QM Assay Detektionssonde.

In Abbildung 28 ist die gleiche Auswertung für uPA dargestellt, die bereits in Abbildung 27 für PITX2 gezeigt ist. Auch hier ist wieder eine einzelne Analyse der CpG-Positionen sehr gut möglich. Bei allen zwölf untersuchten CpG-Positionen lassen sich die einzelnen MDA DNA Methylierungsmischungen sehr gut unterscheiden. Im Fall der Patientinnen Proben (Abbildung 27, unten) sind mehrere interessante Phänomene zu beobachten. Zunächst sieht man, dass auch bei uPA die Methylierung der einzelnen CpG-Positionen innerhalb einer Patientinnenprobe nicht gleich ist, also keine Komethylierung der CpG-Positionen vorliegt. Dies fällt besonders bei der CpG-Stelle sieben (bei Laufzeit 200) auf, bei der nahezu alle Patientinnenproben eine etwas erhöhte Methylierung zeigen – im Gegensatz zu den meisten anderen Stellen, die nur bei wenigen Patientinnenproben methyliert sind. Besonders auffällig ist, dass bei Patientin J die CpG-Positionen eins bis sieben auffällig stark methyliert sind, die folgenden jedoch nicht mehr. Die im QM Assay verwendete Detektionssonde deckt die CpG-Positionen acht, neun und zehn ab, also gerade die, die nicht mehr methyliert sind. Folglich ist die per QM Assay gemessene Methylierung niedriger, als die per Sequenzierung gemessene, die ja auf dem Mittel aller CpG-Positionen beruht. Dadurch ist die Diskordanz zwischen dem Sequenzierergebnis und dem QM Assay Ergebnis bei dieser Patientin erklärbar.

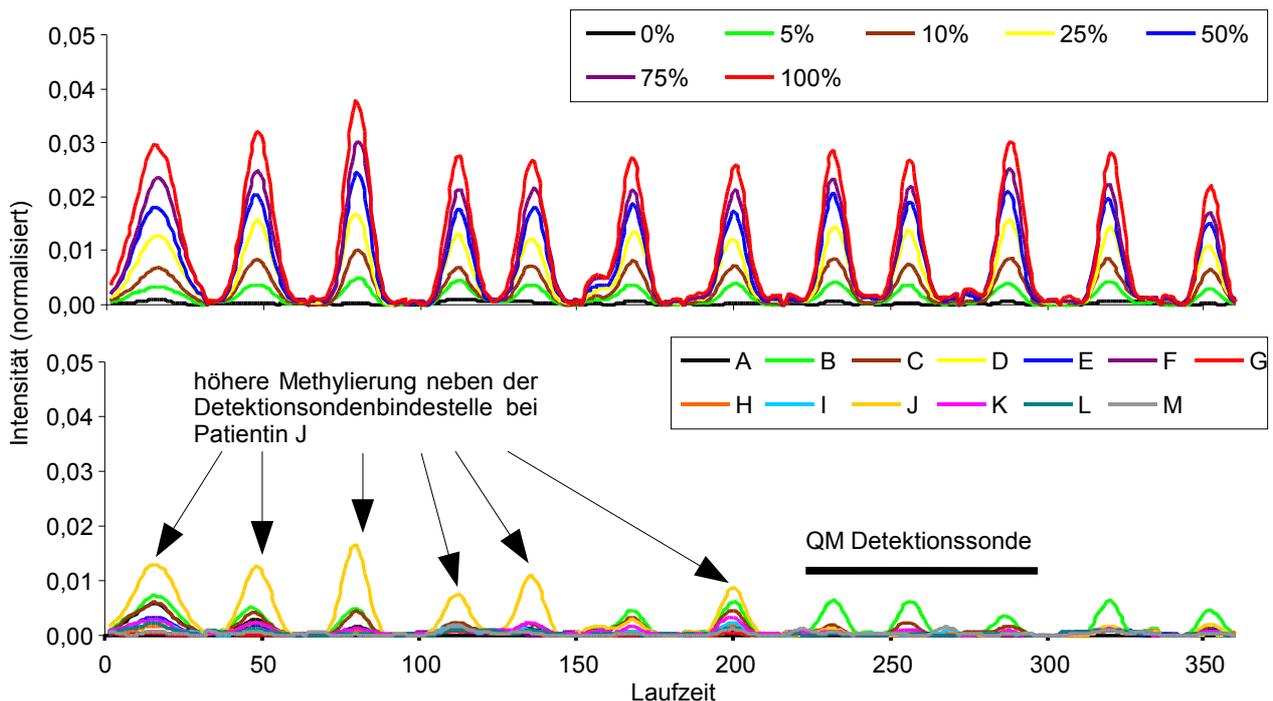


Abbildung 28. Normalisierte Sequenzhistogramme (nur CpG-Positionen) der MDA Standard DNA Mischungen (oben) und der 13 analysierten Patientinnenproben (A - M, unten) für das Gen uPA und Lage der QM Assay Detektionssonde. Bei Patientin J ist eine höhere Methylierung der CpGs außerhalb der Birstelle der Detektionssonde zu finden.

Die für die einzelnen CpGs aufgelösten Ergebnisse der Sequenzierung von TFF1 sind in Abbildung 29 dargestellt. Wie schon im Fall von uPA ist auch hier wieder für alle sieben untersuchten CpG-Positionen eine Unterscheidung der einzelnen DNA Methylierungsstandards ausnahmslos sehr gut möglich. Hier ist auch wieder das Phänomen zu beobachten, welches zuvor schon bei PITX2 auftrat, dass die Signalintensität sich zwischen verschiedenen CpG-Positionen unterscheiden kann. So sieht man, dass die CpG-Stelle fünf eine auffällig niedrigere Signalintensität als alle anderen CpG-Positionen zeigt. Insgesamt scheinen im Gegensatz zu PITX2 und uPA doch im Fall von TFF1 alle Patientinnenproben relativ komethyliert zu sein. Allerdings ist dabei zu beachten, dass die Methylierung der Proben sich in einem Bereich hoher Methylierung befindet, in dem der dynamische Messbereich klein erscheint, was daran zu erkennen ist, dass sich beispielsweise die 0 % Methylierungsmischung von der 25 % Methylierungsmischung wesentlich stärker unterscheidet, als die 75 % von der 50 % Methylierungsmischung. Somit könnte eine fehlende Komethylierung bei TFF1 auch durch diesen geringeren dynamischen Messbereich maskiert sein.

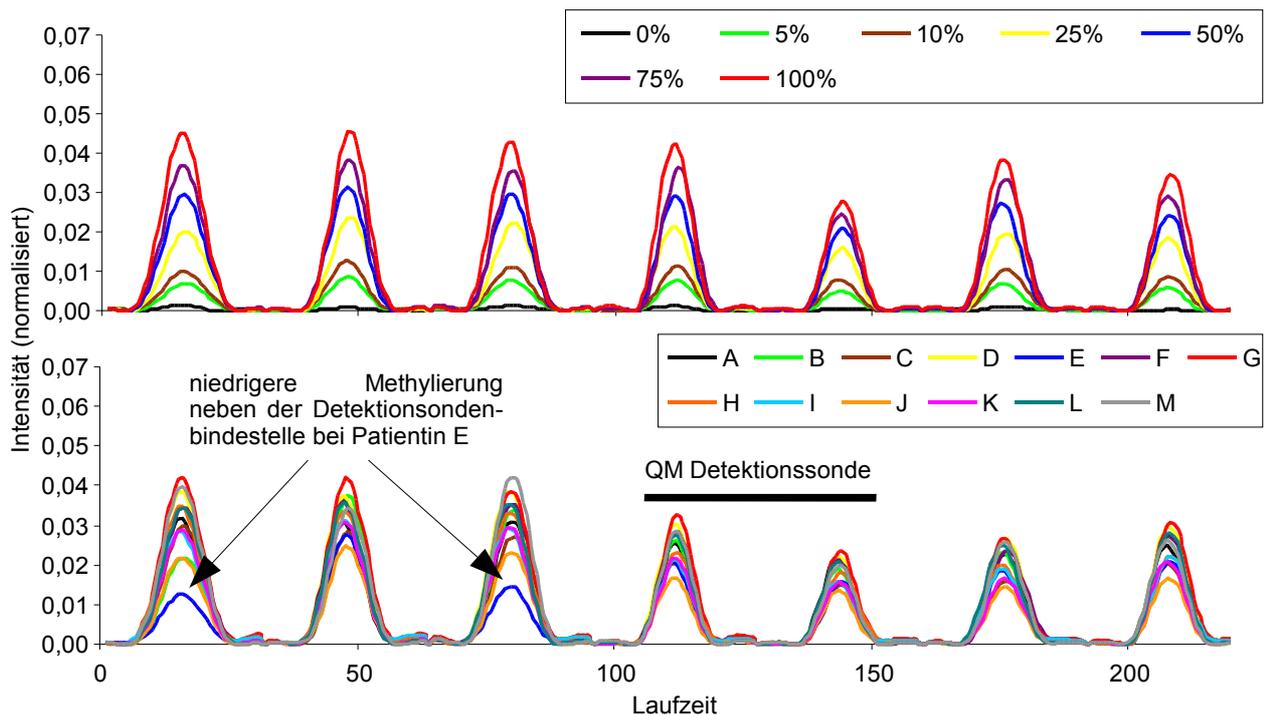


Abbildung 29: Normalisierte Sequenzhistogramme (nur CpG-Positionen) der MDA Standard DNA Mischungen (oben) und der 13 analysierten Patientinnenproben (A - M, unten) für das Gen TFF1 und Lage der QM Assay Detektionssonde. Bei Patientin E ist eine niedrigere Methylierung zweier CpGs außerhalb der Bindestelle der Detektionssonde zu finden.

In Abbildung 29 ist auch zu erkennen, warum es für Patientin E eine Unterschied zwischen QM Assay und Sequenzierung gab. Dort tritt eine deutlich geringere Methylierung an zwei CpG-Positionen (eins und drei) auf. Bei dieser Patientin ist folglich keine Komethylierung gegeben. Die Detektionssonde des QM Assays deckt die Stellen vier und fünf ab und liegt somit nicht im Bereich der CpG-Positionen, die bei Patientin E niedrig methyliert sind.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die auftretenden Unterschiede zwischen QM Assay und Sequenzierung biologisch bedingt sind. Die Sequenzieretechnologie erlaubt verglichen mit der QM Assay Technologie einen tieferen Einblick in die Methylierung der untersuchten Region und ermöglicht auch die Analyse einzelner CpG Positionen. Da es insgesamt eine gute Korrelation zwischen dem über das Amplifikat gemittelten Methylierungswert (aus der Sequenzierung) und dem QM Assay gab, wurde im folgenden hauptsächlich dieser Mittelwert betrachtet.

5.3.2.1.3 Analyse kleinster DNA-Mengen

Die Entwicklung der Sequenziermethode basierte bisher auf dem Einsatz von großen Mengen (20 ng) Bisulfit-DNA in die mPCR der Voramplifikation. Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, mit der es auch möglich ist, geringste Mengen an DNA (wie z.B. aus LMD Proben) zu untersuchen. Da diese geringsten Mengen an DNA erst noch Bisulfit-konvertiert werden mussten, wurde in dieser Arbeit auch eine Methode entwickelt, die es erlaubt, auch einzelne Kopien des humanen Genoms erfolgreich zu konvertieren,

aufzureinigen und die Methylierung vieler Gene zu untersuchen. Der entwickelte Gesamtarbeitsablauf bestand aus einer für geringste DNA Mengen entwickelten Bisulfit-Behandlung, einer mPCR Voramplifikation, anschließender sPCR-Reamplifikationen und abschließend der quantitativen Bisulfitsequenzierung. Dieser Arbeitsablauf wurde gründlich charakterisiert. Es wurde Standard DNAs mit bestimmter, vorher bekannter Methylierung werden und die bestimmte Methylierung mit der tatsächlich eingesetzten Methylierung verglichen. Im Gegensatz zu den Experimenten unter 5.3.2.1.2 wurden hier jedoch nur sehr geringe Mengen an DNA eingesetzt. Daraus ergibt sich ein besonderer Anspruch an diese DNA Standards, der sich von denen in Abschnitt 5.3.2.1.2 unterscheidet. Dort wurde relativ viel DNA zu Entwicklung der Methode in die multiplex-PCR Voramplifikation eingesetzt. Die dafür verwendeten Mischungen aus MDA und künstlich methylierter MDA DNA haben den Vorteil, dass die unmethylierte MDA DNA tatsächlich völlig unmethyliert ist. Dies ist darin begründet, dass die MDA DNA durch eine Amplifikation des Genoms hergestellt wird, bei der die Methylierung wie bei jeder Amplifikationstechnik verloren geht. Dafür hat die künstlich methylierte MDA DNA den Nachteil, dass sie nicht zu 100 % methyliert ist, da sie durch die Art der Amplifikation partiell einzelsträngig vorliegt und somit kein Substrat für die Sss1 Methyltransferase darstellt. Mischungen aus diesen DNAs haben dadurch einen konstanten systematischen, relativen Fehler, der durch den Anteil methylierter DNA herrührt. Solche Mischungen sind gut geeignet, um Assays dahingehend zu untersuchen, wie ihre Leistungsfähigkeit im Bereich von geringer Methylierung ist, da Mischungen in diesem Bereich einen relativ geringen absoluten Fehler aufweisen. Für den Test der entwickelten Technologie mit geringsten DNA Mengen sind diese Mischungen allerdings ungeeignet. Dies liegt daran, dass bei der MDA Amplifikation des Genoms nicht jeder Loci mit derselben Effizienz amplifiziert wird und somit die Kopienzahl nicht für jedes Gen, bzw. für jeden Assay dieselbe ist. Da aber eine definierte Anzahl von Kopien des humanen Genoms in diesem Experiment eingesetzt werden sollten, waren diese DNAs als Standard DNAs ungeeignet. Statt dessen wurden DNAs gewählt, bei denen das gesamte Genom ausgewogen vorliegt. Zur Herstellung dieser Standard DNAs wurde in diesem Experiment extrahierte DNA aus humanem, peripheralem (PBL) Blut und künstlich methylierter PBL DNA verwendet, die eine ausgewogene Kopienzahl der einzelnen Gene aufweist. Allerdings ist bei PBL DNA nicht jedes Gen unmethyliert, sodass 0 % methylierte DNA nicht für jeden Assay herstellbar ist. Es wurden fünf verschiedenen DNA Mischungen hergestellt, die 0, 25, 50, 75 und 100 % methylierte DNA darstellen sollten. Diese Mischungsverhältnisse gelten wie beschrieben nur für solche Gene, die in PBL DNA tatsächlich auch völlig unmethyliert sind. 100 Kopien des humanen Genoms (ca. 340 pg) jeder dieser Mischungen wurden in die Lyse eingesetzt, Bisulfit behandelt, aufgereinigt, vor- und reamplifiziert und Bisulfit-sequenziert. Dabei wurde jede dieser Mischung in zwei von einander unabhängigen Ansätzen (Replikaten) parallel prozessiert. Die Sequenzierung erfolgte in beide Richtungen, d.h. sowohl über den G-reiche, als auch über den C-reichen Primer. Das Ergebnis dieser Technologievalidierung ist in Abbildung 30 dargestellt. Dabei sind die gemessenen Methylierungswerte beider Replikate jeweils aus der C-reichen und aus der G-reichen Sequenzierung und der Mittelwert aus diesen vier Einzelwerten dargestellt. Abbildung 30 zeigt, dass die Charakteristik der 13 Assays sehr unterschiedlich ist. Der Assay für RASSF1A kann beispielsweise sehr gut zwischen 0, 25, 50, 75 und 100 % Methylierung auflösen und zeigt dabei eine hohe Konkordanz der beiden Replikate und auch der beiden Sequenzierrichtungen (Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,996$). Für das Assay für TFF1 gilt genau der beschriebene Fall, dass die PBL DNA in diesem Loci an sich schon zu ca. 50 % methyliert vorliegt. Dementsprechend hatten die eingesetzten Standard DNAs für dieses Loci nicht die Methylierungen von 0, 25, 50, 75 und 100 %, sondern von ca. 50, 63, 75, 88 und 100 %. Umso

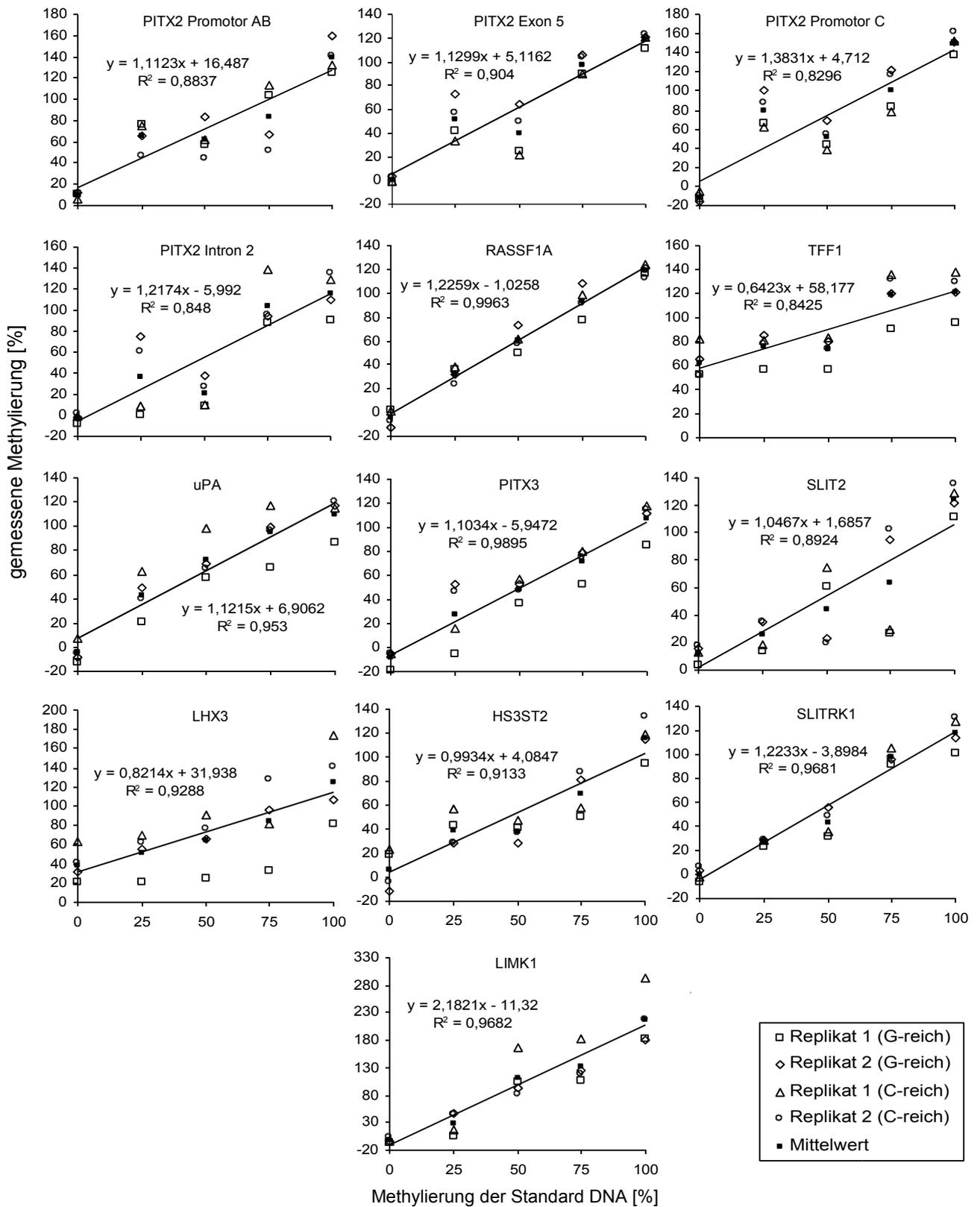


Abbildung 30: Quantifizierung der Methylierung der 13 untersuchten Loci bei Verwendung von ca. 100 genomische Kopien (ca. 340 pg Templat). Jede Methylierungsmischung wurden Bisulfit-konvertiert, voramplifiziert, reamplifiziert und sequenziert. Dargestellt sind die Ergebnisse von C- und G-reicher Sequenzierung aus zwei unabhängigen Ansätzen und deren Mittelwert.

bemerkenswerter ist, dass auch bei diesem Assay eine Auflösung der höchsten, der mittleren und der niedrigsten Methylierung möglich ist. Die Assays für die vier verschiedenen Regionen von PITX2 zeigen alle ein sehr einheitliches Bild: Eine Unterscheidung zwischen 0, 50 und 100 % ist in jedem Fall möglich, jedoch wurde bei den 25 % Mischungen eine höhere Methylierung gemessen, als bei den 50 % Mischungen. Da eine Vertauschung ausgeschlossen werden kann, könnte ein Grund für dieses einheitliche Bild sein, dass diese Assays nicht unabhängig voneinander sind, da sie im selben Gen liegen. Insgesamt gilt für alle Assays (einschließlich TFF1), dass eine Auflösung von 0, 50 und 100 % Methylierung auch bei nur 100 Kopien eingesetzter genomischer DNA möglich ist. Alle Assays zeigen einen Korrelationskoeffizienten für die Korrelation von Methylierung der eingesetzten DNA und der gemessenen Methylierung von mindestens $R^2 = 0,83$.

5.3.2.2 Mikrodisektionsstudie

Die im vorherigen erfolgreich entwickelte und etablierte Technologie zur multiplexierten Analyse von sehr geringen DNA Mengen wurde nun dazu verwendet, um verschiedene Zelltypen innerhalb eines Tumors zu untersuchen. Außerdem wurden auch jeweils die gleichen Zelltypen, in unterschiedlichen Regionen eines Tumors untersucht.

5.3.2.2.1 Patientinnenvorauswahl

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Tumoren von drei verschiedenen Brustkrebspatientinnen näher untersucht. Dazu wurden zunächst geeignete Fälle für diese Studie identifiziert. Insgesamt standen Proben von 13 Patientinnen für eine Mikrodisektionsstudie zur Verfügung. Dabei handelte es sich um dieselben Patientinnenproben, deren Material bereits in Kapitel 5.3.2.1.2.1 zur Validierung der neu entwickelten Methode verwendet wurde. Für die Eignung der Tumoren für diese Studie waren zwei wesentliche Faktoren ausschlaggebend. Zum einen sollte die DNA eine möglichst hohe Qualität aufweisen, sodass eine möglichst großer Teil der vorhandene DNA auch der Analyse zugänglich ist, zum anderen sollten die Tumoren auch eine signifikante Methylierung der wichtigsten Marker, vor allem von PITX2, vorweisen. Wären die interessanten Gene im Gesamttumor nicht signifikant methyliert, dann wäre auch kein Unterschied zwischen den verschiedenen Tumorkomponenten zu erwarten und eine Mikrodisektion wäre zwecklos.

Zur Einschätzung der Qualität, bzw. der Integrität der DNA wurden drei Parameter berücksichtigt. Die mit einem Real-Time PCR Assay (LOC645666 Assay) gemessene Gesamtausbeute an DNA aus den Dünnschnitten gibt einen ersten Hinweis auf die Qualität der DNA. Je mehr PCR amplifizierbare DNA extrahiert werden konnte, umso besser ist in der Regel auch die Qualität, bzw. Integrität. Über eine UV Bestimmung der Reinheit (Verhältnis von der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm) sollte eine Einschätzung über möglicherweise vorhandene DNA-Protein-Quervernetzungen getroffen werden. Letztlich gibt das Verhältnis aus PCR amplifizierbarer (Real-Time quantifizierter) DNA und physikalisch (UV) quantifizierter DNA den relativen Anteil von intakter DNA an der Gesamt-DNA wider.

Tabelle 8: Charakterisierung der DNA aus den verfügbaren Patientinnenproben.

Patientin	Ausbeute ^a [µg]	Reinheit ^b 260nm/280nm	Integrität ^c [%]
A	4,8	2,0	31
B	10,1	1,9	22
C	25,4	2,0	22
D	1,9	2,3	21
E	12,3	2,0	26
F	10,7	2,0	21
G	6,5	1,9	20
H	1,9	2,0	35
I	12,5	2,0	27
J	10,8	1,9	22
K	16,9	2,0	28
L	7,5	2,0	31
M	0,3	2,3	6

Diese drei genannten Parameter sind für die 13 für eine Mikrodisektion zur Auswahl stehenden Patientinnenproben in Tabelle 9 aufgelistet. Bis auf eine Ausnahme (Probe M) zeigten alle Proben eine hohe Ausbeute an DNA (1,9-25,4 µg), eine hohe Reinheit ($1,9 \geq \text{Abs}260/\text{Abs}280 \geq 2,3$) und eine gute Integrität (21-35 %).

Damit standen nach dieser Qualitätsbeurteilung der DNA noch 12 der 13 Patientinnenproben für eine weitere Untersuchung zu Auswahl. Die weitere Eingrenzung der verfügbaren Proben für die Mikrodisektionsstudie wurde basierend auf der Methylierung der einzelnen Marker im Gesamttumor getroffen. Die Methylierung der 13 untersuchten Loci in diesen Tumoren ist in Tabelle 9 aufgelistet. Dabei handelt es sich um die Ergebnisse, die bereits in Kapitel 5.3.2.1.2.1 zur Validierung der neu entwickelten

Sequenziermethode generiert wurden und in den Abbildungen 25 und 26 dargestellt sind. Die mittels Mikrodisektion zu untersuchenden Proben sollten für möglichst viele Marker eine signifikante Methylierung vorweisen, vor allem aber für PITX2 (Promotor AB) und uPA.

Tabelle 9: Methylierung (Gesamtumor) von 13 Patientinnenproben, die für eine Mikrodisektionsstudie zur Verfügung standen. Dargestellt sind Mittelwerte aus G- und C-reicher Sequenzierung. Die für die Mikrodisektion ausgewählten Proben sind grau hinterlegt.

Patientin	Methylierung [%] per Sequenzierung												
	PITX2 AB	RASSF1A	TFF1	UPA	PITX3	SLIT2	LHX3	HS3ST2	SLITRK1	LIMK1	PITX2 Region 8	PITX2 C	PITX2 Region 2
A	23	35	58	-5	9	17	34	1	2	21	36	13	20
B	30	18	56	5	16	27	43	38	21	26	23	26	18
C	37	38	44	0	-2	47	44	32	21	44	27	34	29
D	4	1	72	-9	5	7	24	11	2	23	20	13	3
E	6	40	37	-7	-3	15	29	-7	3	39	17	-7	2
F	22	12	65	-9	19	9	27	28	10	30	39	23	37
G	-3	-2	77	-10	-4	4	32	-8	57	27	55	-10	6
H	29	41	56	-7	14	27	37	42	-2	40	40	27	22
I	1	25	49	-6	-7	3	22	-9	-2	12	15	-9	5
J	59	63	31	11	10	36	52	39	24	55	42	55	29
K	1	29	44	-5	-7	0	19	-9	4	12	13	-11	13
L	3	3	63	-7	-6	3	26	-9	-1	13	20	-9	9
M	-4	-8	68	-7	0	-2	21	-5	2	9	35	4	-4

Die einzige Patientinnenprobe, die Methylierung bei allen 13 untersuchten Loci zeigte (J) wurde nicht für die Mikrodisektionsstudie verwendet, da eine mikroskopische Begutachtung zeigte, dass es sich hierbei nicht um ein invasives Karzinom handelte. Da aber gerade auch der Unterschied in der Methylierung von invasiven und nicht-invasiven Tumorkomponenten untersucht werden sollte, war diese Patientinnenprobe uninteressant. Schließlich wurden die Patientinnenproben A, B und C für die Mikrodisektionsstudie ausgewählt.

5.3.2.2 Methylierungsanalyse mikrodisezierter Proben

Von den ausgewählten Patientinnenproben wurden interessante Tumorkomponenten und Komponenten des gesunden umgebenden Gewebes mikrodiseziert. Dazu wurden sieben verschiedene Komponenten klassifiziert: invasive Tumorzellen (IDC), intraduktale Tumorzellen (DCIS), Stroma, Fettgewebe, Muskelgewebe, Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) und normales Drüsene epithel (Duktuli). Bei der Verwendung des Begriffs „normal“ ist allerdings zu berücksichtigen, dass es sich hier um Zellen handelt, die sich im oder in der Nähe des Tumors befinden. Diese könnten sich somit von Proben aus einer gesunden Brust unterscheiden. Diese Fragestellung sollte jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit behandelt werden, so dass optisch unveränderte Duktuli hier als „normal“ bezeichnet werden. Zu den normalen Duktuli wurde bei der Patientinnenprobe B außerdem eine Form einer gutartigen Wucherung (Adenose) gezählt.

Neben der Mikrodisektion wurden gleichzeitig noch Proben von Fett- und Muskelgewebe makrodiseziert. Bei der Makrodisektion wurden größere Gewebeareale (ca. 5-10 mm²) manuell mit einem Skalpell

ausgeschnitten. Diese Gewebe weisen generell ein ungünstig großes Zellgröße-zu-Kern-Verhältnis (und somit eine geringe DNA Ausbeute) vor, sind aber sehr homogen und eignen sich somit für eine solche Makrodissektion. Die verschiedenen Tumorkomponenten wurden zusätzlich von verschiedenen Orten des Gewebes, bzw. von verschiedenen Paraffinblöcken, die nach der Operation angefertigt wurden, entnommen. Somit sollte sowohl eine Aussage über die Methylierung in Abhängigkeit von der Tumorkomponente, als auch innerhalb einer Tumorkomponente aber von verschiedenen Orten des Tumors möglich sein. Abbildung 31 zeigt das prinzipielle Vorgehen bei der Mikrodissektion am Beispiel von zwei DCIS, einer IDC und einer normalen Duktuli Probe (LMD Proben 27, 28 und 29). Zunächst wurden die interessanten Areale auf einem HE gefärbten Dünnschnitt identifiziert (Abbildung 31, A). Dieser HE gefärbte Dünnschnitt ist ein Schnitt, der von dem Paraffinblock direkt vor bzw. hinter dem eigentlichen zu dissezierenden Schnitt geschnitten wurde und dadurch eine sehr ähnliche Morphologie aufweist. Anschließend wurden diese Areale in dem für die Mikrodissektion geeigneten Dünnschnitt lokalisiert und ausgeschnitten (Abbildung 31, B). Der für die Mikrodissektion verwendete Dünnschnitt unterscheidet sich von dem HE Schnitt erstens darin, dass der Objektträger Membran-beschichtet war, dass er zweitens nur leicht gefärbt wurde (nur mit Hämatoxylin), um eine DNA Schädigung zu vermeiden und dass er drittens etwas dicker als der HE Schnitt war, um so mehr DNA aus den Proben gewinnen zu können. Nach der erfolgreichen Dissektion wurden die Proben entsprechend der zuvor entwickelten Technologie prozessiert, d.h. die Gewebe wurden lysiert, Bisulfit-konvertiert, aufgereinigt, voramplifiziert (in einer mPCR), reamplifiziert (in 13 verschiedenen sPCRs) und schließlich mittels der neuentwickelten Sequenzier-technologie sequenziert und ausgewertet (Abbildung 31, C).

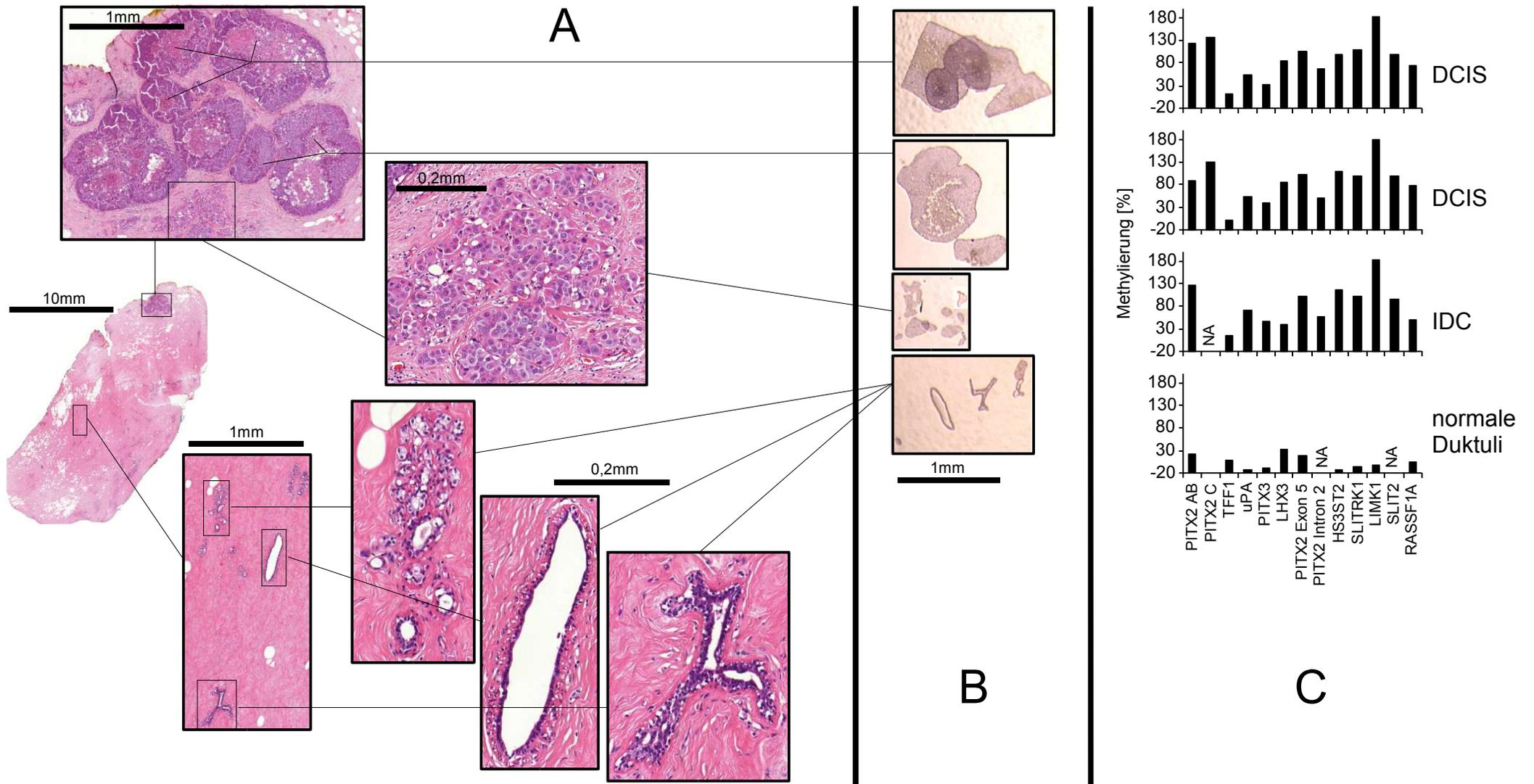


Abbildung 31: Prinzipielle Vorgehensweise bei der Durchführung der Mikrodissektionsstudie am Beispiel von zwei DCIS, einer IDC und einer normalen Duktuli Probe: Identifikation der interessanten Areal mit Hilfe eines HE Schnittes (A), Mikrodissektion der entsprechenden Areale vom Mikrodissektionschnitt (B) und Probenlyse, Bisulfitbehandlung und Aufreinigung, mPCR Voramplifikation, sPCR Reamplifikation, Sequenzierung und Auswertung (C).

Die von den einzelnen Patientinnenproben dissezierten Komponenten sind in der Tabelle 19 aufgelistet (Anhang S. 167). In dieser Tabelle sind ebenfalls die Verknüpfungen zu den entsprechenden Fotos von diesen Proben enthalten, die sich ebenfalls im Anhang befinden (S. 169-194).

Für die Beurteilung der Verlässlichkeit des Methylierungswertes, der in einer LMD Probe gemessen wurde, ist es notwendig zu wissen, wieviel Templatmoleküle tatsächlich in dieser LMD Probe enthalten waren. Würde das Ergebnis nur auf einzelnen Templatmolekülen beruhen, so wäre es aus stochastischen Gründen nicht repräsentativ für die LMD Probe. Von den 59 mikro- und makrodissezierten Proben von zwei Patientinnen (B und C) wurde daher eine sensitive, Real-Time PCR basierte Quantifizierung durchgeführt, die die Quantifizierung von Bruchteilen des Genoms ermöglicht. Es wurden ebenfalls die Prozesskontrollen quantifiziert, die einen Hinweis auf eine mögliche Kontamination während der gesamten Prozedur liefern. Diese Quantifizierung wurde freundlicherweise von Dr. Reimo Tetzner (Epigenomics AG) durchgeführt und die Ergebnisse zur Verfügung gestellt. Abbildung 32 zeigt den Zusammenhang zwischen der Anzahl reamplifizierter Loci und in der Probe enthaltenen Kopien des Genoms. Dort ist zu erkennen, dass die Anzahl der erfolgreich reamplifizierten Loci bei steigender Templatmenge zunimmt. Ab einer Templatmenge von 25 Kopien des Genoms können bis auf eine Ausnahme mindestens zwölf der 13 Loci reamplifiziert werden. Die Anzahl der erfolgreich reamplifizierten Loci ist somit indirekt ein Maß für die in der Probe vorliegende Templatmenge.

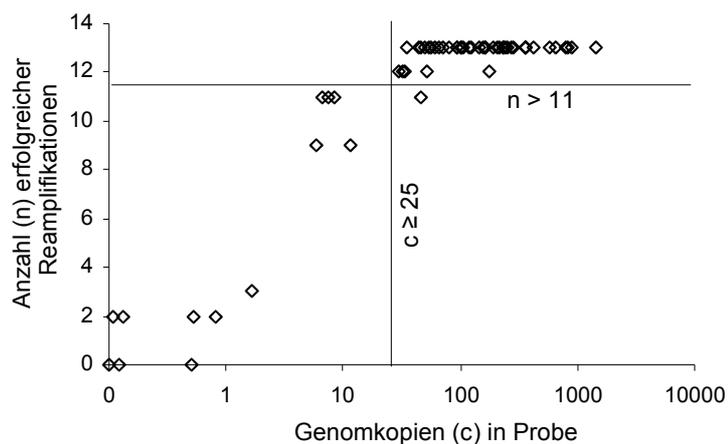


Abbildung 32: Zusammenhang der Anzahl der in einer Probe enthaltenen Kopien des Genoms und der Anzahl der erfolgreich reamplifizierten Loci.

Im folgenden ist sowohl für die Prozesskontrollen, als auch für die einzelnen LMD Proben immer die Anzahl der erfolgreich sequenzierten LOCI annotiert, um die Zuverlässigkeit der Messergebnisse beurteilen zu können. Die Prozesskontrollen sollten darüber Aufschluß geben, ob der gemessene Methylierungswert von einer potentiellen DNA Kontamination herrühren könnte oder tatsächlich aus der LMD Probe stammte.

Die Ergebnisse der Mikrodisektionsstudie sind in den Abbildungen 33 - 36 nach Genen unterteilt dargestellt. In jedem dieser vier Darstellungen sind die Ergebnisse von allen drei Patientinnen (A, B und C) und jeweils von vier Loci gezeigt, es gibt also für jede LMD Probe jeweils vier Messwerte in diesen Darstellungen. Innerhalb einer Darstellung erfolgte die Sortierung nach Art der Tumorkomponente, also DCIS, IDC, normale Duktuli, Stroma, Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL), Fett- und Muskelgewebe. Über jeder untersuchten Probe steht in den Darstellungen ein Code aus drei Zahlen. Die erste Zahl repräsentiert die Nummer der LMD Probe, über die sich diese Probe anhand der Tabelle 19 (Anhang) den entsprechende Fotos (ebenfalls im Anhang) der mikrodisezierten Proben zuordnen lassen. Die zweite Zahl steht für die Nummer des

Paraffinblocks, aus dem diese Probe stammt. Damit sollte eine Beurteilung der Heterogenität der Methylierung zwischen verschiedenen Paraffinblöcken einer Patientin ermöglicht werden. Schließlich steht die dritte Zahl für die Anzahl der bei dieser Proben nicht erfolgreich amplifizierten Loci und damit wie beschrieben indirekt für die Zuverlässigkeit des Ergebnis. Der Code 17/4/3 bedeutet folglich, dass bei der von Paraffinblock vier stammenden LMD Probe (Probennummer 17) nur 10 (13 - 3) von 13 möglichen Loci erfolgreich amplifiziert werden konnten. Die Codes der Proben, bei denen weniger als zwölf der 13 Loci erfolgreich amplifiziert werden konnten sind in den Abbildungen rot markiert.

Die Ergebnisse für die Gene TFF1, uPA, RASSF1A und PITX2 (Promotor AB) sind in Abbildung 33 gezeigt.

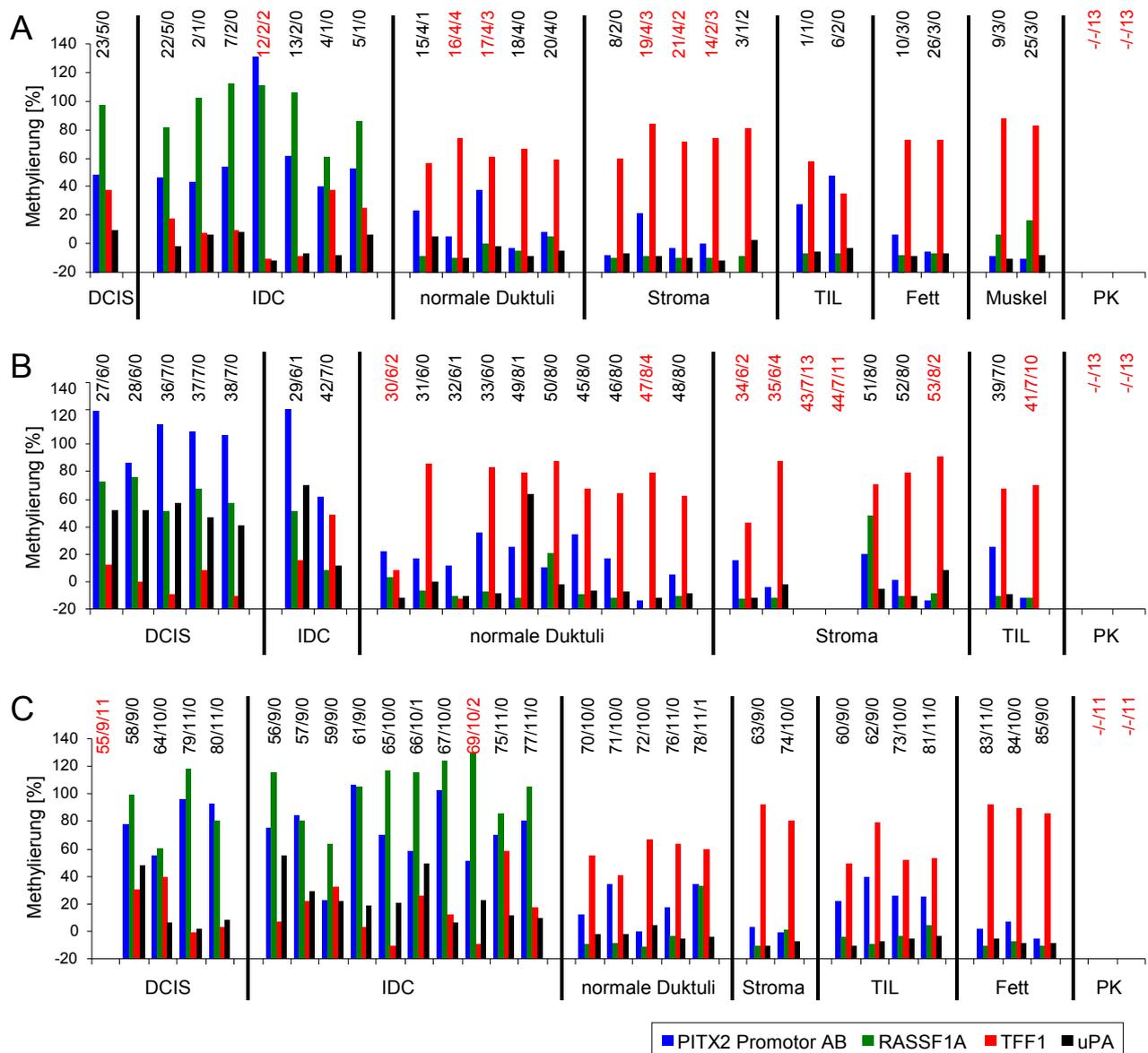


Abbildung 33: Methylierung in den Prozesskontrollen (PK) und den LMD Proben der drei untersuchten Patientinnen (A, B und C), sortiert nach Tumorkomponente (DCIS, IDC, normale Duktuli, Stroma, TIL, Fett und Muskel). Der Code über den einzelnen Proben zeigt die Nummer der LMD Probe, die Nummer des Paraffinblockes und die Anzahl der fehlgeschlagenen Sequenzierungen. Dargestellt ist die Methylierung der Gene PITX2 (Promotor AB), RASSF1A, TFF1 und uPA.

Dort sieht man zunächst, dass die Mikrodisektionsstudie insgesamt sehr gut funktioniert hat, da von den 79 mikro- und makrodisezierten Proben nur bei 16 weniger als zwölf der 13 Loci analysiert werden konnten. Gleichzeitig wurden nur bei zwei (bei Patientin C) der insgesamt sechs Prozesskontrollen (PK) jeweils zwei Loci amplifiziert, sodass ein Kontaminationsproblem nicht vorliegt.

Bei den beiden in der Prozesskontrolle amplifizierten (also kontaminierten) Genen handelt es sich nicht um Gene, die in Abbildung 33 dargestellt sind. Somit ist für diese vier dort gezeigten Loci erstens gesichert, dass die gemessenen Methylierungswerte nicht von einer potentiellen Kontamination herrühren und zweitens, dass zumindest für die Patientinnen A und B eine Abschätzung der ursprünglich vorliegenden Anzahl an Templatmolekülen anhand der Anzahl der erfolgreich amplifizierten Loci getroffen werden kann, da dort die Prozesskontrollen alle negativ sind.

In Abbildung 33 ist zu erkennen, dass das Gen RASSF1A in den DCIS und IDC Proben methyliert ist. Hierbei ist kein signifikanter Unterschied zwischen den DCIS und den IDC Proben erkennbar. Alle anderen untersuchten Tumorkomponenten zeigen keine erhöhte Methylierung von RASSF1A. Insgesamt erscheint die Varianz der Methylierung innerhalb von Proben der gleichen Tumorkomponentengruppe gering. Es sind auch keine signifikanten Unterschiede in der Methylierung gleicher Komponenten in unterschiedlichen Blöcken zu erkennen. Zumindest ist die auftretende Varianz durchaus im Rahmen der Messungenauigkeit der Methode, wie sie bei der Analyse von geringen DNA Mengen auftritt (wie in Kapitel 5.3.2.1.3, Abbildung 30 zu erkennen ist). Es ist auffällig, dass es zwischen den drei Patientinnen Unterschiede in der Methylierung von RASSF1A gibt: Die DCIS und IDC Proben von Patientin A und C sind zu ungefähr 100 % methyliert, wohingegen diese Komponenten bei Patientin B nur zu ca. 60 % methyliert sind.

Die Methylierung des Promotors AB von PITX2 verhält sich ähnlich wie die Methylierung von RASSF1A. Genau wie bei RASSF1A ist auch PITX2 vorwiegend in den Tumorzellen, also in IDC und DCIS methyliert und in den anderen Zelltypen eher unmethyliert. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen DCIS und IDC zu finden. Außerdem ist innerhalb einer Tumorkomponentengruppe und zwischen verschiedenen Paraffinblöcken keine auffällige Heterogenität in der Methylierung erkennbar. Auch bei PITX2 ist wie bei RASSF1A auffällig, dass die Methylierung der DCIS und IDC zwischen den drei Patientinnen signifikant unterschiedlich ist: Bei Patientin A sind diese durchschnittlich zu ca. 50 %, bei Patientin B ca. 100 % und bei Patientin C zu ca. 70 % methyliert. Im Gegensatz zu RASSF1A ist der Promotor von PITX2 jedoch auch erhöht in den normalen Duktuli und den in TIL methyliert. Letzteres ist besonders gut bei den Patientinnen A und C zu sehen, bei denen bei allen sechs untersuchten TIL Proben jeweils alle 13 Loci amplifiziert werden konnten und dieses Ergebnis damit sehr aussagekräftig ist. Dort sind die TIL durchschnittlich ca. 20 % methyliert. Die Methylierung der TIL erscheint insgesamt zwischen den Proben von verschiedenen Orten sehr homogen. Die erhöhte Methylierung in einigen der normalen Duktuli ist gut bei Patientin C zu erkennen, wo alle gemessenen normalen Duktuli ein zuverlässiges Ergebnis zeigen. Dort ist die Methylierung von vier der fünf Duktuli höher als bei allen Fett- und Stromaproben von dieser Patientin. Eine ähnliche Tendenz ist auch bei den anderen beiden Patientinnen zu erkennen. Insgesamt ist diese erhöhte Methylierung jedoch nicht so homogen über die normalen Duktuli verteilt, wie es bei den TIL der Fall war.

Die Methylierung von uPA zeigt wiederum eine vergleichbare Verteilung wie die Methylierung von RASSF1A. Bei Patientin B und C ist nur Methylierung in den IDC und DCIS Proben zu finden. Alle anderen Tumorkomponenten sind nicht methyliert. Auch bei uPA ist die Methylierungsheterogenität zwischen IDC und DCIS, zwischen verschiedenen Paraffinblöcken und innerhalb gleicher Tumorkomponenten gering. Bei Patientin A ist generell keine Methylierung von uPA zu finden. Dies korreliert auch mit der Beobachtung, dass

bereits im Gesamttumor bei dieser Patientin keine Methylierung dieses Gens zu finden war.

Grundsätzlich unterschiedlich im Vergleich zu den bisher betrachteten Genen verhält sich die Methylierung von TFF1. TFF1 ist in allen Komponenten, bis auf die Krebszellen (IDC und DCIS) zu ca. 60 % methyliert. Dagegen sind die IDC und DCIS Komponenten bei allen drei Patientinnen durchschnittlich nur zu ca. 20 % methyliert. Auch bei TFF1 ist wieder kein Unterschied in der Methylierung von DCIS und IDC zu finden. Allerdings scheint die Schwankung der Methylierung innerhalb einer gleichen Tumorkomponente etwas höher zu sein, als bei den anderen bisher betrachteten Genen. So findet man allen drei Patientinnen sowohl Tumorzellen (DCIS oder IDC), die zu 0 % als auch welche, die zu ca. 40 % methyliert sind. Dabei ist jedoch kein klarer Zusammenhang mit dem Block, von dem diese Proben stammen zu erkennen. Betrachtet man die weiteren neben DCIS und IDC untersuchten Komponenten, so findet man bei den Patientinnen A und C

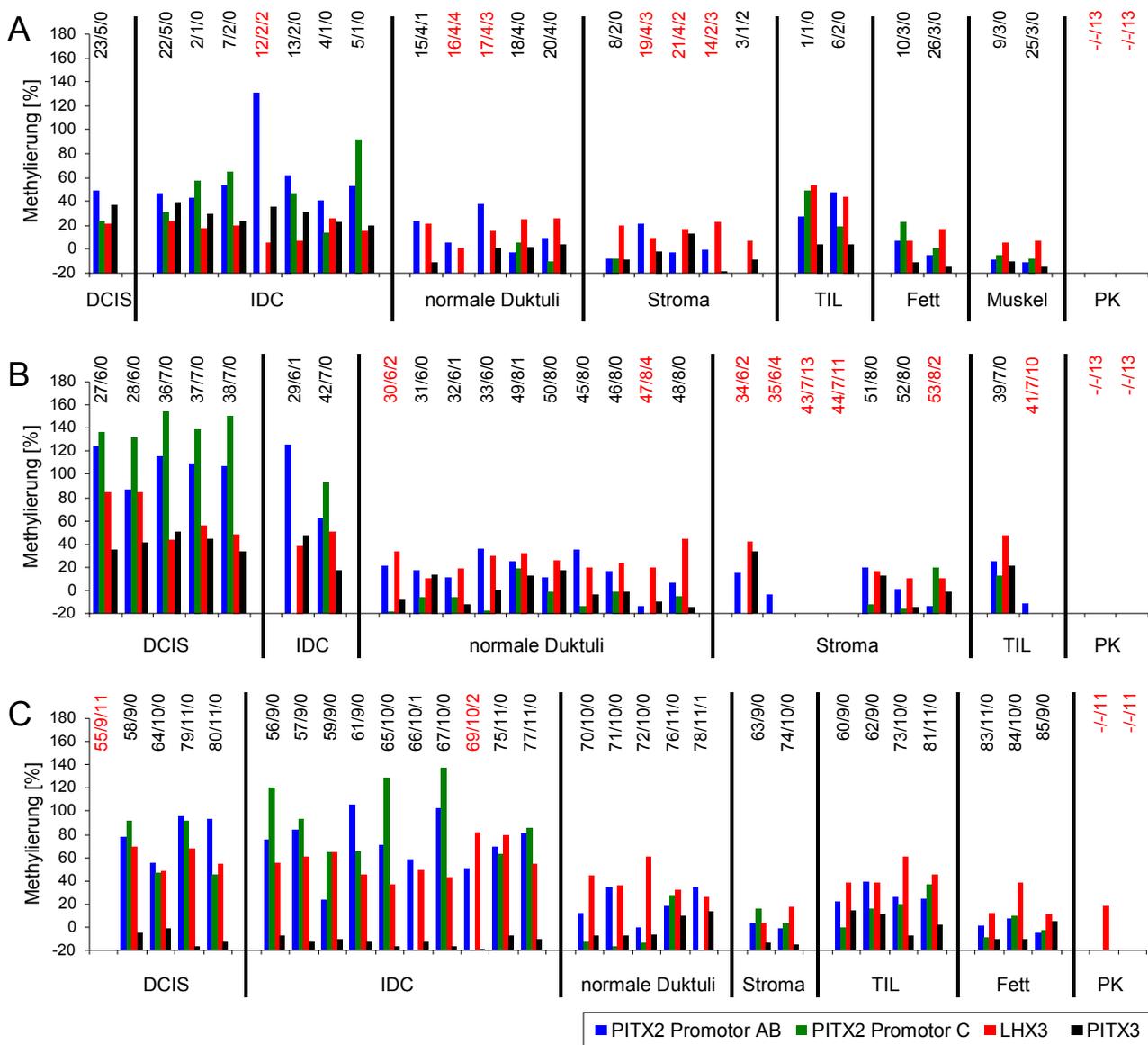


Abbildung 34: Methylierung in den Prozesskontrollen (PK) und den LMD Proben der drei untersuchten Patientinnen (A, B und C), sortiert nach Tumorkomponente (DCIS, IDC, normale Duktuli, Stroma, TIL, Fett und Muskel). Der Code über den einzelnen Proben zeigt die Nummer der LMD Probe, die Nummer des Paraffinblocks und die Anzahl der fehlgeschlagenen Sequenzierungen. Dargestellt ist die Methylierung der Gene PITX2 (Promotor AB), PITX2 (Promotor C), LHX3 und PITX3.

eine etwas geringere Methylierung in den normalen Duktuli und in den TIL im Vergleich zu Stroma-, Fett- und Muskelgewebe. Insgesamt verhält sich die Methylierung von TFF1 nahezu invers im Vergleich zu der Methylierung des Promotors AB von PITX2: Die Komponenten, die eine hohe PITX2 Methylierung aufweisen sind gering bei TFF1 methyliert und umgekehrt. Die steht mit der Eigenschaft dieser beiden prognostischen Marker im Einklang: gute Prognose bei hoher TFF1 Methylierung und niedriger PITX2 Methylierung im Gesamttumor.

Bemerkenswert ist zusätzlich, dass sich auch die der Gruppe der normalen Duktuli zugeteilten Adenosin-Proben (Patientin B, LMD-Proben 45-48) in Ihrer Methylierung nicht von den normalen Duktuli unterscheiden. Dies ist auch bei den im folgenden beschriebenen Gene zu beobachten.

Die Methylierung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten potentiell prognostischen Marker LHX3 und PITX3, sowie des alternativen Promotors (Promotor C) von PITX2 im Vergleich zu dem Promotor AB von PITX2 ist in Abbildung 34 dargestellt. Dort erkennt man, dass sich die Methylierung des alternative Promotors C von PITX2 in diesen drei Patientinnenproben genauso verhält, wie die Methylierung des Promotors AB. Dies steht wiederum mit der Beobachtung im Einklang, dass beide Promotoren auch im Gesamttumor (Tabelle 9) nahezu gleich stark methyliert waren. So konnte auch im Promotor C wieder eine signifikant erhöhte Methylierung in den TIL im Vergleich zu den anderen gesunden Geweben gefunden werden. PITX3 ist im Vergleich zu PITX2 in den drei Patientinnenproben geringer methyliert. Bei Patientin A und B sind wieder die DCIS und IDC Komponenten stärker methyliert als die anderen untersuchten Komponenten. Bei Patienten C ist dagegen keine Methylierung von PITX3 in den DCIS und IDC Proben zu finden. Diese erscheinen sogar etwas geringer methyliert als die normalen Duktuli, den TIL und dem Fettgewebe. Eine erhöhte Methylierung in den TIL im Vergleich zu den normalen Duktuli, dem Stroma und dem Muskel- und Fettgewebe, wie es bei PITX2 der Fall ist, ist bei allen drei Patientinnen nicht eindeutig erkennbar. LHX3 ist im Gesamttumor bei allen drei Patientinnen höher methyliert als PITX2 (Tabelle 9). Dies lässt sich nach der Mikrodisektionsstudie gut mit der Beobachtung erklären, dass die normalen Duktuli, die TIL, das Stroma und das Fett- und Muskelgewebe im Vergleich zu PITX2 eine etwas höhere Methylierung des LHX3 Gens aufweisen. Wie bei PITX2 sind zumindest bei den Patientinnen B und C auch wieder die DCIS und IDC Komponenten signifikant stärker methyliert als die anderen Komponenten, allerdings ist der Unterschied bei diesem Gen nicht so groß. Auch für LHX3 ist wieder eine erhöhte Methylierung der TIL im Vergleich zu den anderen Geweben außer DCIS und IDC zu finden.

In Abbildung 35 ist die Methylierung der vier verschiedenen untersuchten Regionen des PITX2 Gens dargestellt. Dabei erkennt man, dass sie beiden intragenischen Bereiche im Intron zwei und Exon fünf prinzipiell auch in den DCIS, IDC und TIL Proben methyliert sind. Allerdings ist die Methylierung dort durchschnittlich etwas geringer oder maximal genauso hoch, wie die Methylierung der beiden Promotoren AB und C. Damit verhalten sich diese drei Patientinnenproben anders als nach den Ergebnissen der Zellliniensequenzierungen (5.1.1) zu erwarten war, die ergaben, dass die intragenischen Bereiche in Krebszelllinien eher stärker methyliert sind als die Promotoren.

Anders als in den Tumorzellen liegen die Verhältnisse in den normalen Duktuli, im Stroma und im Fett- und Muskelgewebe. Hier sind fast immer die beiden intragenischen Bereiche stärker methyliert als die Promotoren. Dadurch, dass die intragenischen Bereiche in den IDC, DCIS und TIL tendenziell etwas weniger und in den anderen Geweben etwas höher als die beiden Promotoren methyliert sind, ist insgesamt der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen von Geweben nicht so ausgeprägt, wie es für die Promotoren

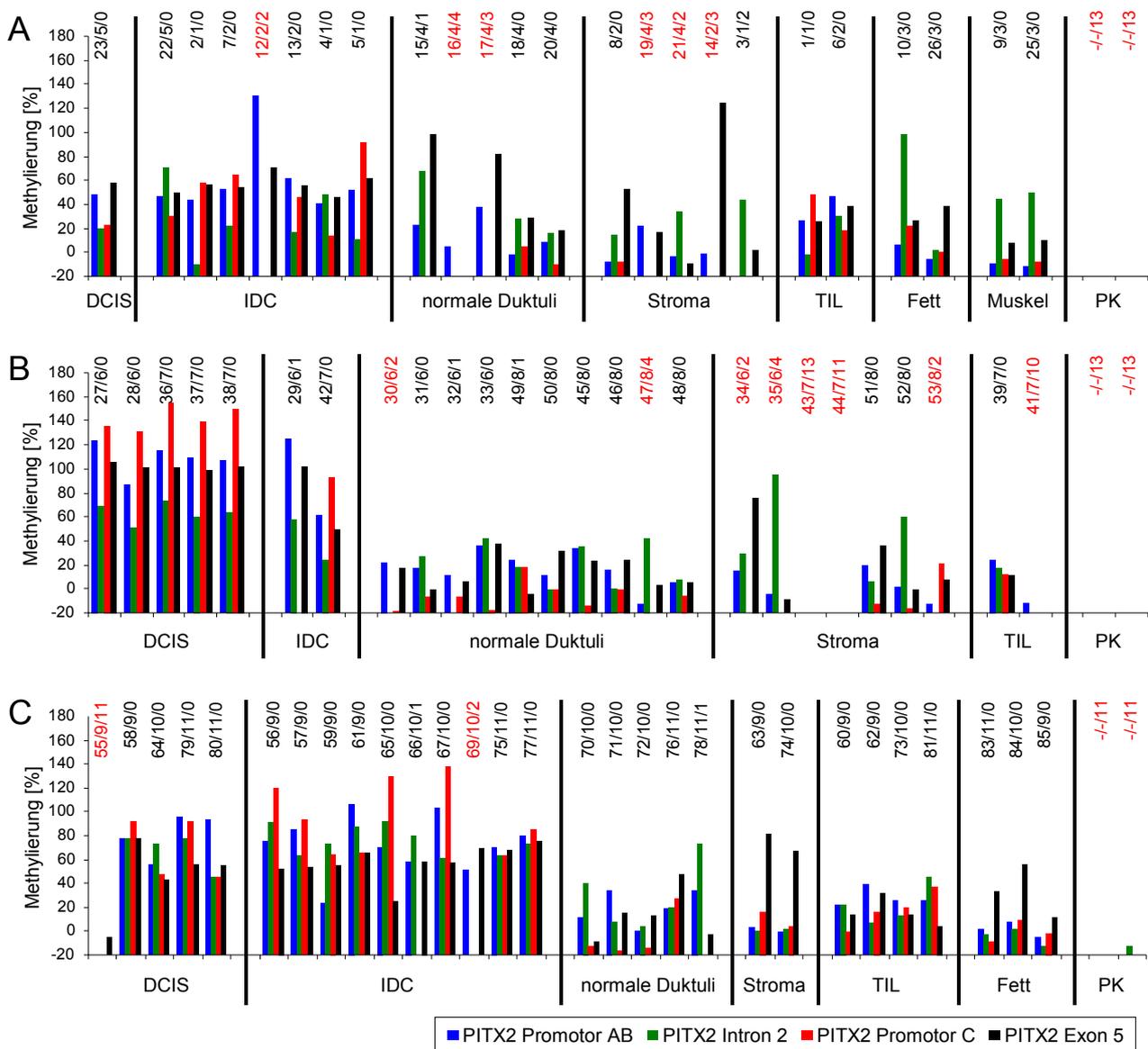


Abbildung 35: Methylierung in den Prozesskontrollen (PK) und den LMD Proben der drei untersuchten Patientinnen (A, B und C), sortiert nach Tumorkomponente (DCIS, IDC, normale Duktuli, Stroma, TIL, Fett und Muskel). Der Code über den einzelnen Proben zeigt die Nummer der LMD Probe, die Nummer des Paraffinblocks und die Anzahl der fehlgeschlagenen Sequenzierungen. Dargestellt ist die Methylierung der verschiedenen PITX2 Regionen (Promotor AB, Promotor C, Intron 2 und Exon 5).

der Fall war. So ist bei Patientin A nahezu kein Unterschied zwischen allen verschiedenen Gewebe zu erkennen. Eine Aussage, welche der Gewebe außer DCIS und IDC in den intragenischen Bereichen besonders hoch methyliert ist, lässt sich kaum treffen, da die Heterogenität insgesamt relativ hoch erscheint. Auffällig ist, dass bei Patientin C das Exon 5 im Stroma und im Fett höher methyliert ist als die anderen drei Regionen. Bei Patientin A ist das Intron zwei im Muskelgewebe auffällig höher methyliert als die anderen Regionen von PITX2. Weitere Aussagen lassen sich gerade in Anbetracht der großen Schwankungsbreite und unter Einbezug der Zuverlässigkeiten der Messungen der Proben, bei denen nicht alle 13 Loci amplifiziert werden konnten, nicht treffen.

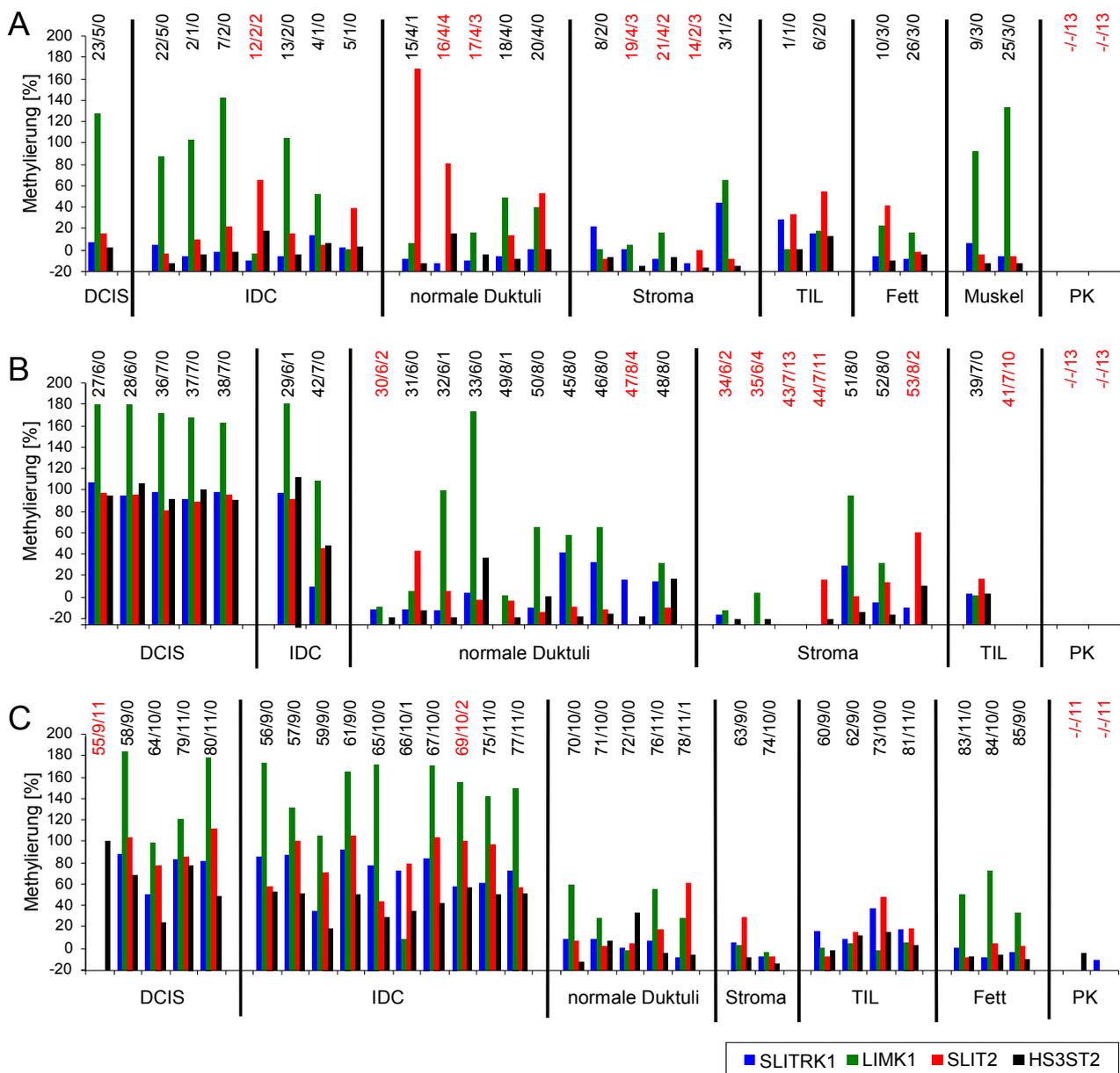


Abbildung 36: Methylierung in den Prozesskontrollen (PK) und den LMD Proben der drei untersuchten Patientinnen (A, B und C), sortiert nach Tumorkomponente (DCIS, IDC, normale Duktuli, Stroma, TIL, Fett und Muskel). Der Code über den einzelnen Proben zeigt die Nummer der LMD Probe, die Nummer des Paraffinblocks und die Anzahl der fehlgeschlagenen Sequenzierungen. Dargestellt ist die Methylierung der Gene SLITRK1, LIMK1, SLIT2 und HS3ST2.

Bei den vier letzten untersuchten Genen (LIMK1, SLIT2, SLITRK1 und HS3ST2), handelte es sich um Gene, deren Methylierung in früheren Studien als diagnostische Biomarker identifiziert werden konnten (Lesche *et al.* 2006). Dort wurde gefunden, dass sich diese Gene ähnlich wie RASSF1A in sehr vielen Tumoren stärker methyliert sind als in gesunden Brustgeweben, beispielsweise aus Brustreduktionen. Eine potentiell prognostische Eigenschaft dieser Marker ist bisher nicht bekannt, wurde aber auch noch nicht untersucht. Die Methylierung dieser vier Gene in den mikrodisszierten Proben ist in Abbildung 36 dargestellt. Betrachtet man zunächst die Methylierung dieser Gene im Gesamttumor (Tabelle 9), dann erkennt man, dass alle vier

Gene in den Patientinnenproben zu 17-47 % methyliert sind, mit zwei Ausnahmen: Patientin A zeigt keine Methylierung der Gene SLITRK1 und HS3ST2. Demzufolge ist bei dieser Patientin auch keine Methylierung dieser beiden Gene in den mikrodisssezierten Proben zu erwarten. Dies ist so auch in Abbildung 36 wieder zu finden, keine der LMD Proben von Patientin A zeigt Methylierung bei einem dieser beiden Gene. Ansonsten zeigt die Methylierung dieser vier Gene in allen drei Patientinnenproben ein ähnliches Bild, wie es schon bei den anderen untersuchten Genen zu beobachten war: Die Methylierung kommt hauptsächlich in den Tumorzellen (IDC und DCIS) vor. IDC und DCIS unterscheiden sich untereinander kaum. Alle Gene weisen sporadische Methylierung in den normalen Duktuli auf, bei denen insgesamt auch die Unterschiede zwischen den einzelnen LMD Proben größer sind. Außerdem ist auch bei LIMK1 eine erhöhte Methylierung im Fett- und Muskelgewebe zu finden, wie sie schon bei den beiden untersuchten intragenischen Bereichen von PITX2 zu finden war. Allerdings gibt es auch hier Unterschiede zwischen den Patientinnen: Im Fettgewebe von Patientin C ist LIMK1 stärker methyliert als bei Patientin A.

Bei den bisherigen Betrachtungen der Ergebnisse der Mikrodisssektionsstudie wurden immer die gemittelten Methylierungswerte über das gesamte jeweilige Amplifikat als Messwert verwendet. Dabei ergaben sich Methylierungswerte in den mikrodisssezierten Proben, die sich deutlich von 0 %, 50 % und 100 % Methylierung unterschieden. Diese drei Stufen sind jedoch genau die, die zu erwarten sind, wenn eine reine Population an Zellen untersucht würde, da in diesem Fall entweder kein, eins oder beide Allele einer Zelle methyliert wären. Im folgenden soll nun untersucht werden, ob diese Abweichung von der Erwartung entweder darauf zurückzuführen ist, dass die CpG-Positionen nicht komethyliert sind und demzufolge sich der Mittelwert für das Amplifikat von 0 %, 50 % und 100 % unterscheidet, oder ob innerhalb der mikrodisssezierten Proben weiterhin eine Heterogenität der Methylierung zwischen den Zellen existiert. Zu diesem Zweck sind in Abbildung 37 für die drei Gene TFF1, uPA und PITX2 die normalisierten Sequenzhistogramme dargestellt. Dabei wurden exemplarisch nur IDC und DCIS Proben von einer Patientin (Patientin C) ausgewählt und davon auch nur diejenigen, bei denen alle 13 Loci erfolgreich analysiert werden konnten und diese Proben somit eine hohe Zuverlässigkeit der Ergebnisse versprechen.

Für alle drei Gene können dabei zwei Beobachtungen gemacht werden. Zum einen sind die mikrodisssezierten Proben nicht komethyliert, zum anderen kommen auch an jeder einzelnen CpG-Stelle Methylierungswerte vor, die sich von 0 %, 50 % und 100 % unterscheiden. Erstere Beobachtung lässt sich besonders gut an den Ergebnissen für uPA (Abbildung 37, Mitte) fest machen. Dort zeigen alle Tumorproben eine deutliche Methylierung der ersten CpG-Positionen, wo hingegen die hinteren CpG-Positionen kaum oder gar nicht methyliert sind. Das zweite Phänomen ist bei allen drei Genen gleichermaßen gut zu sehen: Die Methylierung aller Tumorproben decken an den einzelnen CpG-Positionen ein breites Spektrum möglicher Werte ab, die sich eindeutig von 0 %, 50 % und 100 % Methylierung unterscheiden. Die Tatsache, dass keine Komethylierung vorliegt, wurde so schon bei der Analyse der einzelnen CpG-Positionen in den heterogenen Gesamttumor-Proben gefunden (siehe Kapitel 5.3.2.1.2.1) und konnte hier nochmals bestätigt werden. Der Befund, dass auch innerhalb von mikrodisssezierten Proben ein breites Spektrum an Methylierungswerten gemessen wurde, zeigt, dass es auch innerhalb dieser mikrodisssezierten Zellen weiterhin Heterogenität der Methylierung gibt.

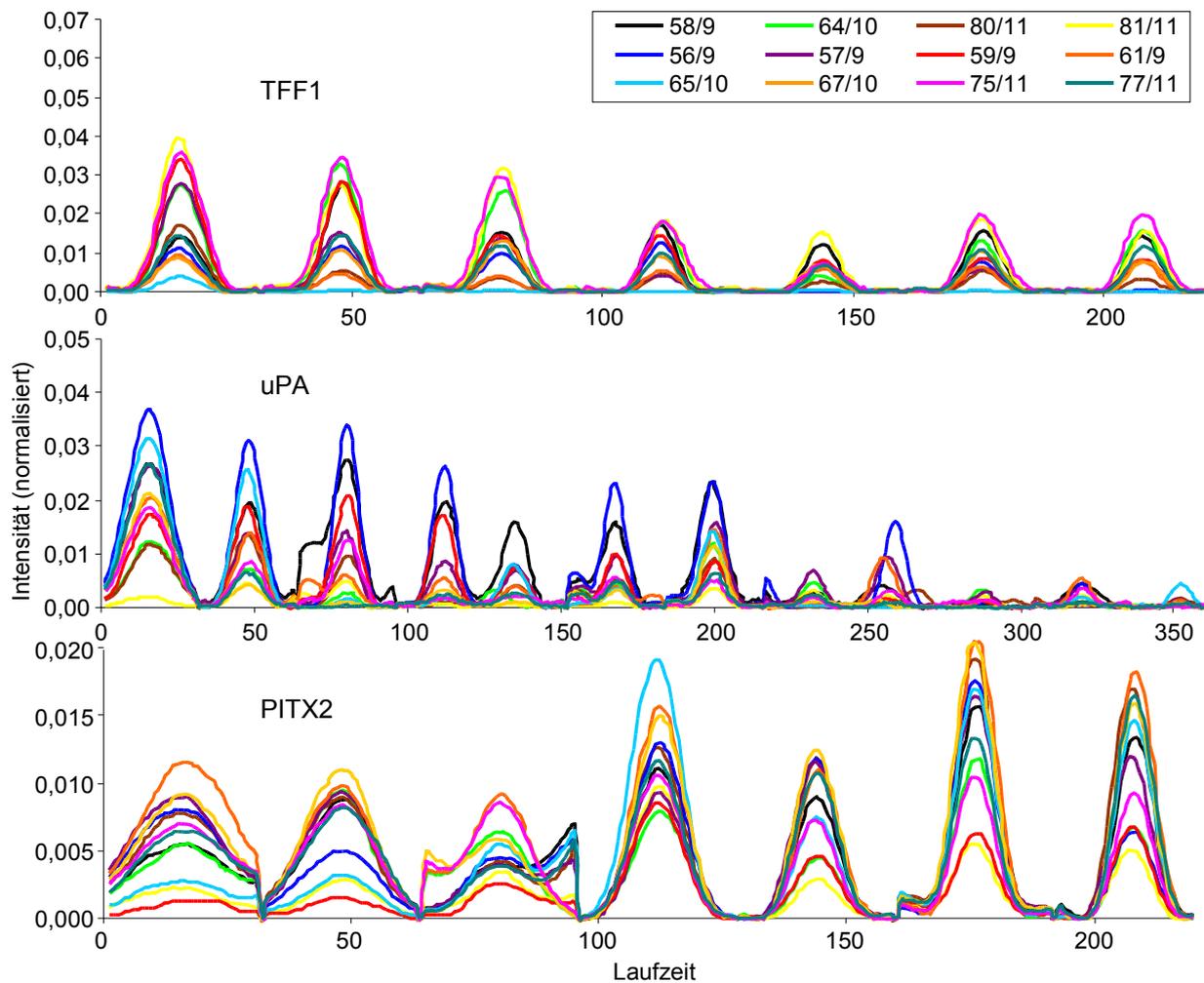


Abbildung 37: Normalisierte Sequenzhistogramme (nur CpG-Positionen) der mikrodissezierten Tumorproben (IDC und DCIS) von Patientin C für die drei Gene TFF1 (oben), uPA (Mitte) und PITX2 (unten). Bezeichnung der LMD Proben: Nummer der LMD Probe / Nummer des ursprünglichen Paraffinblocks.

Aus technologischer Sicht zeigt diese Mikrodissektionsstudie zusammengefasst, dass es mit der hier entwickelten Technologie sehr gut möglich ist, eine größere Anzahl von Markern in einer sehr geringen Anzahl von Zellen aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben zu analysieren. Die Anzahl der für eine erfolgreiche Analyse mindestens benötigten Zellen wurde nicht bestimmt, allerdings kann man z.B. anhand der LMD Proben 65 und 66 (Anhang S. 205) abschätzen, dass es sich dabei um ca. 100 Zellen handeln könnte.

6 Diskussion

6.1 Methodik

Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse von epigenetischen Brustkrebsbiomarkern in mikrodisssezierten Zellen aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben (FFPET), um so die DNA Methylierung von Biomarkern in verschiedenen Komponenten und Zelltypen innerhalb eines Tumors, bzw. im anliegenden Gewebe bestimmen zu können. Bislang veröffentlichte Methoden zur DNA Methylierungsanalyse in mikrodisssezierten Zellen erlauben entweder nur eine qualitative Aussage oder benötigen viel Material (in der Regel mehr als 1000 Zellen) für eine akkurate Bestimmung der Methylierung eines einzigen Biomarkers. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die Methylierung vieler Biomarker in kleinsten Gewebemengen aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebetteten Geweben quantitativ zu analysieren. Für die Realisierung dieser Methode wurde eine Vorgehensweise gewählt, die sich im Einzelnen aus einer für kleinste DNA Mengen entwickelten Methode zur Bisulfitumwandlung, einer multiplexierten Voramplifikation dieser Templat-DNA, der Reamplifikation und anschließender Bisulfitsequenzierung zusammensetzt. Für die Anwendung der in dieser Arbeit entwickelten Methode für DNA aus Formalin-fixierten und Paraffin-eingebettete Geweben wurde zunächst die Analyse von DNA aus solchem Material optimiert (Kapitel 6.1.1). Anschließend wurde eine neuartige Methode zur quantitativen Bisulfitsequenzierung entwickelt und diese für kleinste Templatmengen adaptiert (Kapitel 6.1.2).

6.1.1 Optimierung für FFPET Proben

Im Anschluß an eine Operation wird das entnommene Gewebe routinemäßig konserviert (fixiert). Diese Fixierung wird durch eine Inkubation in gepuffertem Formalin (wässriges Formaldehyd) erreicht. Nach der Fixierung wird das Gewebe entwässert und in Paraffin eingegossen. Von diesen Paraffinblöcken können dann für eine pathologische Untersuchung Dünnschnitte angefertigt werden, die für eine bessere Unterscheidung der verschiedenen Gewebekomponenten noch angefärbt werden. Für diese Färbung wird in der Regel Hämatoxylin und Eosin für die Färbung des Zellkerns bzw. des Cytosols verwendet (HE-Färbung). Die Fixierung mit Formalin führt dazu, dass die Morphologie des Gewebes sehr gut erhalten bleibt und dem Pathologen eine akkurate Diagnose ermöglicht. Seit der Entwicklung molekularbiologischer Methoden und der immer verbreiteteren Anwendung dieser in der klinischen Routine, haben sich die Ansprüche an konserviertes Material erheblich verändert. Neben der gut erhaltenen Zellmorphologie tritt ebenfalls der Erhalt der Biomoleküle in den Vordergrund. DNA aus Formalin-fixiertem und Paraffin-eingebettetem Gewebe ist stark degradiert und stellt daher ein schlechtes Substrat für molekularbiologische Analysen dar. Erfolgreiche PCRs sind beispielsweise nur mit Amplifikaten möglich, die kürzer als 300 bp sind (Bonin *et al.* 2003, Siwoski *et al.* 2002). Eine Fixierung des Gewebes mit Formalin führt zu Quervernetzungen von Proteinen und DNA, die durch eine Lyse des Gewebes nicht vollständig entfernt werden (Kuykendall *et al.* 1992). Durch diese Quervernetzungen erhöht sich die Empfindlichkeit der DNA gegenüber mechanischer Belastung und vermindert sich die Zugänglichkeit für Enzyme. Zusätzlich oxidiert Formalin zu Ameisensäure,

die eine Depurinierung der DNA und anschließende Strangbrüche mit sich bringt (Bonin *et al.* 2003). Das Ausmaß der DNA Degradierung wird durch viele Faktoren beeinflusst. Vor allem die Dauer der Fixierungsprozedur, die genaue Zusammensetzung der Fixierlösung (Formalinkonzentration, pH-Wert und Salzkonzentration), Gewebetyp und Temperatur beeinflussen die Qualität der DNA (Zsikla *et al.* 2004, Srinivasan *et al.* 2002). Die Vielfalt der Faktoren, die sich auf die Qualität der DNA auswirken, führen zu großen qualitativen Unterschieden der FFPET Proben und beeinträchtigt so die Verwendbarkeit dieses Materials in der klinischen Routine. Obwohl in der Zwischenzeit bereits einige alternative Fixierprotokolle verfügbar sind, bei denen die Degradierung der DNA minimiert wird (Srinivasan *et al.* 2002, Paska *et al.* 2004), ist die Fixierung mit Formalin noch immer der Maßstab in der klinischen Routine. Die meisten Technologien zur Analyse von DNA Methylierung beruhen auf einer vorhergehenden chemischen Umwandlung der DNA mit Bisulfit (Laird 2003). Diese Behandlung führt zu einer weiteren Degradierung der ohnehin schon schlecht erhaltenen DNA (Grunau *et al.* 2001). Für die Entwicklung einer Methode, mittels derer auch kleinste Mengen mikrodisszierten Materials aus diesen Geweben zuverlässig analysiert werden kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit diese DNA zunächst näher charakterisiert, um optimale Protokolle entwickeln zu können.

Obwohl die DNA aus FFPET stark degradiert ist, enthält sie Fragmente von mehreren kb Länge (Inadome *et al.* 2003, Bielawski *et al.* 2001). DNA-Protein Quervernetzungen sind als hydrolysierbar, vor allem bei höheren Temperaturen, beschrieben (Quievryn und Zhitkovich 2000, Shi *et al.* 2004, Shi *et al.* 2002) und sollten somit spätestens nach der Bisulfitbehandlung keine wesentliche Rolle mehr spielen. Dass trotzdem nur kurze PCR Amplifikate von Bisulfit-behandelter DNA generiert werden können, muss daher noch durch andere Faktoren begründet sein.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die DNA aus FFPET selbst zu einer Inhibition der PCR führt. Von dieser Inhibition sind besonders die längeren PCR Amplifikate betroffen. Durch eine Erhöhung der Templatmenge kann zwar die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, dass sich auch längere Templatmoleküle des zu amplifizierenden Locus in der PCR Reaktion befinden, dieser kann aber bedingt durch Inhibition der PCR trotzdem nicht amplifiziert werden. Der Mechanismus dieser Inhibition ist unklar, es konnte aber gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Polymerase- und dNTP-Konzentration, sowie eine Verlängerung der Extensionszeit während der PCR sich positiv auf diese Inhibition auswirkt. Ein mögliches Prinzip der Inhibition könnte eine verminderte Prozessivität der DNA Polymerase sein. Gerade längere Amplifikate könnten so nicht mehr amplifiziert werden, da die Polymerase einfach von dem Templatmolekül abfällt. Die Beobachtung, dass durch eine Erhöhung der Polymerasekonzentration auch längere Amplifikate amplifiziert werden können, kann dann dadurch erklärt werden, dass durch diese Erhöhung die Neubildung des Polymerase-Templat-Komplexes während eines PCR-Zyklus begünstigt und somit die geringere Prozessivität teilweise kompensiert. Die Theorie einer herabgesetzten Prozessivität der Polymerase bei der Amplifikation von DNA aus FFPET wird auch durch die Beobachtungen, dass sich eine Erhöhung der dNTP-Konzentration und eine Verlängerung der Extensionszeit positiv auf die Inhibition auswirken, bestätigt. Während eine Verlängerung der Extensionszeit auch die Neubildung des Polymerase-Templat-Komplexes innerhalb eines PCR-Zyklus begünstigt, könnte eine Erhöhung der dNTP-Konzentration zu einer höheren Polymerisationsgeschwindigkeit führen. Durch eine Erhöhung der Polymerisationsgeschwindigkeit verbliebe dem Polymerase-Templat-Komplex nach der Dissoziation ebenfalls mehr Zeit für eine Neubildung während eines PCR Zyklus. Die Ursache für eine verminderte Prozessivität der Polymerase könnte in dem Vorhandensein der zahlreichen degradierten DNA Fragmente in der Probe begründet sein. Diese kurzen

Fragmente könnten durch eine Interaktion mit dem Templatmolekül die Polymerase blockieren und zu einer Dissoziation des Polymerase-Templat-Komplexes führen.

Die Inhibition der PCR durch die Templat-DNA aus FFPET selbst findet erst bei größeren Templatmengen statt. Da aus mikrodisszierten Proben nur kleinste Mengen DNA zu erwarten sind, spielt dieses Phänomen in dieser Fragestellung keine Rolle. Bedingt durch die Fragmentierung der DNA ist jedoch die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins intakter Templatmoleküle in der Probe abhängig von der Länge der zu amplifizierenden Region. Gleichbedeutend nimmt die Menge an amplifizierbarer DNA bei gleicher Menge physikalisch vorhandener DNA für kürzere Amplifikate zu. Eine höhere Menge an amplifizierbaren Templatmolekülen führt zu einer robusteren PCR Amplifikation und vor allem auch zu einer höheren Auflösung der Methylierungsquantifizierung, da dieser bei geringen Templatmengen aus statistischen Gründen Grenzen gesetzt sind. Würde beispielsweise das Analyseergebnis nur auf einem einzigen Templatmolekül basieren, dann wäre nur eine Unterscheidung von 0% und 100% methylierter DNA möglich, da nur bei diesen Verhältnissen eine einzige Kopie für ein eindeutiges Ergebnis ausreichend ist. Aufgrund dieser Überlegungen wurden innerhalb dieser Arbeit nur Amplifikate mit einer durchschnittlichen Länge von 169 bp und einer maximalen Länge von 234 bp für die Analyse von DNA aus FFPET verwendet.

Obwohl die Minimierung der PCR Inhibition durch degradierte DNA für die Analyse von LMD Proben keine Auswirkung hat, könnten sie in anderen Bereichen, wie z.B. bei der DNA Analyse von historischen Proben, bei denen größere Mengen ebenfalls stark degradierter DNA vorhanden sind, hilfreich sein.

6.1.2 Quantitative Bisulfitsequenzierung

Eine quantitative Methylierungsanalyse vieler Biomarker in geringen Gewebemengen war bislang kaum möglich. Dies liegt vor allem anderem daran, dass quantitative Methoden, wie z.B. Real-Time PCR für ein robustes Ergebnis relativ viel Templat-DNA benötigen. In dieser Arbeit wurde daher ein Vorgehen gewählt, bei dem die Templat-DNA zunächst in einer mPCR voramplifiziert wurde. Anschließend wurde das Produkt dieser Voramplifikation in einzelnen sPCRs reamplifiziert und analysiert. Für diese Analyse sollte eine Methode verwendet werden, mit der die Methylierung einzelner CpG-Positionen mit hoher Auflösung bestimmt werden kann. Dazu wurde eine modifizierte Bisulfitsequenzierungsmethode entwickelt. Diese neue Sequenzieretechnologie basiert auf der Inkorporation eines künstlichen Methylierungssignals in das PCR Produkt durch modifizierte Primer. Anhand dieses Signals erfolgt dann eine interne Normalisierung. Der Vergleich dieser gegenüber anderer Methoden und den aus den Unterschieden resultierenden Implikationen wird im folgenden diskutiert.

6.1.2.1 Vergleich mit weiteren Bisulfitsequenzierungs-Methoden

Die Bisulfitsequenzierung stellt eine leistungsstarke Methode zu Analyse von DNA Methylierung dar. Bisher werden dazu drei unterschiedliche Methoden routinemäßig verwendet: direkte Sequenzierung nach Sanger, Klonsequenzierung und Pyrosequenzierung.

Bei der direkten Sequenzierung nach Sanger wird das von einer Probe stammende PCR Produkt direkt sequenziert (Grunau *et al.* 2001). Um aus den Sequenzhistogrammen quantitative Methylierungsmesswerte zu gewinnen, wird das an einer CpG Position gemessene C-Signal (ursprünglich methyliertes Cytosin) mit dem entsprechenden T-Signal (ursprünglich unmethyliertes) Cytosin ins Verhältnis gesetzt (Lewin *et al.* 2004). Dabei wird dieses Verhältnis so gebildet, dass das C-Signal durch die Summe des T-Signals und des C-Signals dividiert wird und sich so ein prozentualer Methylierungswert ergibt. Aus dieser Vorgehensweise resultiert ein grundlegendes Problem, dass das Auflösungsvermögen dieser Methode erheblich beeinträchtigt. Während der Sequenzierung, bzw. während der Aufnahme des Sequenzhistogramms werden die vier Farbstoffe, die spezifisch für die vier Basen sind, unabhängig voneinander gemessen. Im Anschluß daran werden diese Daten weiter prozessiert. Dabei wird ein Algorithmus verwendet (Basecaller), der diese vier unabhängigen Signale gegeneinander skaliert. Zum einen werden Laufunterschiede der verschiedenen Basen ausgeglichen, indem entlang der x-Achse neu skaliert wird, zum anderen werden auch Intensitätsunterschiede kompensiert, indem die vier Signale entlang der y-Achse skaliert werden. Letzteres bedingt das geringere theoretisch mögliche Auflösungsvermögen, da für eine akkurate Quantifizierung eine genaue Skalierung des T-Signals zum C-Signal notwendig ist. Da sich in dem C-Signal jedoch nur noch Signale von ursprünglich methylierten Cytosinen befinden, ist diese genaue Skalierung schwierig. Das Sequenzhistogramm von unmethylierter DNA beispielsweise enthält gar kein Cytosin, welches zu einer Skalierung herangezogen werden könnte. Genau genommen kann diese Skalierung nur dann präzise stattfinden, wenn die Methylierung der Probe bekannt war. Für eine akkurate Bestimmung der Methylierung ist also genau der Wert notwendig, der bestimmt werden soll. Han *et al.* (2006) führen ähnlich wie bei der hier entwickelten Methode über modifizierte Primer ein C-Signal künstlich in das PCR Produkt ein, um so die Skalierung der beiden Signale (C zu T) zu erleichtern, trotzdem bleibt das Problem der akkuraten Skalierung prinzipiell bestehen. Im Gegensatz dazu, wird bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode das künstlich durch den Primer eingeführte Methylierungssignal direkt zur Normalisierung verwendet. Damit ist eine akkurate Skalierung des C- zum T-Signals nicht notwendig, da das T-Signal für eine Bestimmung der Methylierung nicht berücksichtigt wird.

Das beschriebene Problem der richtigen Skalierung der beiden interessanten Signale des Sequenzhistogramms kann ebenfalls umgangen werden, wenn statt der direkten Sequenzierung eine Klonsequenzierung durchgeführt wird. Dabei wird das PCR Produkt von der Probe kloniert und einzelne Klone sequenziert. Bei dieser Sequenzierung können an den CpG Positionen entweder nur ein C-Signal oder ein T-Signal vorkommen, jedoch keine Mischungen beider Signale und die Auswertung ist eindeutig. Um allerdings auf den Methylierungszustand der komplexen Probe rückschließen zu können, ist es notwendig, eine große Zahl von dieser Probe abstammenden Klone zu sequenzieren. Dadurch ist diese Methode teuer und zeitaufwendig. Eine kostengünstigere Methode zur Klonsequenzierung wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt (Daten nicht gezeigt). Dabei wird das klonierte PCR Produkt in RNA transkribiert und dieses Transkript anschließend mit RNase T1 an den ursprünglich methylierten Positionen hydrolysiert. Dieses methylierungsspezifisch fragmentierte Transkript kann dann massenspektroskopisch analysiert werden (Schatz *et al.* 2004, Dietrich *et al.* 2005). Auch wenn diese Methode wesentlich kostengünstiger als eine Klonsequenzierung nach der Sanger-Methode ist, bleibt doch der hohe Zeitaufwand bestehen.

Die dritte verwendete Sequenziermethode ist die Pyrosequenzierung. Bei dieser Methode wird nach dem Prinzip „Sequenzierung durch Synthese“ sequenziert. Abwechselnd werden die vier verschiedenen dNTPs dazu gegeben und der erfolgte Einbau des entsprechenden Nukleotids über eine biochemische Messung des

entstandenen Pyrophosphates quantifiziert. Über die Menge des eingebauten Cytosins und des eingebauten Thymins an einer CpG-Position kann die Methylierung bestimmt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass lediglich Amplifikate von 100 – 200 bp Länge sequenziert werden können (Ronaghi 2001) und im Fall von Bisulfit-DNA sogar nur ca. 80 - 100 bp mit maximal 10 - 15 CpG Positionen (Tost und Gut 2006, Brakensiek *et al.* 2007). Die mit der quantitativen Bisulfitsequenzierung in dieser Arbeit analysierten Amplifikate hatten eine durchschnittliche Länge von 169 bp und enthielten durchschnittlich 12 CpGs. Dabei wurde die Länge und CpG-Dichte dieser Amplifikate nicht für diese Methode optimiert, sodass wahrscheinlich noch Potenzial für die Sequenzierung längerer Amplifikate mit einer größeren Zahl an CpGs vorhanden ist. In dieser Hinsicht ist diese quantitative Bisulfitsequenzierung damit leistungsstärker als Pyrosequenzierung. Ein Vergleich des Auflösungsvermögens beider Methoden basierend auf Literaturdaten ohne einen direkten Vergleich ist schwer möglich. Allerdings weisen einige Daten darauf hin, dass beide Methoden vergleichbar sein könnten, so definieren drei Autoren per Pyrosequenzierung gemessene Methylierungswerte zwischen 0 % und 5 % als Hintergrundsignal (Shaw *et al.* 2006, Jones *et al.* 2005, Brakensiek *et al.* 2006). Bei der in dieser Arbeit entwickelten quantitativen Bisulfitsequenzierung ist dagegen eine Unterscheidung zwischen 0 % und 5 % Methylierung sehr gut möglich. Dies stellt gerade für Biomarker, bei denen nur geringe Methylierung vorkommt, einen Vorteil gegenüber Pyrosequenzierung dar.

6.1.2.2 Kalibrierung

Das Ergebnis der in dieser Arbeit entwickelten Sequenziermethode sind zunächst normalisierte Intensitäten (Peakhöhe oder Peakflächen). Zur Identifizierung eines Biomarkers für eine bestimmte klinische Fragestellung ist das auch meistens ausreichend, da bereits die normalisierten Intensitäten als Messwert verwendet werden können, um technisch festzustellen, ob ein potentieller Biomarker in der Lage ist, zwischen zwei Gruppen (z.B. Patientinnen mit guter und mit schlechter Prognose) zu unterscheiden. Um allerdings zwei Biomarker miteinander vergleichen zu können, ist auch die Kenntnis des Unterschiedes in der Methylierung beider Gruppen notwendig (Effektgröße). Ein Biomarker, bei dem die Differenz der Methylierung der entsprechenden Patientengruppen tendenziell größer ist, kann geeigneter sein, als ein Biomarker mit kleinerer Effektgröße. Vor allem dann, wenn sich die Methylierungsunterschiede in einem Bereich befinden, der nur schwer methodisch auflösbar ist. Um eine biologische Aussage über das Verhalten eines Biomarkers treffen zu können, wie z.B. in mikrodisszierten Bereichen eines Tumors, ist die Bestimmung eines prozentualen Methylierungswertes sinnvoll. Eine erste Abschätzung der prozentualen Methylierung kann dadurch getroffen werden, indem die Intensitäten an der entsprechenden CpG Position mit der Intensität des Normalisierungssignals, welches 100 % Methylierung entspricht, ins Verhältnis gesetzt wird. Allerdings ist dies ungenau, da die Signalintensitäten in der Regel innerhalb des Sequenzhistogramms nach hinten abnehmen und auch abhängig von der individuellen Position und dem Umfeld der CpG Position sind. Für eine genaue Berechnung der prozentualen Methylierung ist deswegen ein Kalibrierungsstandard notwendig, anhand dessen die normalisierten Fluoreszenzintensitäten kalibriert werden können. Dabei ist die Wahl geeigneter Methylierungsstandards nicht trivial, da es keine natürlich vorkommende komplett unmethylierte und komplett methylierte humane DNA gibt. In dieser Arbeit wurden als Standards in erster Linie Mischungen aus genomweit amplifizierter DNA (MDA DNA) und enzymatisch methylierter MDA

verwendet. Die genomweiten Amplifikation (Dean *et al.* 2002) führt zu einer Generierung unmethylierter DNA, da Cytosin anstelle des Methylcytosins eingebaut wird und durch die Amplifikation die Methylierung des Templates verdünnt wird, sodass diese amplifizierte DNA quasi keine Methylierung mehr aufweist. Diese DNA kann anschließend künstlich mit der SssI Methyltransferase methyliert werden. Aus diesen so gewonnenen 0 % und 100 % methylierten DNAs können Mischungen mit den entsprechend gewünschten Verhältnissen hergestellt werden. Bei dieser Vorgehensweise ergeben sich zwei Probleme. Zum einen kann die so generierte MDA DNA nicht komplett enzymatisch methyliert werden, da sie partiell einzelsträngig ist und damit kein Substrat für die SssI Methyltransferase darstellt. Dadurch werden Proben, die an einer solchen Standardreihe kalibriert wurden meistens überschätzt, sodass auch Methylierung von mehr als 100 % in biologischen Proben gemessen wird. Das zweite Problem liegt darin, dass nach der genomweiten Amplifikation nicht jeder Loci gleich repräsentiert ist, da einige Loci stärker als andere amplifiziert werden. Dies ist auch der Grund dafür, dass eine Mischung von MDA DNA beispielsweise mit künstlich methylierter Blut DNA, die nahezu vollständig enzymatisch methylierbar ist, nicht sinnvoll ist.

Neben Methylierungswerten über 100 %, die auf die Verwendung von nicht komplett methylierbarer MDA DNA als Standard zurückzuführen, wurden auch Werte unter 0 % Methylierung gemessen. Die Ursache hierfür liegt in dem gebogenen Verlauf der verwendeten Kalibrierkurven (siehe Abbildung). Vereinfacht wurde zur Kalibrierung eine lineare Regressionsfunktion für diese gebogenen Kurven verwendet. Diese Gerade schneiden die x-Achse im negativen Bereich, sodass aus niedrigen normalisierten Intensitäten leicht negative Methylierungswerte resultieren. Der Grund für den gebogenen Kurvenverlauf ist unklar. Es ist möglich, dass dieser durch unterschiedliche Effizienzen beim Einbau der dNTPs und ddNTPs bei der Sequenzierreaktion bewirkt wird. Würde beispielsweise ddCTP im Vergleich zu dCTP besser eingebaut als ddTTP im Vergleich zu dTTP, dann entstünden eher Fluoreszenz-markierte Abbruchsequenzen für methylierte DNA, als für unmethylierte DNA. Daraus würde eine gerichtete Sequenzierung resultieren und die Kalibrierkurve hätte den beobachteten bogenförmigen Verlauf. Ein weiterer Grund für den gebogenen Kurvenverlauf könnte bereits in einer gerichteten PCR Amplifikation liegen, sodass methylierte DNA effizienter amplifiziert würde als unmethylierte. Dieser Aspekt erscheint eher unwahrscheinlich, wie später in Kapitel 6.1.2.4 beschrieben. Zwar könnte die Kalibrierung der normalisierten Fluoreszenzintensitäten anhand solch gebogener Kalibrierungskurven akkurater durchgeführt werden, wenn statt einer linearen Regression ein geeigneteres Modell verwendet würde, trotzdem stellt die Notwendigkeit der Kalibrierung anhand einer Standardreihe einen Nachteil dieser Sequenziermethode gegenüber den etablierten Methoden dar.

6.1.2.3 Vergleich mit anderen Assay-Formaten

Ein Vergleich der hier entwickelten Sequenziermethoden mit anderen Methoden fällt in Anbetracht der Vielzahl derer schwer. Neben Pyrosequenzierung, Klonsequenzierung und eventuell DNA-Chip Formaten sind wohl die Real-Time PCR basierten Assays zur quantitativen Methylierungsanalyse diejenigen, die hinsichtlich des Auflösungsvermögens am ehesten das gleiche Potenzial besitzen, wie die hier entwickelte Bisulfidsequenziermethode. Innerhalb dieser Arbeit wurde für drei Assays der direkte Vergleich von QM Assay und dem Sequenzierassay durchgeführt. Dabei zeigten beide Assayformate einen vergleichbar gutes Auflösungsvermögen. Für die meisten anderen Assayformate sind dazu keine detaillierten Daten publiziert.

Außerdem sollten für einen fairen, direkten Vergleich einige experimentelle Parameter gleich sein, wie z.B. Verwendung von gleicher Standard-DNA, um die Ergebnisse vergleichen zu können.

Ein Vorteil gegenüber den meisten anderen Methoden liegt in der multiplexierten Voramplifikation der Templat DNA und damit der geringen Menge an benötigter Proben-DNA. Bei DNA-Chip Analysen werden zwar auch multiplexierte Amplifikationen durchgeführt, allerdings werden diese nicht reamplifiziert, sodass nicht gewährleistet ist, dass die verschiedenen in der mPCR enthaltenen Loci gleich gut amplifiziert wurden. Bei der anschließenden Hybridisierung könnten die verschiedenen PCR Produkte dann in unterschiedlichen Mengen vorliegen und so zu unterschiedlich guten Ergebnissen führen. Das Prinzip der multiplexierten Voramplifikation ist jedoch nicht auf die quantitative Bisulfitsequenzierung beschränkt und könnte leicht für andere Methoden adaptiert werden. Fackler *et al.* (2004) haben bereits ein vergleichbares Vorgehen gewählt, um ausgehend von geringen Probenmengen mehrere Real-Time MSP durchführen zu können.

Gerade dann, wenn Assays für neue Marker entwickelt werden, hat die Bisulfitsequenzierung den Vorteil, dass die Etablierung neuer Assays wenig aufwendig ist. Im Gegensatz zu Real-Time PCR basierten Assays handelt es sich bei der Bisulfitsequenzierung um eine Methode, bei der die Bestimmung der DNA Methylierung nach Ablauf und nicht während der PCR durchgeführt wird. Daraus ergeben sich automatisch geringere Ansprüche an die Robustheit und Effizienz der PCR und der Etablierungsaufwand für neue Assays sinkt. Ein weiterer Vorteil der Bisulfitsequenzierung gegenüber den meisten anderen Verfahren ist, dass hier jedes einzelne CpG innerhalb des sequenzierten Amplifikates unabhängig von den anderen CpGs analysiert werden kann. Im Gegensatz dazu können mit Methoden, die beispielsweise auf der Verwendung von Restriktionsenzymen beruhen, nur CpGs im Kontext solcher Restriktionsschnittstellen analysiert werden. Methoden, bei denen entweder methylierungsspezifische Detektionssonden (z.B. QM Assay) oder methylierungsspezifische Primer (MSP) oder Blocker (HM Assay) verwendet werden, sind lediglich für die Analyse der Sequenzen geeignet, die von diese Primern, Blockern und Detektionssonden genau abgedeckt werden (siehe Abbildung 38). Dabei muss berücksichtigt werden, dass durch die Bisulfitsequenzierung einer komplexen Probe eine andere Information generiert wird, als durch Assayformate, die auf methylierungsspezifischen Oligonukleotiden (Primern, Detektionssonden und Blocker) beruhen. Letztere beruhen auf der Amplifikation, Detektion oder Amplifikationssuppression von DNA Molekülen, die in dem Bereich der Oligonukleotidebindungsstellen genau den Methylierungszustand widerspiegeln, der in diesen Oligonukleotiden so auch kodiert ist. Diese methylierungsspezifischen Oligonukleotide decken in der Regel mehrere CpGs ab, sodass nur Templatmoleküle analysierbar sind, die in diesem Bereich genau den Methylierungszustand widerspiegeln, der in den Oligonukleotiden kodiert ist. Dabei werden in einem Assay in der Regel höchstens zwei solcher Oligonukleotide verwendet: eins ist spezifisch für unmethylierte und eins für methylierte DNA. DNA Moleküle, bei denen nicht alle CpGs komethyliert sind, sollten in einem solchen Assay unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nicht analysierbar sein. Bei der Bisulfitsequenzierung ist dies nicht der Fall, da jedes CpG unabhängig von den anderen analysiert wird. Folglich kann keine Aussage über Komethylierung getroffen werden. Lediglich mit Klonsequenzierung ist auch Komethylierung analysierbar, da hier immer nur ein einzelne Templatmoleküle analysiert werden. Die in dieser Arbeit untersuchten prognostischen und prädiktiven Marker uPA, PITX2 und TFF1 wurden mittels DNA-Chip und Real-Time PCR als solche Marker identifiziert. Es stellte sich die Frage nach der biologischen Vergleichbarkeit der mit diesen Assayformaten generierten Daten und den Ergebnissen der hier entwickelten quantitativen Bisulfitsequenzierung. Außerdem wurden für die Auswertungen der Sequenzierungen in dieser Arbeit nicht nur die CpGs herangezogen, die in vorhergehenden Studien durch die entsprechenden

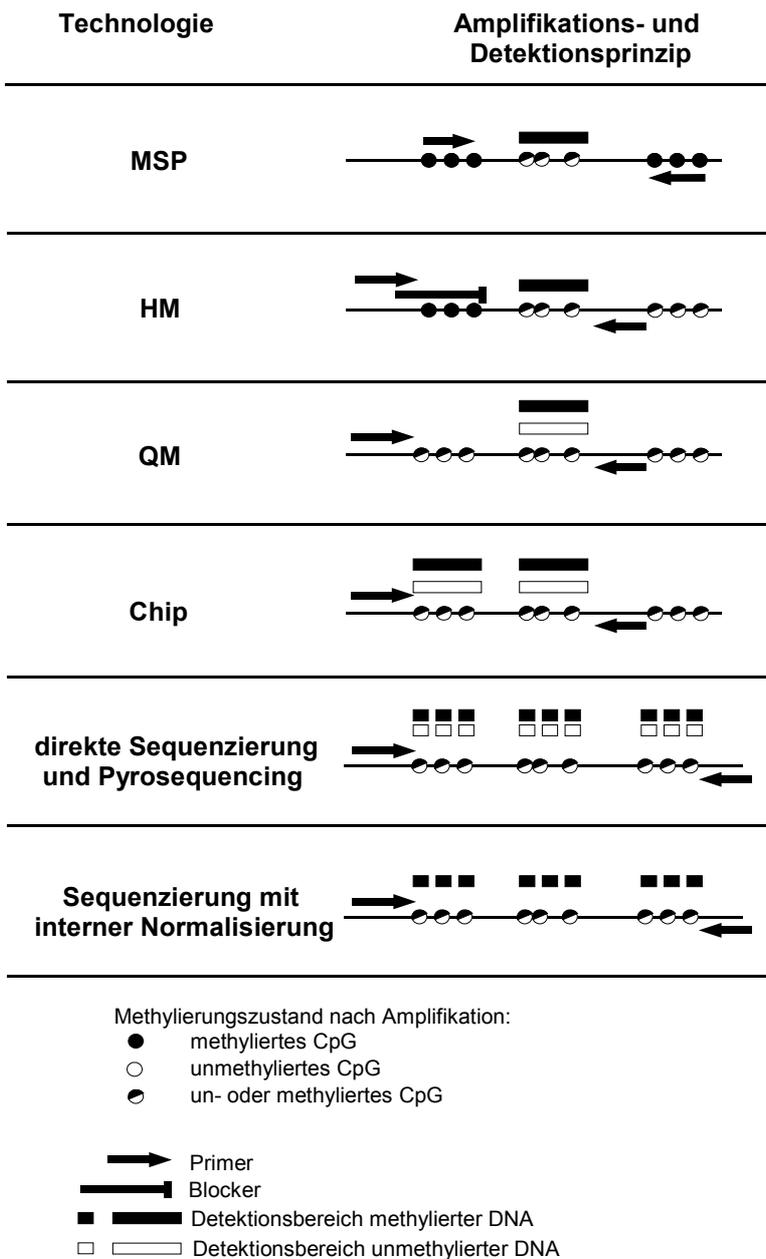


Abbildung 38: Schematische Darstellung verschiedener Technologien zur Analyse von DNA Methylierung im Vergleich zu der neuentwickelten Sequenzierung mit interner Kalibrierung. Dargestellt ist das Prinzip der Amplifikation und der Methylierungsdetektion.

MSP: Amplifikation von DNA, die an den Primerbindungsstellen methyliert ist. Detektion von DNA, die im Bereich der Detektionssonde komethyliert ist.

HM: Amplifikation von DNA, die an der Blockerbindungsstelle methyliert ist. Detektion von DNA, die im Bereich der Detektionssonde komethyliert ist.

QM und Chip: Amplifikation unabhängig von der Methylierung. Detektion von DNA, die im Bereich der Detektionssonden, bzw. Chipoligonukleotide komethyliert oder unmethyliert ist.

direkte Sequenzierung und Pyrosequenzierung: Amplifikation unabhängig von der Methylierung. Detektion von methylierter und unmethylierter DNA an den einzelnen CpG-Positionen.

Sequenzierung mit interner Normalisierung: Amplifikation unabhängig von der Methylierung. Detektion von methylierter DNA an den einzelnen CpG-Positionen.

methylierungsspezifischen Oligonukleotide (Detektionssonden oder Chipoligos) abgedeckt wurden, sondern ebenfalls alle anderen im Amplifikat enthaltenen CpGs, um so einen möglichst robusten (über das Amplifikat gemittelten) Messwert zu generieren. Um die Frage nach der Vergleichbarkeit beantworten zu können, wurden in dieser Arbeit für 13 Patientinnenproben der direkte Vergleich von quantitativer Bisulfidsequenzierung und QM Assay für die drei Marker uPA, PITX2 und TFF1 durchgeführt. Beide Assayformate zeigten eine sehr gute Korrelation. Lediglich bei zwei Messwerten trat eine Abweichung auf. Die Proben und Assays, bei denen diese Abweichungen auftraten, erwiesen sich bei einer genaueren Begutachtung der einzelnen CpGs als diejenigen, die im Bereich der Bindungsstelle der Detektionssonde eine auffällig andere Methylierung als im restlichen Amplifikat zeigten. Generell zeigte sehr viele der 13 analysierten Patientinnenproben, dass die Methylierung innerhalb der untersuchten Regionen nicht homogen ist, einzelne CpGs zeigten eine besonders hohe oder niedrige Methylierung. Im Fall von uPA trat daneben eine generelle, fast kontinuierliche Abnahme der Methylierung innerhalb des Amplifikates auf. Damit ist

ausgeschlossen, dass in diesen Proben Komethylierung vorgeherrscht, da solche Phänomene nicht auftreten könnten, wenn nur komplett methylierte und komplett unmethylierte Templatmoleküle vorkommen würden. Dass die Ergebnisse des QM Assays trotzdem insgesamt eine gute Übereinstimmung mit den Sequenzierergebnissen zeigten, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Detektionssonden der QM Assays nicht absolut spezifisch für entsprechend den komethylierten oder den unmethylierten Zustand sind und auch Zwischenformen teilweise detektieren. Nun stellt sich auch die Frage, welche der Informationen die mit der entscheidenden klinischen Relevanz ist. Sollte eher die komethylierte und unmethylierte DNA für eine richtige Diagnose oder Prognose ausschlaggebend sein, dann wäre ein QM Assay das richtige Format. Ist allerdings die gesamte Methylierung eines Loci entscheidend, dann wäre eher die quantitative Bisulfitsequenzierung das Assayformat der Wahl. Zur Beantwortung dieser Frage müsste eine klinische Studie mit beiden Assayformaten und einer größeren Anzahl von Patientinnen durchgeführt werden, was nicht Bestandteil dieser Arbeit war.

6.1.2.4 Verwendbarkeit für kleinste Templatmengen

Um die in dieser Arbeit entwickelte Methode für ihre Eignung für kleinste Mengen DNA und damit letztlich für die Anwendbarkeit für mikrodissizierte Proben zu testen, wurden der gesamte Arbeitsablauf bestehend aus Lyse, Bisulfitkonversion, Aufreinigung, mPCR Voramplifikation, sPCR Reamplifikation und quantitativer Bisulfitsequenzierung mit je 100 Kopien des Genoms durchgeführt. Dabei wurden je 100 Kopien (dem Äquivalent von 50 diploiden Zellen) mit den theoretischen Methylierungen von 0 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % verwendet. In Kapitel 6.1.2.1 ist die Problematik der Wahl von geeigneten Methylierungsstandards bereits beschrieben. Für diesen Versuch kam die Verwendung von Mischungen aus MDA und künstlich methylierter MDA nicht in Frage, da bei diesen DNAs nicht alle Loci in gleicher Kopienzahl vorliegen und somit nicht sichergestellt werden konnte, dass für jeden der 13 untersuchten Loci tatsächlich 100 genomische Kopien vorliegen. Stattdessen wurden Mischungen aus Blut-DNA und künstlich methylierter Blut-DNA verwendet. Bei diesen DNAs ist eine ausgewogene Repräsentation aller Loci gegeben, allerdings ist Blut-DNA nicht für alle Loci unmethyliert. Es konnte gezeigt werden, dass auch bei diesen geringen DNA Mengen für die meisten der 13 Assays mindestens eine Unterscheidung von 0 %, 50 % und 100 % möglich war. Lediglich bei den Assays, die auch bei Blut-DNA eine signifikante Methylierung zeigten, war diese Unterscheidung erwartungsgemäß schwierig.

Ein in der Literatur beschriebenes Phänomen ist die gerichtete Amplifikation entweder von methylierter DNA oder unmethylierter DNA (Warnecke *et al.* 1997, Shen *et al.* 2007, Wojdacz und Hansen 2006). Eine solche gerichtete Amplifikation wird darauf zurück geführt, dass entweder die methylierte oder die unmethylierte DNA Sekundärstrukturen ausbildet, die die Amplifikation beeinträchtigt und somit zu einer Bevorteilung der anderen Spezies führt. Ein weiterer Grund für eine gerichtete Amplifikation könnten die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Amplifikate sein. Amplifikate von methylierter DNA haben aufgrund des höheren Gehalts an Cytosin immer eine höhere Schmelztemperatur. Eine solche gerichtete Amplifikation führt dazu, dass am Ende der PCR das PCR Produkt nicht mehr die gleiche prozentuale Methylierung widerspiegelt, wie das verwendete Templat. Dieses Phänomen hätte drastische Auswirkungen auf die entwickelte Methode, da bedingt durch Vor- und Reamplifikation insgesamt 95 PCR Zyklen durchgeführt werden und bei einer

gerichteten PCR am Ende nur vollständig methylierte oder vollständig unmethylierte DNA im Amplifikat zu erwarten wäre. Dies konnte für keinen der 13 Assays beobachtet werden, sodass eine gerichtete PCR in dieser Arbeit keine Rolle spielt. Bestätigt wird dies durch die Form der Kalibrierkurven, die mit Mischungen von MDA DNA und methylierter MDA DNA erzeugt wurden. Hier unterscheiden sich die Charakteristiken der 13 einzelnen Assays kaum voneinander. Dies widerspricht der Beobachtung von Warnecke *et al.* (1997), dass eine solche gerichtete PCR abhängig von dem Amplifikat ist. Diese nicht auftretende gerichtete PCR könnte darauf zurück zu führen sein, dass die PCRs unter Bedingungen durchgeführt wurden, bei denen dieses Phänomen nicht auftritt. Alle für die mPCR Voramplifikation verwendeten Primer wurden so entworfen, dass sie eine theoretische Schmelztemperatur von ca. 55 °C besitzen. Um die mPCR jedoch so spezifisch wie möglich ablaufen zu lassen und so die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten zu verhindern wurde neben einer geringen MgCl₂ Konzentration auch eine höhere Annealingtemperatur (58°C) gewählt. Shen *et al.* (2007) fanden, dass gerade eine höhere Annealingtemperatur das Auftreten einer gerichteten PCR verhindern kann, was sie auf die Bildung von weniger Sekundärstrukturen zurückführten. Alle in der mPCR Voramplifikation verwendeten Primer wurden während der Entwicklung dieser Methode zunächst nur als sPCR getestet. Ein Primerpaar galt als etabliert, wenn nach 50 PCR Zyklen und 100 pg Templat DNA (ca. 30 Kopien) ein klares PCR Produkt ohne Nebenprodukte auf dem Gel erkennbar war und sich dieses Produkt sequenzieren ließ. PCR Produkte, die diese Kriterien erfüllten, wurden dann direkt für die mPCR verwendet. Die Tatsache, dass trotz dieser einfachen Etablierungsprozedur alle 13 Amplifikate auch nach mPCR Voramplifikation, sPCR Reamplifikation und Sequenzierung sinnvolle Ergebnisse bei kleinsten Mengen von Templat DNA lieferten, zeigt das große Potenzial dieser Methode. Wahrscheinlich wären auch weitere Gene leicht mit dieser Methode zu analysieren. Außerdem ist die maximale Anzahl der Gene, die parallel mit dieser Methode untersucht werden können, sicherlich nicht auf die 13 in dieser Arbeit verwendeten Loci limitiert. Damit steht nun eine Methode zur Verfügung, mit der die DNA Methylierung von einer großen Zahl Genen bei einer geringen Menge an DNA quantitativ analysiert werden kann.

6.1.3 Vergleich mit publizierten Methoden zur Mikrodisektionsanalyse

Um sich ein möglichst genaues Bild über die Verteilung der DNA Methylierung von mehreren Genen innerhalb eines Tumors verschaffen zu können, ist eine Methode nötig, mit der viele Gene in möglichst wenigen Zellen quantitativ gemessen werden können. Inzwischen sind einige Studien veröffentlicht, in denen Methylierungsanalyse von mikrodisezierten Geweben durchgeführt wurden. Ein Vergleich dieser Methoden mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode hinsichtlich der Leistungsfähigkeit fällt schwer. Dies liegt vor allem an der unterschiedlichen Menge an mikrodiseziertem Material und an der Beschaffenheit der für die Mikrodisektion verwendeten Dünnschnitte. Mikrodisektion ist nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit der Verfügbarkeit von wenig Material, da die Anzahl der mikrodisezierten Zellen nicht begrenzt ist. Daneben ist natürlich die Dicke der verwendeten Dünnschnitte relevant. Bei dickeren Dünnschnitten ist zwar die Wahrscheinlichkeit, dass sich in einer mikrodisezierten Zelle ein intakter Zellkern befindet höher, zusätzlich ist jedoch die Gefahr von Kontaminationen durch andere Gewebe ebenfalls höher, da eine Mikrodisektion nicht mehr so exakt durchgeführt werden kann. Zusätzlich wurden verschiedene Fixier- und Färbeprotokolle verwendet, die alle in unterschiedlichem Maß die Qualität der DNA beeinflussen (Srinivasan *et al.* 2002,

Paska *et al.* 2004, Burton *et al.* 1997, Okuducu *et al.* 2002, Banaschak *et al.* 2000, Ehrig *et al.* 2001). Dazu kommt, dass in vielen publizierten Studien lediglich eine semiquantitative oder qualitative Analyse durchgeführt wurde. Ein fairer Vergleich der publizierten Methoden mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode ist daher kaum möglich. Bian *et al.* (2001) analysierten die Methylierung von p16 in mikrodissiziertem Material. Für eine semiquantitative Analyse fanden sie, dass 1 mm², bzw 1 ng DNA für diese Analyse ausreichen sei. 1 ng entspricht einem Äquivalent von ca. 150 intakten, diploiden Zellkernen. Im folgenden Jahr analysieren Anderson *et al.* (2001) verschieden große Gewebestücke, die mit einer Rasierklinge ausgeschnitten wurden. Als kleinste Menge untersuchten sie ebenfalls 1 mm², von 10 µm und 5 µm FFPE Dünnschnitten. Sie beschreiben, dass von den 1 mm² Proben einige ein PCR Amplifikat brachten. Im gleichen Jahr untersuchten Kerjean *et al.* (2001) die Methylierung des Androgenrezeptors in Keimzellen. Einzelne Zellen wurden mikrodissiziert und einzeln Bisulfit-konvertiert. Anschließend wurden die Ansätze von jeweils 9-12 Reaktionen, also insgesamt dem Äquivalent von 9-12 Zellen, zusammen gegeben und durch Sequenzierung analysiert. Von 22 so hergestellten Proben ergaben 15 ein Sequenzierergebnis. In einer Mikrodissektionsstudie von Umbricht *et al.* (2001) konnten mehrere hundert Äquivalente des Genoms pro mikrodissizierter Probe gewonnen und semiquantitativ auf den Methylierungsstatus von einem Gen (Stratifin) untersucht werden. Ebenfalls ein Gen (Caveolin-1) untersuchten Cui *et al.* (2002) erfolgreich und verwendeten dazu ca. 1000 Zellen von 5 µm FFPE Dünnschnitten. Ca. 1000 Zellen benötigten auch Lodygin *et al.* (2004) für die semiquantitative Analyse eines Genes bei Prostatakrebs. Millar *et al.* (2002) gelang die Methylierungsanalyse von 100 - 200 mikrodissizierten Zellen. Eine Klonsequenzierung dieser Proben ergab, dass dabei häufig nur ein bis zwei Kopien des Genoms für die anschließende Analyse zur Verfügung standen, was die Autoren auf die Degradierung der DNA während der Bisulfitreaktion zurück führten. 1,5 - 15 mm² mikrodissizierten Gewebes von ungefärbten 5 µm Dünnschnitten verwendeten Horowitz *et al.* (2002) zur quantitativen Real Time Analyse des MLH1 Gens in atypischen Hyperplasien und Krebs des Endometriums. Sie konnten aus diesen Proben 10 - 20 ng Bisulfit-DNA gewinnen (entspricht 1500 - 3000 diploiden Genomen) und verwendeten dabei ebenfalls eine Voramplifikation der Bisulfit-DNA. Eine quantitative Analyse von 4 Genen mit QM Assay gelang Lehmann *et al.* (2002), die dabei keine Angaben über die Anzahl der mikrodissizierten Zellen machen. Ebenfalls keine Angaben über die Anzahl der analysierten Zellen machten Yan *et al.* (2006) die ein Gen in normalem Brustgewebe mit quantitativen MSP untersuchten. Nakayama *et al.* (2003) verwendeten 1000 - 2000 Zellen von 10 µm Schnitten um die Methylierung von GSTP1 qualitativ in verschiedenen Geweben von Prostataläsionen nachweisen zu können. Sie fanden, dass sie für verlässliche MSP Ergebnisse 1 ng Zelllinien DNA in die Bisulfitreaktion einsetzten mussten. Greenspan *et al.* (2006) benötigten 1500 - 3000 Zellen von 5 - 7 µm Schnitten von gefrorenem Gewebe für die semiquantitative MSP Analyse von RASSF1A in normalen und entarteten Darmepithelzellen. Ebenfalls Schnitte von gefrorenen Geweben (12 µm) verwendeten Weber *et al.* (2005) für die Mikrodissektion von mindestens 1000 Zellen um anschließend semiquantitativ per MSP die Methylierung von zwei Genen nachweisen zu können. Lediglich 50 - 100 Zellen von 4 µm Dünnschnitten (Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettet) für eine semiquantitative MSP Analyse von p16 in Brustkrebs benötigten Di Vinci *et al.* (2005).

Eine Form der LMD Technik (Arcturus, USA) beruht auf einem Kunststoffilm, der auf das Gewebe gelegt wird und durch Laserimpulse mit dem zu analysierenden Gewebe verschmolzen wird. Anschließend kann der Film mit den anhaftenden Geweberealen von dem Dünnschnitt abgehoben und so isoliert werden. Autoren, die

diese Technik benutzen, machten Angaben zur Gewebemenge häufig als Anzahl von Laserschüssen eines bestimmten Durchmessers. Henrique *et al.* (2006) führten 400 Laserschüsse a 30 µm durch um drei Gene in Prostataneoplasien mit quantitativen MSP untersuchen zu können. Hanson *et al.* (2006) analysierten die Methylierung von zwei Genen quantitativ per MSP in Tumor-assoziiertem Stroma der Prostata und verwendeten dazu Gewebe, dass aus ca. 3000 Schüssen (15 µm) resultierte. Eine qualitative MSP Analyse von fünf Genen in Prostatakrebs und dessen Vorstufen gelangen Woodson *et al.* (2004), die dafür 500 Schüsse (30 µm) durchführten. Um die Methylierung von GSTP1 in verschiedenen Regionen von Ethanol-fixierten Prostatatumoren durch Pyrosequenzierung quantitativ analysieren zu können, benötigten Rodriguez-Canales *et al.* (2007) ca. 3000 Schüsse zur Isolierung von Epithelzellen und 4000 – 15000 Schüsse für Stromazellen.

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode ermöglicht die quantitative Analyse von mindestens 13 Genen und einer Templatmenge von 50 diploiden, intakten Zellkernen. Die Mikrodissektion wurde von 5 µm und 3 µm Hämatoxylin-gefärbten Dünnschnitten von FFPET durchgeführt. In keiner weiteren publizierten Studie wurden mehr als fünf Gene untersucht. In wahrscheinlich allen Studien, in denen mit einer ähnlich geringen Menge an DNA gearbeitet wurde, wurde nur eine qualitative oder semiquantitative Analyse durchgeführt. Damit ist es unwahrscheinlich, dass eine der veröffentlichten Methoden eine vergleichbare Leistungsfähigkeit besitzt, wie die in dieser Arbeit entwickelte Methode.

6.1.4 Kontaminationsvermeidung

Ein Problem für Analysen, die auf einer PCR-Amplifikation beruhen, ist die Kontamination der PCR mit Fremd-DNA, da diese ebenfalls amplifiziert würde und das Ergebnis verfälscht. Würde in einem Labor offen mit diesem PCR Produkt gearbeitet, z.B. bei der Sequenzierung, dann würde irgendwann unweigerlich soviel dieses PCR Produktes im Umlauf sein, dass ein kontaminationsfreies Arbeiten schwierig wird. Dies ist solange kein Problem, solange man bei einer Kontamination weiß, wieviel DNA als Templat eingesetzt wurde und wie stark die Kontamination war. Wurde wesentlich mehr DNA als Templat eingesetzt, als durch die Kontamination eingetragen wurde, dann ist das Ergebnis weiterhin zuverlässig. Bei der Analyse von mikrodissezierten Proben ist die DNA Menge in der Regel jedoch so gering, dass eine Kontamination fast immer zu einem falschen Ergebnis führen würde. Es gibt aber auch etablierte Methoden, die einen Übertrag von Kontaminationen verhindern (Borst *et al.* 2004). Die bekannteste und wohl am weitesten verbreitete Methode stellt dabei das UNG (Uracil-DNA-Glykosylase) System zur Kontaminationsvermeidung dar (Pruvost *et al.* 2005, Longo *et al.* 1990). Hierbei wird in der PCR das Nukleotid dUTP anstelle von dTTP verwendet, sodass jedes PCR Produkt nur Uracil und kein Thymin enthält. Damit unterscheidet sich dieses Produkt von humaner DNA, die kein Uracil enthält. In das PCR Reaktionsgemisch wird das Enzym UNG zugegeben und dieses Gemisch vor dem Start der PCR inkubiert. Dabei verdaut dieses Enzym diejenige DNA, die Uracil enthält, also die potentiellen Kontaminationen, wohingegen die eigentliche Templat-DNA erhalten bleibt. Während des ersten Erhitzungsschrittes der PCR wird dieses Enzym dann inaktiviert und die PCR kann ungehindert ablaufen.

Bei der Bisulfitkonvertierung wird Cytosin zu Uracil umgewandelt. Folglich würde Bisulfit-behandelte DNA auch durch UNG verdaut und das beschriebene System zur Kontaminationsvermeidung so nicht anwendbar.

Allerdings wurde kürzlich eine modifizierte Version der Bisulfitmethode veröffentlicht, die die Anwendung des UNG Systems auch auf Bisulfit-DNA erlaubt (Tetzner *et al.* 2006, Tetzner und Dietrich 2006). Dabei wird die Bisulfitreaktion an einer Stelle abgebrochen, an der anstelle von Uracil das intermediäre Produkt Sulfon-Uracil vorliegt. Dieses Sulfonuracil ist kein Substrat für die UNG, sodass Sulfon-Uracil-haltige DNA zusammen mit dem UNG System verwendet werden kann. In dem Erhitzungsschritt, in dem die UNG dann inaktiviert wird, wird ebenfalls im leicht basischen PCR Puffer die Sulfon-Uracil-haltige DNA desulfoniert und kann anschließend als Templat für die DNA Polymerase dienen.

Durch diese Modifikation der Bisulfitmethode ist die Grundlage dafür geschaffen, die Methylierungsanalyse von mikrodisseziertem Material und kleinsten DNA Mengen im allgemeinen auch in der klinischen Routine zu implementieren. Die Konzeption dieser Methode zur Vermeidung von PCR Kontaminationen war teilweise Bestandteil dieser Arbeit (Daten nicht gezeigt), wurde aber in dieser Studie nicht angewendet, da sich Kontaminationen als noch nicht problematisch erwiesen.

6.2 Brustkrebsbiomarker

Brustkrebsbiomarker, die verwendet werden können, um den Ausgang einer Brustkrebserkrankung oder das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorauszusagen, stellen ein wichtiges medizinisches Werkzeug dar. Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung solcher Marker. Dafür wurde eine Strategie entwickelt, bei der Gene, die im biologischen Zusammenhang mit bekannten Biomarkern stehen, analysiert wurden. Um solche Gene zu identifizieren, war es zunächst notwendig, die biologischen Zusammenhänge der bekannten Biomarker zu verstehen, da von leistungsfähigen Biomarkern, wie beispielsweise PITX2 bisher kaum etwas über die biologische Rolle bei der Tumorgenese bekannt war. Ein Teil dieser Arbeit bestand daher darin, anhand publizierter Daten mögliche biologische Zusammenhänge von Brustkrebs und der Methylierung der bereits als Biomarker bekannten Gene zu finden (Kapitel 6.2.1). Anschließend wurden Gene, die ebenfalls in diese biologischen Abläufe involviert sind, hinsichtlich ihres Potenzials als Biomarker untersucht und so vielversprechende neue Biomarker identifiziert (Kapitel 6.2.2). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war außerdem die Methylierung innerhalb des komplexen Gens PITX2 näher zu untersuchen, um Regionen zu identifizieren, die leistungsfähigere Biomarker darstellen könnten (Kapitel 6.2.3)

6.2.1 Biologie bekannter Brustkrebsbiomarker

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit uPA, PITX2 und TFF1 Gene charakterisiert, deren prädiktives und prognostisches Biomarkerpotenzial bereits bekannt ist (Harbeck *et al.* 2005, Maier *et al.* 2004 und 2005b, Jänicke *et al.* 2001). Während für uPA auch biologische Aspekte des Wirkens in der Tumorentstehung und -progression bekannt sind, ist eine biologische Funktion von TFF1 kaum und für PITX2 gar nicht bei Krebs beschrieben.

Eine Schlüsselrolle bei der Invasion von Tumorzellen in benachbarte Gewebe ist die Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM). Diese extrazelluläre Matrix stellt eine physische Barriere für die Invasion und Migration von Tumorzellen dar und wird durch eine Vielzahl von Proteasen, die vom Tumor exprimiert werden, degradiert. Eine dieser Proteasen ist uPA (Plasminogenaktivator vom Typ Urokinase), welche durch eine spezifische Spaltung das inaktive Plasminogen in Plasmin umwandelt. Plasmin ist in der Lage, die meisten Komponenten der ECM zu degradieren und dadurch die Tumorzellinvasion und -migration zu erleichtern (Rabbani und Mazar 2001). Zusätzlich wirkt Plasmin bei der Aktivierung weiterer inaktiver Proteasen, wie z.B. MMPs mit, wodurch die invasive Progression des Tumors weiter unterstützt wird (Carmeliet *et al.* 1997). Neben der Aktivierung von Plasminogen ist uPA selbst in der Lage, Wachstumsfaktoren zu aktivieren, welche wiederum eine wichtige Rolle in der Angiogenese haben (Rabbani und Mazar 2001, Sidenius und Blasi. 2003, Duffy 2004). Die biologische Funktion von TFF1 (*Trefoil Factor 1*) ist bis heute nahezu unbekannt. Allerdings handelt es sich um ein Protein, dessen Expression direkt durch Östrogen induziert wird (Jakowlew *et al.* 1984) und die Migration von Zellen stimuliert (Prest *et al.* 2002, Marchbank *et al.* 1998). Die direkte Regulation von TFF1 durch Östrogen ist vermutlich auch der Grund für die Eignung von TFF1 als prädiktiver Marker für eine Antihormontherapie und gleichzeitig für das Fehlschlagen als prädiktiver Marker in der Anthrazyklin-behandelten Patientinnenpopulation, wie in dieser

Arbeit gezeigt.

Abnormale Methylierung des PITX2 (*Paired-like* Homeodomäne Transkriptionsfaktor) Gens wurde erstmals 2001 (Toyota *et al.*) bei Patienten mit akuter myeloider Leukämie gefunden. In dieser Studie wurde eine Korrelation der PITX2 Methylierung mit der Methylierung des Östrogenrezeptors festgestellt. Die Methylierung des ER war bereits als prognostischer Biomarker für Leukämie bekannt (Li *et al.* 1999). Anschließend wurde gefunden, dass PITX2 Methylierung auch ein prognostischer Marker für Brustkrebs Erkrankungen und ein prädiktiver Marker für die Behandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen ist (Foekens *et al.* 2005, Maier *et al.* 2004, Harbeck *et al.* 2005). Dabei ist eine biologische Funktion von PITX2 in der Tumorgenese bis heute nicht beschrieben und soll im folgenden diskutiert werden.

PITX2 gehört zu der Klasse der Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren. Diese besitzen eine charakteristische 60 Aminosäuren große DNA-Bindungsdomäne (Homeobox) und spielen eine wichtige Rolle bei der Segmentierung der Körperachse während der embryonalen Entwicklung und der Zelldifferenzierung. Mutationen von PITX2 führen zu dem Axenfeld-Rieger Syndrom, welches z.B durch Fehlentwicklungen der Augen, Zähne, des Herzens und der Hypophyse gekennzeichnet ist (Amendt *et al.* 2000, Gage *et al.* 1999). Entsprechend dieser Symptome hat PITX2 u.a. eine Funktion während der embryonalen Entwicklung des Herzens (Ryan *et al.* 1998) der Zähne (Lin *et al.* 1999), Augen (Holmberg *et al.* 2004) und der Hypophyse (Parks und Brown 1999, Suh *et al.* 2002). Vor allem bei der Entwicklung asymmetrischer Organe spielt PITX2 eine entscheidende Rolle (Ryan *et al.* 1998). Während der embryonalen Entwicklung bildet sich die Hypophyse aus dem *Rathke Pouch*, der Vorstufe der Hypophyse. Dabei kommt es zu einer Differenzierung von verschiedenen Zelllinien, die jeweils verschiedene Hormone sezernieren. Eine dieser Zelllinien sind die laktotrophen Zellen, die das Peptidhormon Prolaktin sezernieren. PITX2 spielt eine fundamentale Rolle während dieser Organogenese (Reynaud *et al.* 2004, Suh *et al.* 2002). Auch in der entwickelten Hypophyse steht die Expression von Prolaktin unter der Kontrolle von PITX2. Hormone und Wachstumsfaktoren, wie z.B. Insulin und der epidermale Wachstumsfaktor, die die Expression von Prolaktin ebenfalls stimulieren, sind auf PITX2 synergistisch angewiesen (Quentien *et al.* 2002a und 2002b). Prolaktin ist zusätzlich ein Schlüsselfaktor bei der Entwicklung, dem Wachstum und der Differenzierung der Brustdrüse (Horseman 1999, Grimm *et al.* 2002, Hovey *et al.* 2001). Auch bei der Brustkrebsentstehung spielt Prolaktin eine wichtige Rolle (Tworoger und Hankinson 2006). In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass erhöhte Prolaktinwerte im Blut ein Risikofaktor für Brustkrebs sind (Clevenger 2003). Versuche, durch künstliches Senken dieses Prolaktinspiegels Brustkrebs Erkrankungen positiv zu beeinflussen, schlugen fehl (Peyrat *et al.* 1984). Allerdings ist inzwischen auch bekannt, dass die Zellen des Brustgewebes selbst in der Lage sind, Prolaktin zu produzieren und demnach nicht auf das exogene Prolaktin aus der Hypophyse angewiesen sind (Clevenger *et al.* 1995, Zinger *et al.* 2003). Trotz der das Tumorstadium fördernden Eigenschaften des Prolaktins, zeigen jüngste Ergebnisse, dass es durch negative Regulation pro-metastatischer Signalwege die Invasion verhindern kann und somit die Aggressivität des Tumors herabgesetzt werden kann (Nouhi *et al.* 2006). Das von den Brustgewebezellen selbst gebildete Prolaktin induziert beispielsweise die Expression des ER und erhöht damit das Ansprechen auf Östrogen (Elmore *et al.* 2004). Über diesen Zusammenhang ließen sich sowohl die prognostische, als auch die prädiktive Markereigenschaft der PITX2 Methylierung erklären. Eine hohe PITX2 Methylierung in den Brustkrebszellen (schlechte Prognose und schlechtes Ansprechen auf eine Tamoxifentherapie) könnte eine niedrigere Expression von Prolaktin in diesen Zellen bedingen. Dadurch würde zum einen weniger ER exprimiert und die Patientin spräche schlechter auf eine Antiöstrogentherapie

mit Tamoxifen an, zum anderen würde die Unterdrückung pro-metastatischer Signalwege wegfallen, sodass die Aggressivität zunähme und auch Therapie-unabhängig eine Prognose getroffen werden könnte.

Neben diesen Zusammenhängen ist auch beschrieben, dass PITX2 unter der Kontrolle des Wnt Signalweges steht (Baek *et al.* 2003, Kioussi *et al.* 2002, Vadlamudi *et al.* 2005, Zirn *et al.* 2006, Clevers 2002). Der Wnt Signalweg spielt eine wichtige Rolle sowohl bei der Embryonalentwicklung als auch bei der Tumorentstehung und -progression (Ilyas 2005, Brennan und Brown 2004). Der ER / Östrogen Signalweg ist essentiell für die Entwicklung der Brust (Bocchinfuso und Korach 1997), trotzdem entwickeln Mäuse mit funktionsunfähigen ER bei inaktiviertem Wnt Signalweg nach einiger Zeit Brustkrebs (Bocchinfuso *et al.* 1999). Dazu kommt, dass eine Überexpression von Wnt 1 in Mäusen zu der Bildung von Hormonrezeptor-positiven, aber Tamoxifen resistenten Tumoren führt (Zhang *et al.* 2005). Eine Überexpression des Inhibitors des Wnt Signalweges DKK1 ist dagegen eher in hormonresistenten ER und PR negativen Tumoren zu finden (Forget *et al.* 2007). Inzwischen ist ein direktes Zusammenwirken des ER und Wnt Signalweges beschrieben (Kouzmenko *et al.* 2004). Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass vorhandene PITX2 Methylierung ein Indikator für eine negative Regulation des Wnt Signalweges und damit zur Ausbildung von hormonresistenten Tumoren kommt, die nicht auf eine Antiöstrogentherapie ansprechen.

In dieser Arbeit wurde ebenfalls gefunden, dass die PITX2 Methylierung ein prädiktiver Marker für eine Behandlung mit Anthrazyklin ist. Anthrazyklin interkaliert mit DNA, generiert Strangbrüche und hemmt so die Topoisomerase II. Da Anthrazyklin einen anderen Wirkmechanismus besitzt, ist bei dieser Art von Therapie die Eignung von PITX2 als prädiktiver Marker nicht direkt über den Prolaktin- oder Wnt Signalweg erklärbar. Lediglich die Eigenschaft von Tumoren mit PITX2 Methylierung eventuell weniger Prolaktin zu exprimieren und dadurch generell aggressiver zu sein und dementsprechend auch schlechter auf eine Chemotherapie ansprechen, könnte diese Markereigenschaft erklären.

6.2.2 Identifizierung neuer epigenetischer Biomarker

In dieser Arbeit wurden zunächst Zelllinienexperimente zur erfolgreichen Identifizierung potentieller Biomarker durchgeführt. Neben den beiden anderen Mitgliedern der PITX Familie (PITX1 und PITX3) wurde dazu LHX3 (*LIM Homeobox Gen 3*) und DLX4 (*Distal-less Homeobox 4*) in Zelllinien untersucht. Während PITX1, welches überlappende Funktionen mit PITX2 besitzt (Quentien *et al.* 2006, Marcil *et al.* 2003, Quentien *et al.* 2002a, Tremblay *et al.* 2000) dabei kein interessantes Methylierungsmuster zeigte, konnte für PITX3, dessen biologische Funktion kaum beschrieben ist, welches aber eine hohe Sequenzhomologie mit PITX2 aufweist, eine deutliche differentielle Methylierung in den Zelllinien gefunden werden. Keine auffällige Methylierung zeigte DLX4, ein Homeodomänen-Transkriptionsfaktor, dessen Expression mit dem ER Status von Brustkrebstumoren korreliert (Fu *et al.* 2003). LHX3, das wie PITX2 eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Hypophyse spielt (Mullen *et al.* 2007) und direkt durch PITX2 reguliert wird (Charles *et al.* 2005), zeigte dagegen in den Zelllinien Methylierung, die der Methylierung von PITX2 ähnelte. Zur Bestätigung der auf Ebene der Zelllinienexperimente gefundenen potentiellen Markerkandidaten wurde LHX3 und PITX3 zusätzlich in ausgewählten Patientinnenproben analysiert. Auch PITX1, welches in den Zelllinienexperimenten unauffällig erschien, wurde zur Kontrolle mit untersucht. Dabei konnten die Ergebnisse der Zelllinienstudie bestätigt werden und LHX3 und PITX3 als potentielle Biomarkerkandidaten

weiter validiert werden, während PITX1 auch bei Patientinnenproben keine interessante Methylierung zeigte. Basierend auf den mit den Zelllinien und den ausgewählten Patientinnenproben gewonnenen Erkenntnissen wurde eine Strategie ausgearbeitet, mit der es möglich ist, eine größere Anzahl potentieller Biomarker zu untersuchen. Dazu wurden einige Patientinnenproben ausgewählt, die eine differentielle Methylierung von PITX2 zeigten. Anschließend wurde die Methylierung ausgewählter Gene, die im Zusammenhang mit Brustkrebs stehen könnten, in diesen Proben untersucht. Um den Kreis potentieller Biomarker eingrenzen zu können, sollten Gene identifiziert werden, die in diesen Patientinnenproben eine ähnliche, wenn auch nicht gleiche Verteilung der Methylierung zeigen wie PITX2. Die nach dieser Analyse weiterhin interessanten Gene wurden in einer Chip-Studie auf einer größeren Patientinnenpopulation von Antrazyklin-behandelten Brustkrebspatientinnen untersucht. Ausgewählt wurden dafür Gene, die im biologischen Zusammenhang mit PITX2, dem Wnt Signalweg und/oder der TGF Superfamilie stehen. Zusätzlich wurden die zuvor identifizierten potentiellen Biomarker PITX3 und LHX3 in dieser Chip-Studie ebenfalls analysiert. Es zeigte sich, dass durch diese Vorgehensweise mit BMP4 ein Gen gefunden werden konnte, das in der in dieser Arbeit untersuchten Gesamtpopulation der Anthrazyklin-behandelten Frauen einen besseren Biomarker darstellt als PITX2. Mit NR5A1 konnte außerdem ein Gen identifiziert werden, welches in der hier untersuchten Subpopulation der ER negativen Patientinnen zusammen mit BMP4 einen besseren prädiktiven Biomarker als PITX2 darstellt. BMP4 ist als Repressor der PITX2 Expression bei Mäusen (St Amand *et al.* 2000) beschrieben. Ebenfalls wurde aber auch PITX2 als Repressor von BMP4 gefunden (Liu *et al.* 2003). Bei der Entwicklung der Brustdrüsen von Mäusen spielt BMP4 darüberhinaus eine wichtige Rolle (Hens *et al.* 2007). Daneben ist bekannt, dass eine Behandlung von Eierstockkrebszellen mit BMP4 zu einer höheren Invasivität dieser Zellen führt (Theriault *et al.* 2007) und BMP4 selbst ein Target des Wnt Signalweges ist (Schwartz *et al.* 2003, Kim *et al.* 2002).

NR5A1 gehört wie der Östrogenrezeptor zur Familie der Nuklearrezeptoren, wobei der Ligand von NR5A1 noch nicht bekannt ist. NR5A1 ist selbst wie PITX2 bei der Entwicklung der Hypophyse beteiligt (Cushman *et al.* 2002, Suh *et al.* 2002) und agiert synergistisch mit PITX2 bei der Transkription vieler Gene in der Hypophyse (Tremblay *et al.* 2000). Daneben reguliert NR5A1 die Transkription vieler in Geschlechtsreifung, Differenzierung, Reproduktion und Steroidproduktion involvierter Gene, z.B. der Aromatase. Die Erkennungsstelle von NR5A1 ähnelt der des Östrogenrezeptors (Ozisik *et al.* 2003, Rice *et al.* 1991, Ingraham *et al.* 1994, Monte *et al.* 1998).

Zwar konnte in der Chip-Studie PITX3 nicht als prädiktiver Marker identifiziert werden und auch LHX3 erwies sich als schlechter Marker, trotzdem zeigen die Ergebnisse für BMP4 und NR5A1, dass die in dieser Arbeit getroffenen Vorgehensweise ein großes Potenzial für die Identifizierung neuer und besserer Biomarker beinhaltet. Auch wenn neu identifizierte Biomarker keine zutreffendere Klassifizierung von Patientinnen ermöglichen, als die bekannten Biomarker, liefern sie doch wichtige Erkenntnisse über die Biologie des Brustkrebs und damit vielleicht auch für neue Therapiestrategien, wie beispielsweise HER2/neu, das selbst Target einer erfolgreichen Therapieform wurde.

6.2.3 Methylierung innerhalb von PITX2

Bisher sind drei verschiedene Transkripte bekannt, für die das PITX2 Gen kodiert: PITX2A, B und C (Semina *et al.* 1996, Arakawa *et al.* 1998). Die Transkriptvarianten A und B unterscheiden sich durch ein alternativ gespleißtes Exon, während die Variante C durch eine alternativen Promoter reguliert wird (Kioussi *et al.* 2002, Shiratori *et al.* 2001). Über das Gen verteilt befinden sich mehrere CpG- Inseln, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Über eine Korrelation der Expression der drei verschiedenen Transkriptvarianten mit der Methylierung der verschiedenen CpG-Inseln in Zelllinienexperimenten konnte festgestellt werden, dass die Methylierung der Region, die sich als Biomarker erwiesen hat, die Expression der Isoformen A und B negativ reguliert. Zusätzlich konnte ein Bereich im Gen gefunden werden, dessen Methylierung mit der Expression der Variante C korreliert. Die Methylierungsanalyse dieses Promotors C in einer Patientinnenpopulation ergab zwar, dass dieser auch Potenzial zur prognostischen und prädiktiven Klassifizierung der Patientinnen hat, jedoch war diese unzutreffender als die Klassifizierung anhand der Methylierung des Promotors AB. Inzwischen sind einige Studien publiziert, die die Untersuchung der verschiedenen biologischen Funktionen der einzelnen Transkriptvarianten zum Ziel hatten. Die Varianten A und B könnten eher im Zusammenhang mit dem Wnt Signalweg stehen und für die Entwicklung der Hypophyse verantwortlich sein (Kioussi *et al.* 2002), während die Isoform C ihre Funktion eher in der Entwicklung assymetrischer Organe hat und durch Mitglieder der Superfamilie der transformierenden Wachstumsfaktoren (TGF) reguliert wird (Shiratori *et al.* 2001, Schweickert *et al.* 2000). Die Beobachtung, dass die Methylierung des Promotors AB in der analysierten Patientinnenpopulation ein besserer Biomarker als die des Promotors C ist, stützt die These, dass ein fehlregulierter Wnt Signalweg verantwortlich für die schlechte Prognose bei Patientinnen mit hoher PITX2 (AB) Methylierung sein könnte. Daneben ist bekannt, dass die Variante B in der Hypophyse die Expression von Prolaktin stärker fördert, als die beiden anderen Isoformen (Cox *et al.* 2002). Sollte dies auch in den Brustgewebezellen der Fall sein, dann würde dies die Theorie stützen, dass ein niedriger endogener Prolaktinspiegel in den Brustgewebezellen zur Bildung von aggressiveren Tumoren führt. Beides sind mögliche biologische Erklärungen für die zutreffendere Klassifizierung der Patientinnen anhand der Methylierung des Promotors AB im Vergleich zu der des Promotor C.

Die Zelllinien Experimente zeigten, wie sinnvoll es ist, über solche Modelle bekannte Biomarker näher zu charakterisieren. So konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb des PITX2 Gens die Methylierung teilweise drastisch ändert. Besonders CpG-Inseln in den intragenischen Bereichen zeigten eine komplett andere Methylierung als die Promotorregionen. Eine auffällige Beobachtung dabei war, dass vor allem Zelllinien, die in den intragenischen Bereichen stark methyliert waren eine Expression von PITX2 zeigten. Dies kann darauf hinweisen, dass noch andere Mechanismen für die Regulation der Expression verantwortlich sind. Es sind Mechanismen beschrieben, bei der eine Methylierung des Promotors einer *Antisense* RNA notwendig ist, damit das eigentliche Gen exprimiert werden kann (Sleutels *et al.* 2002, Lyle *et al.* 2000). Auch innerhalb einer CpG-Insel konnte gezeigt werden, dass sich die Methylierung im Bereich von wenigen Nukleotiden drastisch ändern kann. Diese drastische Änderung der Methylierung fand im Bereich einer niederkomplexen Sequenz („*dust*“-Sequenz) statt. Solche Methylierungsgrenzen sind in der Literatur bereits beschrieben, allerdings bisher nur im Bereich von *Short Tandem Repeats* (Millar *et al.* 2000, Hogeveen *et al.* 2001). Die hier gefundene „*dust*“-Sequenz könnte ein weiteres Motiv für solche Methylierungsgrenzen darstellen und somit wertvolle Information für eine Vorhersage der Methylierung in einer CpG-Insel liefern. Solche

Zelllinienexperimente könnten wertvolle Daten über das Verständnis eines Biomarkers liefern und dazu beitragen, diesen zu optimieren. Besonders wenn das Genprodukt eines Methylierungsmarkergens eine direkte biologische Funktion in der entsprechenden Fragestellung ausfüllt, erscheint es sinnvoll, die Regionen über Zelllinienexperimente zu identifizieren, in denen Methylierung und Expression die besten Korrelation zeigen. Daneben zeigt sich auch, dass es sinnvoll ist, potentielle alternative Promotoren ebenfalls zu untersuchen, auch wenn sich im Fall von PITX2 dieser alternative Promotor als der schlechtere Biomarker in der untersuchten Patientinnenpopulation darstellte.

6.3 Methylierungsmarker im Kontext der Tumorheterogenität

Für ein tieferes Verständnis epigenetischer Biomarker wurde eine Mikrodisektionsstudie durchgeführt, bei der von drei Patientinnen die verschiedenen im Tumor vorkommenden Gewebetypen isoliert und analysiert wurden. Neben den entarteten Epithelzellen des Tumors wurden normale Epithelzellen („normale“ Duktuli), Stroma- und Fettzellen, sowie Muskelgewebe mikrodiseziert. Zusätzlich wurden auch Lymphozyten, die im Rahmen einer Immunabwehr den Tumor infiltrieren, untersucht. Die entarteten Tumorzellen wurden weiter nach Invasivität als intraduktale (DCIS) und invasive (IDC) Tumorzellen klassifiziert. Um die Heterogenität innerhalb eines Tumors bestimmen zu können, wurden von jedem Zelltyp außerdem mehrere Proben aus einem Tumor analysiert. Neben den bereits bekannten prognostischen und prädiktiven Marker uPA, TFF1 und PITX2 wurden auch die in dieser Arbeit identifizierten potentiell prognostischen und prädiktiven Marker LHX3 und PITX3, sowie weitere Regionen des PITX2 Gens, darunter der alternative Promotor C analysiert. Neben diesen prognostischen und prädiktiven Biomarkern wurden außerdem die diagnostischen Marker RASSF1A, LIMK1, SLIT2 und SLITRK1 analysiert. Das Ziel dieser Mikrodisektionsstudie war auf der einen Seite den Einfluß der Heterogenität des Tumors auf das Ergebnis eines medizinischen Tests abschätzen zu können. Auf der anderen Seite sollten diese Ergebnisse weiter zur Aufklärung der Biologie des Brustkrebs beitragen um so perspektivisch einen Beitrag dazu zu leisten, die Diagnostik und Therapie von Brustkrebserkrankungen verbessern zu können

6.3.1 Verteilung der Methylierung gleicher Zelltypen im Tumor

Eine Theorie zur Entwicklung eines Tumors setzt eine Serie von Mutationen in einer einzigen Zelle voraus, die dazu führen, dass sich aus dieser einen Zelle schließlich ein Tumor bildet. Bereits 1953 wurde dagegen die Theorie eines möglichen Feldeffektes entwickelt. Mit dieser Feldeffekttheorie sollte die Entwicklung von multiplen Primärtumoren und lokalen Rückfällen nach der Operation erklärt werden. In letzter Zeit weisen einige Studien darauf hin, dass es während der Krebsentstehung tatsächlich zur Bildung eines Feldes mit genetisch veränderten Zellen kommt. Dabei erfährt eine Zelle zunächst eine Mutation und bildet eine klonale Einheit von Tochterzellen. In dieser klonalen Einheit treten weitere Mutationen auf, die sich ebenfalls in Form einer klonalen Einheit in diesem Feld manifestieren. Durch Wachstumsvorteile breitet sich dieses Feld aus und ersetzt nach und nach das Epithel. Sobald eine der Zellen die kritische Menge an Mutationen für eine

Tumorbildung erhalten hat, beginnt diese. Erreichen mehrere Zellen diese Anzahl an Mutationen, dann entstehen multiple Primärtumoren. Das Vorhandensein eines solchen Feldes hätte weitreichende klinische Implikationen, da dieses nach der Operation im Körper verbleiben könnte und zu einem baldigen Rückfall führen könnte. Solche Felder von bis zu 7 cm sind bereits in der Literatur beschrieben. Dabei werden vor allem Marker wie p53 Mutationen, LOH und Mikrosatellitenveränderung zur Analyse eines solchen Feldes verwendet. Einen Überblick dazu liefern Braakhuis *et al.* (2003) und Garcia *et al.* (1999). Epigenetische Mechanismen könnten für eine Bildung eines solchen Feldes prädestiniert sein, da hier auch die Möglichkeit bestünde, dass eine Zelle die DNA Methylierung einer benachbarten Zelle beeinflusst. Solche epigenetischen Effekte könnten auch dazu führen, dass ein solches Feld auch auf das Tumor-assoziierte Stroma übergreift. Allerdings mangelt es an Studien, die dies belegen könnten, da bis zu der Entwicklung der LMD keine geeigneten Methoden zum Nachweis eines solchen Feldeffektes verfügbar waren und auch die nötigen Technologien zur Methylierungsanalyse von mikrodisssezierten Zellen fehlten. Dementsprechend sind die publizierten Studien diesbezüglich auch widersprüchlich. Während Yan *et al.* (2006) fand, dass die „normalen“ Epithelzellen noch in bis zu 4 cm Entfernung zum Tumor Methylierung aufwiesen, fanden Lehmann *et al.* (2002) keine Methylierung in Tumor-anliegenden normalen Epithelzellen.

Die Frage nach dem Vorliegen eines solchen Feldeffektes konnte in dieser Mikrodisssektionsstudie nicht abschließend beantwortet werden. Es wurde zwar Methylierung in „normalen“ Duktuli für einige Gene gefunden (z.B. für PITX2), allerdings war dort die Methylierung nur gering und es könnte sich um Schwankungen im Rahmen der Messgenauigkeit der Methode handeln. Für eine eindeutige Beantwortung hätten dazu zusätzlich normale Duktuli von Personen ohne Brustkrebs analysiert werden müssen. Sollte es sich bei der in den „normalen“ Duktuli nachgewiesenen Methylierung tatsächlich um einen Feldeffekt handeln, dann fällt dieser doch eher gering aus. Dazu kommt, dass eine vorhandene Methylierung in den „normalen“ Duktuli nicht zwangsläufig auf einen Feldeffekt zurückzuführen ist, sondern dass auch das Vorhandensein einiger andersartiger Zellen, z.B. Bruststammzellen mit der entsprechenden Methylierung dafür verantwortlich sein könnte.

6.3.2 Heterogenität innerhalb von Arealen gleicher Zellen

Eine interessante Erkenntnis aus der Mikrodisssektionsstudie ist das Vorhandensein von uneinheitlicher Methylierung innerhalb von einzelnen mikrodisssezierten Arealen. Wären alle Krebszellen in einem solchen Areal einheitlich methyliert, dann würden bei stabiler Vererbung nur Methylierungswerte von 0 % (kein Allel methyliert), 50 % (ein Allel methyliert) und 100 % (beide Allele methyliert) vorkommen. Dies konnte nicht beobachtet werden. Vielmehr erschienen die einzelnen Proben sehr heterogen. Dies kann drei Ursachen haben. Zum einen ist es möglich, dass bei schnell wachsenden Zellen die Methylierung nicht stabil vererbt wird. Daneben ist es möglich, dass die Zellen innerhalb dieser Proben nicht klonalen Ursprungs sind, sondern von verschiedenen Zellen abstammen. Als letzte Möglichkeit erscheint, dass die Tumorzellen zwar von der gleichen Zelle abstammen könnten, jedoch einen unterschiedlichen Grad der Differenzierung aufweisen, der in der unterschiedlichen Methylierung manifestiert ist. Der substanzielle Einfluß der DNA Methylierung ist aus der Embryogenese und der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen aus den embryonalen Stammzellen bekannt. Embryonische Stammzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie in der

Lage sind, während der Embryogenese zu allen möglichen Zelltypen zu differenzieren. Um diese Totipotenz zu erlangen, findet während der frühen Embryogenese zunächst eine Reprogrammierung statt, bei der nahezu die komplette Methylierung des befruchteten Eis verloren geht und auch bei der anschließenden Differenzierung sind epigenetische Mechanismen wieder maßgeblich beteiligt (Reik *et al.* 2001, Surani 2001, Monk *et al.* 1987, Lotem und Sachs 2006). Normale adulte Gewebe enthalten ebenfalls Stammzellen, die für die Regeneration dieser Gewebe verantwortlich sind (Spangrude *et al.* 1991, Gage 2000, Shackleton *et al.* 2006). Diese sich selbst erneuernden adulten Stammzellen befinden sich innerhalb von Nischen in diesen Geweben, von denen aus die Regeneration des Gewebes reguliert wird (Fuchs und Segre 2000, Calvi *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003, Li und Xie 2005). Es wurde lange Zeit angenommen, dass das Differenzierungspotenzial dieser Stammzellen strikt gewebespezifisch ist, inzwischen zeigen aber Studien, dass diese Plastizität der Differenzierung wesentlich größer ist (Fuchs und Segre 2000, Herzog *et al.* 2003, Martin-Rendon und Watt 2003). Unter bestimmten Bedingungen können hämatopoetische Stammzellen zu neuronalen und endothelialen Zellen, Leber-, Muskel- und Hautzellen differenzieren (Eglitis und Mezey 1997, Lagasse *et al.* 2000, Camargo *et al.* 2003, Krause *et al.* 2001, Bailey *et al.* 2004). Andere adulte Stammzellen können ebenfalls zu anderen Zelltypen differenzieren, Skelettmuskelstammzellen zu Blut- und neuronalen Zellen, Herzmuskelstammzellen zu endothelialen Zellen, usw (Mohri *et al.* 2006, Jackson *et al.* 1999).

Die Idee, dass Krebs eine Stammzellenkrankheit sein könnte ist nicht neu, allerdings wurde sie zunächst verworfen, da die entsprechenden molekularbiologischen Methoden für einen Nachweis fehlten. Drei Hauptargumente stützen diese Theorie (Ponti *et al.* 2006):

- Stammzellen sind langlebig und teilen sich langsam und haben so die Möglichkeit genügend Mutationen für eine neoplastische Transformation zu akkumulieren, wohingegen somatische Zellen permanent erneuert werden und wesentlich kürzer leben.
- Signalwege, die in der Erneuerung von Stammzellen involviert sind (z.B. Wnt, Notch, Sonic Hedgehog und PTEN), sind in Tumoren häufig dereguliert (Reya *et al.* 2001).
- Normale Stammzellen und Tumorzellen haben eine Reihe gemeinsamer Merkmale, wie relative Undifferenziertheit, Vermögen zur Selbsterneuerung, aktive zytoprotektive Mechanismen (z.B. Telomeraseaktivität, Überexpression antiapoptotischer Proteine, erhöhte Kapazität für transmembranen Efflux).

Hinweise, dass Tumoren aus Stammzellen hervorgehen und durch sie erhalten werden, wurden kürzlich für Leukämie, Hirn- und Brustkrebs geliefert (Bonnet *et al.* 1997, Singh *et al.* 2003, Galli *et al.* 2004, Singh *et al.* 2004, Al-Hajj *et al.* 2003). Allerdings besitzt dabei nur eine kleine Anzahl der Brusttumorzellen die Fähigkeit, nach einer Transplantation in Mäuse neue Tumoren zu bilden. Diese Zellen zeigten auch die typischen Eigenschaften von Stammzellen, vor allem das Vermögen zur Selbsterneuerung (Al-Hajj *et al.* 2003). Diese Beobachtung in Verbindung mit dem anerkannten Einfluß der DNA Methylierung auf die Differenzierung von Stammzellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass die in den Tumorebenen gefundene Methylierungsheterogenität von verschiedenen differenzierten Zellen, bzw. Stammzellen herrührt. Eine hohe durchschnittliche Methylierung in den Tumorzellen und eine damit verbundene schlechte Prognose für die Patientin könnte ein Maß für besonders viele Stammzellen mit der Eigenschaft zur Sekundärtumor- oder Metastasenbildung oder ein Indikator für das Vorhandensein von besonders potenten Brustkrebsstammzellen sein. Ergebnisse von Degar *et al.* (2001) und Kieusseian *et al.* (2006), dass PITX2 bei der Differenzierung von hämopoetischen Stammzellen involviert ist, weisen darauf hin, dass PITX2 auch

in den Prozess der Differenzierung von Bruststammzellen beteiligt sein könnte. BMP4 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation und Differenzierung von Stammzellen (Kee *et al.* 2006, Xu *et al.* 2002 und 2005, Rajan *et al.* 2003, Qi *et al.* 2004) und verhindert die Bildung von neuen Hirntumoren aus Hirntumorstammzellen (Piccirillo *et al.* 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Methylierungsanalyse von mikrodisssezierten Zellen könnte zukünftig ein geeignetes Werkzeug zur weiteren Untersuchung dieser Fragestellung bieten, gerade wenn sie zusammen mit einer immunohistochemischen Färbung von Stammzellen (Woodward *et al.* 2005) verwendet würde. Um zukünftig zusätzlich auch die Klonalität der Tumorzellen analysieren zu können, ließe sich die hier entwickelte Technologie durch PCR Amplifikate erweitern, die sowohl *Short Tandem Repeats*, als auch CpG Positionen enthalten und im X-Chromosom gelegen sind. Durch diesen modifizierten HUMARA-Assay (Uchida *et al.* 2000) ließe sich feststellen, ob in der heterogenen Probe immer dasselbe X-Chromosom inaktiviert ist, was auf einen klonalen Ursprung der in der Probe enthaltenen Zellen schließen ließe.

6.3.3 Methylierung von Zellen der Immunabwehr

Die Tatsache, dass PITX2 Methylierung auch in den Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) gefunden wurde, wirft einen weiteren interessanten Aspekt für das Verständnis von PITX2 als Biomarker auf. Es ist naheliegend, dass eine erhöhte Infiltration des Tumors mit Lymphozyten eine bessere Prognose für die Patientin bedeuten könnte, da der Tumor eher vom Immunsystem erkannt und bekämpft wird. Eher das Gegenteil ist jedoch der Fall. Eine besonders aggressive Form des Brustkrebs ist der inflammatorische Brustkrebs, der bei ca. 1,9 % aller Brustkrebserkrankungen diagnostiziert wird aber für 8,1 % aller tödlich verlaufenden Brustkrebserkrankungen verantwortlich ist (Johnson *et al.* 2005/2006). Zwar handelt es sich hierbei nicht um eine tatsächliche Entzündungserscheinung und die Symptome stehen eher mit der Blockade von Lymphgefäßen im Zusammenhang. Diese Patientinnen zeigen folglich auch keine erhöhten proinflammatorischen Zytokinwerte im Blut (Bieche *et al.* 2004) und sind auch nicht immunhypersensitiver (Levine *et al.* 1981), allerdings tritt vermehrt die Neubildung von Lymphgefäßen auf (Kleer *et al.* 2000) und Patientinnen mit chronisch supprimiertem Immunsystem erkranken seltener an inflammatorische Brustkrebs (Anderson *et al.* 2005/2006).

Obwohl einige ältere Studien in der Tat darauf hinweisen, dass eine erhöhte Infiltration des Tumors mit TIL mit einer besseren Prognose verbunden sind (Clark *et al.* 1989, Clemente *et al.* 1996, Zhang *et al.* 2003a), zeigen doch jüngere Studien, dass nicht die Quantität, sondern vielmehr die Zusammensetzung der TIL für eine Prognose entscheidend ist. Der Tumor wird von einer sehr heterogenen Population an Immunzellen infiltriert, bestehend aus unterschiedlichen Verhältnissen von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen (Georgiannos *et al.* 2003, Vgenopoulou *et al.* 2003). Welche genaue Zusammensetzung dabei über eine gute oder schlechte Prognose Aufschluss gibt, ist nicht klar. Macchetti *et al.* (2006) zeigen, dass eine Infiltration mit CD4+ T-Zellen mit Lymphknotenmetastasen bei Brustkrebs assoziiert sind. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass diese Lymphozyten auch bei Gebärmutterhalskrebs eine schlechte Prognose zur Folge haben (Curiel *et al.* 2004). Zwei weitere Studien berichten übereinstimmend, dass die Anzahl von CD8+ T-Zellen verbunden mit einem hohen Verhältnis dieser CD8+ T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen assoziiert mit einer guten Prognose bei Eierstockkrebs, bzw. dem Ausbleiben von

Lymphknotenmetastasen bei Gebärmutterhalskrebs ist (Sato *et al.* 2005, Piersma *et al.* 2007). Sowohl eine hohe Anzahl von infiltrierenden CD8+ als auch NK-Zellen wurden als Indikatoren einer positiven Prognose bei Darm-, Pankreas und Speiseröhrenkrebs gefunden (Menon *et al.* 2004, Prall *et al.* 2004, Tachibana *et al.* 2005, Schumacher *et al.* 2001, Cho *et al.* 2003). Bates *et al.* (2006) und Peterson *et al.* (2006) zeigen ebenfalls übereinstimmend, dass die FOXP3-positive Subpopulation der regulatorischen T-Zellen Aufschluß über einen Rückfall bei Lungenkrebs und Brustkrebs liefert. Dagegen finden Grabenbauer *et al.* (2006) keinen Zusammenhang von Prognose und Infiltration dieser regulatorischen T-Zellen beim Analkarzinom.

Zu den TIL gehören Makrophagen, die sich im Tumor aus Monozyten bilden und die einen Großteil der TIL im Tumor darstellen. Die Rolle der Makrophagen in der Tumorbekämpfung bzw. Tumorprogression ist vielseitig und sehr komplex und hängt von den biologischen Umständen im Tumor ab. Auf der einen Seite können sie diverse Wachstumsfaktoren und Proteasen bilden und so dass Tumorwachstum begünstigen, auf der anderen Seite können sie das Immunsystem für eine Tumorabwehr stimulieren und den Tumor durch zytotoxische Stoffe direkt bekämpfen (Shimura *et al.* 2000, Dirkx *et al.* 2006, Forssell *et al.* 2007, Leek und Harris 2002, Lin und Pollard 2004, Hagemann *et al.* 2004).

Die in den TIL gefundene Methylierung von PITX2 könnte direkt auf das Vorhandensein von bestimmten TIL hinweisen, die die Tumorprogression entweder positiv oder negativ beeinflussen. Vielleicht ist nicht die Methylierung in den Tumorzellen selbst, sondern eher die in den TIL verantwortlich dafür, dass die PITX2 Methylierung einen Biomarker darstellt. Zwar ist bei den drei in dieser Arbeit untersuchten Brustkrebsfällen die PITX2 Methylierung in den TIL im Verhältnis zu den Tumorzellen gering, sodass eher unwahrscheinlich erscheint, dass die PITX2 Methylierung in den TIL über die Prognose entscheidet, allerdings ist dabei zu bedenken, dass nur drei Tumoren untersucht wurden und die Verhältnisse in anderen Tumoren anders liegen könnten. Eine weitere Möglichkeit wäre auch, dass die Methylierung der TIL, als auch die der Tumorzellen additiv zur prognostischen Einstufung beitragen. In diesem Fall stellt sich die Frage, warum das selbe Gen in den Tumorzellen, als auch in den TIL zur Prognose herangezogen werden kann. Möglicherweise gibt es einen biologischen Zusammenhang für die Methylierung von PITX2 in Tumorzellen und TIL. Ein biologisches Bindeglied könnte wiederum Prolaktin darstellen. Obwohl Prolaktin für die Entwicklung des normalen Immunsystems zumindest bei Tieren nicht essentiell erscheint, so hat es doch eine vielseitige Wirkung auf T-, B-, NK-Zellen und Makrophagen (Yu und Lee 2002, Velkeniers *et al.* 1998, Horseman *et al.* 1997, Bouchard *et al.* 1999). Beispielsweise fördert Prolaktin die Expression von Wachstumsfaktoren in Makrophagen, die wiederum das Wachstum des Tumors begünstigen (Malaguarnera *et al.* 2004). Auf der anderen Seite kann Prolaktin zumindest bei Mäusen die Bildung von Makrophagen begünstigen, die sich positiv auf die Bekämpfung des Tumors auswirken (Majumder *et al.* 2004). Daneben stimuliert Prolaktin NK-Zellen (Sun *et al.* 2004) und verhindert Apoptose bei T-Zellen (Krishnan *et al.* 2003, Bauernhofer *et al.* 2003, Dogusan *et al.* 2003). Dabei kann die Expression von Prolaktin in den Lymphozyten selbst stattfinden (Chavez-Rueda *et al.* 2005, Gerlo *et al.* 2005) und somit diese Stimulation autokrin regulieren. Diese Stimulation könnte aber auch parakrin durch Prolaktin aus den Tumorzellen geschehen. Andersherum könnte aber auch das von den TIL produzierte Prolaktin parakrin auf die Tumorzellen einwirken. In Kapitel 6.2 ist bereits diskutiert, dass eine erhöhte Methylierung von PITX2 in den Tumorzellen einen niedrigeren Prolaktinspiegel bewirken könnte und dadurch prometastatische Signalwege begünstigen könnte. Dies könnte durch exogenes Prolaktin aus den TIL verhindert werden. Ein solches Zusammenspiel von auto- und parakriner Regulation zwischen TIL und den Tumorzellen und damit die Beeinflussung der

Tumorprogression könnte bedeuten, dass sowohl die PITX2 Methylierung in den TIL, als auch in den Tumorzellen für eine Prognose verantwortlich ist.

In Kapitel 6.2 wurde ebenfalls bereits diskutiert, dass PITX2 unter der Kontrolle des Wnt Signalweges steht. Inzwischen wurde auf Expressionsebene gezeigt, dass der Wnt Signalweg der Tumorzellen direkt auf den Wnt Signalweg von Makrophagen einwirkt und diese zur Bildung von proinvasiven Metalloproteasen bewegen kann (Hagemann *et al.* 2004, Pukrop *et al.* 2006). Da Methylierung und Expression zusammenhängen, könnte das gleichzeitige Vorliegen von PITX2 Methylierung in TIL und den Tumorzellen auch ein Indikator für dieses Phänomen sein.

Makrophagen können durch Sekretion des Tumornekrosefaktors α (TNF α) bei Tumorzellen Apoptose induzieren und den Tumor so bekämpfen, allerdings kann der Tumornekrosefaktor α auch zu vermehrtem Wachstum der Tumorzellen führen (Khalil *et al.* 2006, Pukrop *et al.* 2006, Hagemann *et al.* 2005). Dieser Mechanismus könnte eine Schlüsselposition bei der Funktion von PITX2 als prädiktiver und prognostischer Biomarker tragen. Zum einen ist von TNF α bekannt, dass es die Prolaktinexpression stimulieren kann (Gerlo *et al.* 2006, Friedrichsen *et al.* 2006) und damit die bereits beschriebenen Wirkung von Prolaktin beeinflussen könnte, zum anderen hat TNF α auch direkten Einfluß auf die Steroidproduktion in Tumorzellen (Purohit *et al.* 2002, Bornstein *et al.* 2004) und könnte so auto- und parakrin die Tumorprogression beeinflussen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass TNF α die Expression von BMP4 in Lungenepithzellen unterdrückt (Zhu *et al.* 2007) und auch die Expression von NR5A1 reguliert (Hong *et al.* 2003). Die Methylierung von BMP4 und NR5A1 könnte damit im Zusammenhang mit TNF α stehen. BMP4 und NR5A1 konnten im Rahmen dieser Arbeit als prädiktive Biomarker bei ER positiven Brustkrebspatientinnen identifiziert werden und wirken mit PITX2 zusammen. Für die Eigenschaft von PITX2 als prädiktiver Marker für eine Anihormontherapie ist interessant, dass Makrophagen die Bildung von Resistenzen gegenüber Antihormontherapien verursachen können, indem durch inflammatorische Signale Steroidhormonrezeptoren von Repressoren zu Aktivatoren umwandeln (Zhu *et al.* 2006).

Ein weiteres Indiz, dass ein Zusammenspiel von TIL und Tumorzellen den Ausgang der Krebserkrankung maßgeblich beeinflussen könnten, liefert eine Studie von Bacac *et al.* (2006). Dort wurde die Expression in desmoiden Tumoren untersucht, die für ihre geringe Tendenz zur Metastasenbildung bekannt sind. Sie fanden, dass ein sehr großer Teil der dort differentiell methylierten Gene mit Entzündung assoziiert sind (z.B. auch TNF α). Daneben wurden die beschriebenen Proteasen uPA und diverse MMPs und Mitglieder des Wnt Signalweges, sowie PITX2 als differentiell exprimiert gefunden. Interessanterweise sprechen desmoide Tumoren gut auf eine Tamoxifenbehandlung an (Gelman 1997).

Über immunohistochemische Methoden ist es möglich, zwischen den verschiedenen Lymphozyten zu unterscheiden. Solche Methoden in Verbindung mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Methylierungsanalyse mikrodissasierter Zellen könnte zukünftig dafür verwendet werden, den Zusammenhang zwischen TIL und Tumorprogression näher zu untersuchen.

6.3.4 Auswirkung auf die Entwicklung eines prognostischen oder prädiktiven Test

Für die Entwicklung eines prognostischen oder prädiktiven Testes, bei dem die extrahierte DNA aus dem heterogenen Gesamttumor untersucht werden sollen, stellen sich zwei wesentliche Fragen:

- Spielt es eine Rolle, welcher Teil des Tumors untersucht wird oder ist die Methylierung im Tumor und dem anliegenden gesunden Gewebe homogen verteilt (Feldeffekt)?
- Welche Rolle spielt die Zusammensetzung des Tumors hinsichtlich der verschiedenen Zelltypen für den gemessenen Methylierungswert.

Die erste Frage lässt sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit nur teilweise beantworten. Es könnte zwar einen Feldeffekt geben, sodass auch an den Tumor anliegendes gesundes Gewebe eine etwas erhöhte Methylierung aufweist, allerdings ist diese Methylierung so gering, dass es natürlich entscheidend ist, an welcher Stelle der Tumor analysiert wird, bzw. wie hoch der Anteil an ebenfalls analysierten gesunden Gewebe ist. Die zweite Frage lässt sich allerdings eindeutig beantworten. Da sich die Methylierung in den verschiedenen im Tumor vorkommenden Zelltypen grundlegend unterscheidet, ist die genaue Zusammensetzung, vor allem der Gehalt an Tumorzellen entscheidend für das Analyseergebnis. Methylierung von PITX2 wurde beispielsweise nicht in Fett und Stroma gefunden, sondern nur in Tumorzellen, TIL und im geringen Maß in normalen Epithelzellen. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass gerade Stroma- und Fettzellen im Vergleich zu den Tumorzellen relativ groß sind und dadurch ihr Einfluß auf das Analyseergebnis gering ist. Eine kontaminierende Zelle, die beispielsweise den dreifachen Durchmesser aber die gleiche Kerngröße wie die interessanten Tumorzelle hat, hätte das 27-fache Volumen dieser Tumorzelle. Bei gleicher Größe der Zellkerne würde dann aus einem Dünnschnitt, der jeweils zur Hälfte aus Tumorzellen und aus diesen kontaminierenden Zellen bestünde, 96 % der DNA von den Tumorzellen stammen (im Idealfall eines unendlich dünnen Schnittes). Problematischer sind die TIL, die kleiner als Tumorzellen sind und somit einen größeren Einfluß auf das Analyseergebnis haben. Umso wichtiger ist die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass Methylierung in den TIL für PITX2 gefunden wurde, zumal dieses Ergebnis auch aus biologischer Sicht durchaus einen Einfluß auf die Prognose haben könnte. Somit ist eine weitere Analyse der TIL hinsichtlich ihrer Methylierung und ihres Einfluß auf die Prognose sinnvoll.

7 Literatur

- Adorjan P, Distler J, Lipscher E, Model F, Muller J, Pelet C, Braun A, Florl AR, Gutig D, Grabs G, Howe A, Kursar M, Lesche R, Leu E, Lewin A, Maier S, Muller V, Otto T, Scholz C, Schulz WA, Seifert HH, Schwöpe I, Ziebarth H, Berlin K, Piepenbrock C, Olek A (2002). Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 30(5):e21
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7):3983-8
- Amendt BA, Semina EV, Alward WL (2000). Rieger syndrome: a clinical, molecular, and biochemical analysis. *Cell Mol Life Sci* 57(11):1652-66
- Anderson AE, Haines TR, Robinson DP, Butcher DT, Sadikovic B, Rodenhiser DI (2001). Sodium bisulfite analysis of the methylation status of DNA from small portions of paraffin slides. *Biotechniques* 31(5):1004, 1006, 1008
- Anderson WF, Schairer C, Chen BE, Hance KW, Levine PH. Epidemiology of inflammatory breast cancer (IBC). *Breast Dis.* 2005-2006;22:9-23
- Annan RS, Kresbach GM, Giese RW, Vouros P (1989). Trace detection of modified DNA bases via moving-belt liquid chromatography-mass spectrometry using electrophoric derivatization and negative chemical ionization. *J Chromatogr* 465(2):285-96
- Arakawa H, Nakamura T, Zhadanov AB, Fidanza V, Yano T, Bullrich F, Shimizu M, Blechman J, Mazo A, Canaani E, Croce CM (1998). Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(8):4573-8
- Aubele M, Mattis A, Zitzelsberger H, Walch A, Kremer M, Hutzler P, Hofler H, Werner M (1999). Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 110(2):94-102
- Aubele MM, Cummings MC, Mattis AE, Zitzelsberger HF, Walch AK, Kremer M, Hofler H, Werner M (2000). Accumulation of chromosomal imbalances from intraductal proliferative lesions to adjacent in situ and invasive ductal breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 9(1):14-9
- Bacac M, Migliavacca E, Stehle JC, McKee T, Delorenzi M, Coindre JM, Guillou L, Stamenkovic I (2006). A gene expression signature that distinguishes desmoid tumours from nodular fasciitis. *J Pathol* 208(4):543-53
- Badia E, Duchesne MJ, Semlali A, Fuentes M, Giamarchi C, Richard-Foy H, Nicolas JC, Pons M (2000). Long-term hydroxytamoxifen treatment of an MCF-7-derived breast cancer cell line irreversibly inhibits the expression of estrogenic genes through chromatin remodeling. *Cancer Res* 60(15):4130-8
- Bae YK, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler MJ, Sukumar S, Herman JG, Gabrielson E (2004). Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(18 Pt 1):5998-6005
- Baek SH, Kioussi C, Briata P, Wang D, Nguyen HD, Ohgi KA, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rose DW, Rosenfeld MG (2003). Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6):3245-50
- Bailey AS, Jiang S, Afentoulis M, Baumann CI, Schroeder DA, Olson SB, Wong MH, Fleming WH (2004). Transplanted adult hematopoietic stem cells differentiate into functional endothelial cells. *Blood* 103(1):13-9
- Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue):W369-73
- Banaschak S, Rolf B, Brinkmann B (2000). Influence of different staining techniques on the DNA analysis of histological sections. *Int J Legal Med* 113(2):114-6
- Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin*

Oncol 24(34):5373-80

Bauernhofer T, Kuss I, Friebe-Hoffmann U, Baum AS, Dworacki G, Vonderhaar BK, Whiteside TL (2003). Role of prolactin receptor and CD25 in protection of circulating T lymphocytes from apoptosis in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 88(8):1301-9

Baugh LR, Hill AA, Brown EL, Hunter CP (2001). Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* 29(5):E29

Bell DW, Erban J, Sgroi DC, Haber DA (2002). Selective loss of heterozygosity in multiple breast cancers from a carrier of mutations in both BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res* 62(10):2741-3

Bertheau P, Plassa LF, Lerebours F, de Roquancourt A, Turpin E, Lidereau R, de The H, Janin A (2001). Allelic loss detection in inflammatory breast cancer: improvement with laser microdissection. *Lab Invest* 81(10):1397-402

Bertucci F, Houlgatte R, Benziene A, Granjeaud S, Adelaide J, Tagett R, Loriod B, Jacquemier J, Viens P, Jordan B, Birnbaum D, Nguyen C (2000). Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 9(20):2981-91

Bestor TH (1998). The host defence function of genomic methylation patterns. *Novartis Found Symp* 214:187-95

Bian YS, Yan P, Osterheld MC, Fontollet C, Benhattar J (2001). Promoter methylation analysis on microdissected paraffin-embedded tissues using bisulfite treatment and PCR-SSCP. *Biotechniques* 30(1):66-72

Bichsel VE, Liotta LA, Petricoin EF 3rd (2001). Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling. *Cancer J* 7(1):69-78

Bieche I, Lerebours F, Tozlu S, Espie M, Marty M, Lidereau R (2004). Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature. *Clin Cancer Res* 10(20):6789-95

Bielawski K, Zaczek A, Lisowska U, Dybikowska A, Kowalska A, Falkiewicz B (2001). The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. *Int J Mol Med* 8(5):573-8

Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 1986 May 15-21;321(6067):209-13.
Bocchinfuso WP, Hively WP, Couse JF, Varmus HE, Korach KS (1999). A mouse mammary tumor virus-Wnt-1 transgene induces mammary gland hyperplasia and tumorigenesis in mice lacking estrogen receptor-alpha. *Cancer Res* 59(8):1869-76

Bocchinfuso WP, Korach KS (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2(4):323-34

Bonin S, Petrera F, Niccolini B, Stanta G (2003). PCR analysis in archival postmortem tissues. *Mol Pathol* 56(3):184-6

Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7):730-7

Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I (2004). Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215(1-2):135-41

Borst A, Box AT, Fluit AC (2004). False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23(4):289-99

Bouchard B, Ormandy CJ, Di Santo JP, Kelly PA (1999). Immune system development and function in prolactin receptor-deficient mice. *J Immunol* 163(2):576-82

Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH (2003). A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 63(8):1727-30

- Brakensiek K, Wingen LU, Langer F, Kreipe H, Lehmann U (2007). Quantitative high-resolution CpG island mapping with Pyrosequencing reveals disease-specific methylation patterns of the CDKN2B gene in myelodysplastic syndrome and myeloid leukemia. *Clin Chem* 53(1):17-23
- Brennan KR, Brown AM (2004). Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9(2):119-31
- Burton MP, Schneider BG, Brown R, Escamilla-Ponce N, Gulley ML (1998). Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 24(1):86-92
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringhurst FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425(6960):841-6
- Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA (2003). Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med* 9(12):1520-7
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D (1997). Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 17(4):439-44.
- Cavalli LR, Singh B, Isaacs C, Dickson RB, Haddad BR (2004). Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/2 carriers with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 149(1):38-43
- Chang HG, Kim SJ, Chung KW, Noh DY, Kwon Y, Lee ES, Kang HS (2005). Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha gene. *J Mol Med* 83(2):132-9
- Chang SC, Tucker T, Thorogood NP, Brown CJ (2006). Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Front Biosci* 11:852-66
- Charafe-Jauffret E, Moulin JF, Ginestier C, Bechlian D, Conte N, Geneix J, Adelaide J, Noguchi T, Hassoun J, Jacquemier J, Birnbaum D (2002). Loss of heterozygosity at microsatellite markers from region p11-21 of chromosome 8 in microdissected breast tumor but not in peritumoral cells. *Int J Oncol* 21(5):989-96
- Charles MA, Suh H, Hjalt TA, Drouin J, Camper SA, Gage PJ (2005). PITX genes are required for cell survival and Lhx3 activation. *Mol Endocrinol* 19(7):1893-903
- Chavez-Rueda K, Hernandez J, Zenteno E, Leanos-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F (2005). Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol* 116(2):182-91
- Chen CM, Chen HL, Hsiao TH, Hsiao AH, Shi H, Brock GJ, Wei SH, Caldwell CW, Yan PS, Huang TH (2003). Methylation target array for rapid analysis of CpG island hypermethylation in multiple tissue genomes. *Am J Pathol* 163(1):37-45
- Chen ST, Lin SY, Yeh KT, Kuo SJ, Chan WL, Chu YP, Chang JG (2004). Mutational, epigenetic and expressional analyses of caveolin-1 gene in breast cancers. *Int J Mol Med* 14(4):577-82
- Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, Hida Y, Oshikiri T, Kurokawa T, Suzuoki M, Nakakubo Y, Hiraoka K, Murakami S, Shinohara T, Itoh T, Okushiba S, Kondo S, Katoh H (2003). CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 63(7):1555-9
- Chow LW, Zhu L, Loo WT, Lui EL (2005). Aberrant methylation of cyclooxygenase-2 in breast cancer patients. *Biomed Pharmacother* 59 Suppl 2:S264-7
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22(15):2990-7

- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81(24):1893-904
- Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77(7):1303-10
- Clevenger CV, Chang WP, Ngo W, Pasha TL, Montone KT, Tomaszewski JE (1995). Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am J Pathol* 146(3):695-705
- Clevenger CV (2003). Role of prolactin/prolactin receptor signaling in human breast cancer. *Breast Dis* 18:75-86
- Clevers H (2002). Inflating cell numbers by Wnt. *Mol Cell* 10(6):1260-1
- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP, Krahe R (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 35(1):146-50
- Costello JF, Plass C (2001). Methylation matters. *J Med Genet* 38(5):285-303.
- Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, Mooney SH, Kluth A, Olek A, Schwoppe I, Tetzner R, Ziebarth H, Berlin K (2004). A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res* 32(1):e10
- Cottrell SE, Laird PW (2003). Sensitive detection of DNA methylation. *Ann N Y Acad Sci* 983:120-30
- Couch FJ, Hartmann LC (1998). BRCA1 testing--advances and retreats. *JAMA* 279(12):955-7
- Cox CJ, Espinoza HM, McWilliams B, Chappell K, Morton L, Hjalt TA, Semina EV, Amendt BA (2002). Differential regulation of gene expression by PITX2 isoforms. *J Biol Chem* 277(28):25001-10
- Cox, DR (1972). Regression models and life tables. *J Roy Statist Soc B* 34(2): 187-220
- Craven RA, Totty N, Harnden P, Selby PJ, Banks RE (2002). Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations. *Am J Pathol* 160(3):815-22
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW (2005). Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 23(7):1420-30
- Cui J, Rohr LR, Swanson G, Speights VO, Maxwell T, Brothman AR (2001). Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate* 46(3):249-56
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10(9):942-9.
- Cushman LJ, Showalter AD, Rhodes SJ (2002). Genetic defects in the development and function of the anterior pituitary gland. *Ann Med* 34(3):179-91
- Daigo Y, Chin SF, Goringe KL, Bobrow LG, Ponder BA, Pharoah PD, Caldas C (2001). Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction-based array comparative genomic hybridization for extensive amplicon profiling of breast cancers : a new approach for the molecular analysis of paraffin-embedded cancer tissue. *Am J Pathol* 158(5):1623-31
- de Jong MM, Nolte IM, te Meerman GJ, van der Graaf WT, Oosterwijk JC, Kleibeuker JH, Schaapveld M, de Vries EG (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 39(4):225-42

- Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun Z, Zong Q, Du Y, Du J, Driscoll M, Song W, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS (2002). Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(8):5261-6
- Dean W, Lucifero D, Santos F (2005). DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75(2):98-111
- Degar BA, Baskaran N, Hulspas R, Quesenberry PJ, Weissman SM, Forget BG (2001). The homeodomain gene *Pitx2* is expressed in primitive hematopoietic stem/progenitor cells but not in their differentiated progeny. *Exp Hematol* 29(7):894-902
- Di Vinci A, Perdelli L, Banelli B, Salvi S, Casciano I, Gelvi I, Allemanni G, Margallo E, Gatteschi B, Romani M (2005). p16(INK4a) promoter methylation and protein expression in breast fibroadenoma and carcinoma. *Int J Cancer* 114(3):414-21
- Dietrich D, Schatz P, Schuster M, Kluth A (2005). Method for Analysis of Cytosine Methylation. Patent WO2005093095
- Dirx AE, Oude Egbrink MG, Wagstaff J, Griffioen AW (2006). Monocyte/macrophage infiltration in tumors: modulators of angiogenesis. *J Leukoc Biol* 80(6):1183-96
- Dogusan Z, Martens N, Stinissen P, Hellings N, Demotte N, Hooghe R, Hooghe-Peters E (2003). Effects of prolactin on cloned human T-lymphocytes. *Endocrine* 20(1-2):171-6
- Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, Chacon I, Sanchez R, Carballido J, Colas A, Espana P, Bonilla F (2003). Prevalence of aberrant methylation of p14ARF over p16INK4a in some human primary tumors. *Mutat Res* 530(1-2):9-17
- Duffy MJ (2004). The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des* 10(1):39-49
- Duffy MJ (2002). Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem* 48(8):1194-7
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28(8):E32
- Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R, Howe K, Jackson DK, Kunde J, Koenig C, Liddle J, Niblett D, Otto T, Pettett R, Seemann S, Thompson C, West T, Rogers J, Olek A, Berlin K, Beck S (2006). DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 38(12):1378-85
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429(6990):457-63
- Eglitis MA, Mezey E (1997). Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8):4080-5
- Ehrig T, Abdulkadir SA, Dintzis SM, Milbrandt J, Watson MA (2001). Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection. *J Mol Diagn* 3(1):22-5
- Eick D, Fritz HJ, Doerfler W (1983). Quantitative determination of 5-methylcytosine in DNA by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 135(1):165-71
- El-Maarri O, Herbiniaux U, Walter J, Oldenburg J (2002). A rapid, quantitative, non-radioactive bisulfite-SNuPE-IP RP HPLC assay for methylation analysis at specific CpG sites. *Nucleic Acids Res* 30(6):e25
- Elkahloun AG, Gaudet J, Robinson GS, Sgroi DC (2002). In situ gene expression analysis of cancer using laser capture microdissection, microarrays and real time quantitative PCR. *Cancer Biol Ther* 1(4):354-8
- Elmore SW, Pratt JK, Coghlan MJ, Mao Y, Green BE, Anderson DD, Stashko MA, Lin CW, Falls D, Nakane

- M, Miller L, Tyree CM, Miner JN, Lane B (2004). Differentiation of in vitro transcriptional repression and activation profiles of selective glucocorticoid modulators. *Bioorg Med Chem Lett* 14(7):1721-7
- Elston CW, Ellis IO (1991). 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(5):403-10
- Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996). Laser capture microdissection. *Science* 274(5289):998-1001
- Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidus A, Garrett E, Argani P, Sukumar S (2004). Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 64(13):4442-52
- Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C, Vertino PM (2003). Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(21):12253-8
- Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M (2005). Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 65(4):1141-5
- Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R (1988). Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J Clin Oncol* 6(7):1076-87
- Foekens JA, Rio MC, Seguin P, van Putten WL, Fauque J, Nap M, Klijn JG, Chambon P (1990b). Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 50(13):3832-7
- Foekens JA, van Putten WL, Portengen H, Rodenburg CJ, Reubi JC, Berns PM, Henzen-Logmans SC, van der Burg ME, Alexieva-Figusch J, Klijn JG (1990a). Prognostic value of pS2 protein and receptors for epidermal growth factor (EGF-R), insulin-like growth factor-1 (IGF-1-R) and somatostatin (SS-R) in patients with breast and ovarian cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(6):815-21
- Foekens JA, Harbeck N, König T, Maier S, Martens JWM, Model F, Nimmrich I, Rujan T, Schmitt M, Lesche R, Dietrich D, Müller V, Kluth A, Schwöpe I, Hartmann O, Höfler H (2005). Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. Patent EP1561821
- Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, Tanguay S, Lapointe R (2007). The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer* 96(4):646-53
- Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R (2007). High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 13(5):1472-9
- Fraga MF, Esteller M (2002). DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* 33(3):632, 634, 636-49
- Fraga MF, Rodriguez R, Canal MJ (2000). Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21(14):2990-4
- Frank TS, Critchfield GC (2002). Hereditary risk of women's cancers. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 16(5):703-13
- Friedrichsen S, Harper CV, Semprini S, Wilding M, Adamson AD, Spiller DG, Nelson G, Mullins JJ, White MR, Davis JR (2006). Tumor necrosis factor-alpha activates the human prolactin gene promoter via nuclear factor-kappaB signaling. *Endocrinology* 147(2):773-81
- Friso S, Choi SW, Dolnikowski GG, Selhub J (2002). A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 74(17):4526-31
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands.

Proc Natl Acad Sci U S A 89(5):1827-31

Fu SW, Schwartz A, Stevenson H, Pinzone JJ, Davenport GJ, Orenstein JM, Gutierrez P, Simmens SJ, Abraham J, Poola I, Stephan DA, Berg PE (2003). Correlation of expression of BP1, a homeobox gene, with estrogen receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 5(4):R82-7

Fuchs E, Segre JA (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100(1):143-55

Fukuzawa R, Breslow NE, Morison IM, Dwyer P, Kusafuka T, Kobayashi Y, Becroft DM, Beckwith JB, Perlman EJ, Reeve AE (2004). Epigenetic differences between Wilms' tumours in white and east-Asian children. *Lancet* 363(9407):446-51

Fuller AP, Palmer-Toy D, Erlander MG, Sgroi DC (2003). Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8(3):335-45

Gage FH (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287(5457):1433-8

Gage PJ, Suh H, Camper SA (1999). Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs. *Development* 126(20):4643-51

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* 64(19):7011-21

Garcia JM, Silva J, Pena C, Garcia V, Rodriguez R, Cruz MA, Cantos B, Provencio M, Espana P, Bonilla F (2004). Promoter methylation of the PTEN gene is a common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 41(2):117-24

Garcia SB, Park HS, Novelli M, Wright NA (1999). Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. *J Pathol* 187(1):61-81

Ge H, Gong X, Tang CK (2002). Evidence of high incidence of EGFRvIII expression and coexpression with EGFR in human invasive breast cancer by laser capture microdissection and immunohistochemical analysis. *Int J Cancer* 98(3):357-61

Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, Andreesen R, Mackensen A, Rehli M (2006). Rapid and sensitive detection of CpG-methylation using methyl-binding (MB)-PCR. *Nucleic Acids Res* 34(11):e82

Gebhard C, Schwarzfischer L, Pham TH, Schilling E, Klug M, Andreesen R, Rehli M (2006a). Genome-wide profiling of CpG methylation identifies novel targets of aberrant hypermethylation in myeloid leukemia. *Cancer Res* 66(12):6118-28

GEKID (2006). Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI

Gelmann EP (1997). Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* 24(1 Suppl 1):S1-65-S1-70

Georgiannos SN, Renaut A, Goode AW, Sheaff M (2003). The immunophenotype and activation status of the lymphocytic infiltrate in human breast cancers, the role of the major histocompatibility complex in cell-mediated immune mechanisms, and their association with prognostic indicators. *Surgery* 134(5):827-34

Gerlo S, Verdood P, Hooghe-Peters EL, Kooijman R (2005). Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines. *J Neuroimmunol* 162(1-2):190-3

Gerlo S, Verdood P, Kooijman R (2006). Tumor necrosis factor-alpha activates the extrapituitary PRL promoter in myeloid leukemic cells. *J Neuroimmunol* 172(1-2):206-10

Giersiepen K., Heitmann C., Janhsen K., Lange C (2005). Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25 Brustkrebs, Robert Koch-Institut, Ausgabe 30

Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I (2004). The detection of circulating breast cancer cells in blood.

J Clin Pathol 57(9):903-11

Glockner S, Lehmann U, Wilke N, Kleeberger W, Langer F, Kreipe H (2000). Detection of gene amplification in intraductal and infiltrating breast cancer by laser-assisted microdissection and quantitative real-time PCR. *Pathobiology* 68(4-5):173-9

Gonzalzo ML, Jones PA (1997). Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res* 25(12):2529-31

Gotzsche PC, Nielsen M (2006). Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD001877

Grabenbauer GG, Lahmer G, Distel L, Niedobitek G (2006). Tumor-infiltrating cytotoxic T cells but not regulatory T cells predict outcome in anal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12(11 Pt 1):3355-60

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA (2000). Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50(1):7-33

Greenspan EJ, Jablonski MA, Rajan TV, Levine J, Belinsky GS, Rosenberg DW (2006). Epigenetic alterations in RASSF1A in human aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* 27(7):1316-22

Grimm SL, Seagroves TN, Kabotyanski EB, Hovey RC, Vonderhaar BK, Lydon JP, Miyoshi K, Hennighausen L, Ormandy CJ, Lee AV, Stull MA, Wood TL, Rosen JM (2002). Disruption of steroid and prolactin receptor patterning in the mammary gland correlates with a block in lobuloalveolar development. *Mol Endocrinol* 16(12):2675-91

Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A (2001). Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 29(13):E65-5

Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, Baker J, Walker M, Watson D, Hackett J, Blick NT, Greenberg D, Fehrenbacher L, Langholz B, Quesenberry CP (2006). A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res* 8(3):R25

Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C (2004). Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25(8):1543-9

Hagemann T, Wilson J, Kulbe H, Li NF, Leinster DA, Charles K, Klemm F, Pukrop T, Binder C, Balkwill FR (2005). Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK. *J Immunol* 175(2):1197-205

Han W, Cauchi S, Herman JG, Spivack SD (2006). DNA methylation mapping by tag-modified bisulfite genomic sequencing. *Anal Biochem* 355(1):50-61

Hanson JA, Gillespie JW, Grover A, Tangrea MA, Chuaqui RF, Emmert-Buck MR, Tangrea JA, Libutti SK, Linehan WM, Woodson KG (2006). Gene promoter methylation in prostate tumor-associated stromal cells. *J Natl Cancer Inst* 98(4):255-61

Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann MW, Bender HG (2004). Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *Eur J Endocrinol* 150(3):243-55

Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M (2004a). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb Haemost* 91(3):450-6

Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Jänicke F, Thomassen C, Look MP, Foekens JA (2004). Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer. *Clin Breast Cancer* 5(5):348-52

Harbeck N, I. Bohlmann, J. S. Ross, R. Gruetzmann, G. Kristiansen, A. Margossian, A. Hartmann, T. Cufer, A. Paradiso, S. Maier (2005). Multicenter study validates PITX2 DNA methylation for risk prediction in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer using paraffin-embedded tumor tissue. ASCO Annual

Meeting Proceedings. *J Clin Oncol*. 23(16S): 505

Harbeck N, Schmitt M, Kates RE, Kiechle M, Zemzoum I, Jänicke F, Thomssen C (2002). Clinical utility of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 determination in primary breast cancer tissue for individualized therapy concepts. *Clin Breast Cancer* 3(3):196-200

Harrell, FE Jr, Califf, RM, Pryor, DB, Lee, KL and RA Rosati (1982). Evaluating the yield of medical tests. *JAMA* 247(18):2543-6

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999). Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17(5):1474-81

Hayes AJ, Huang WQ, Yu J, Maisonpierre PC, Liu A, Kern FG, Lippman ME, McLeskey SW, Li LY (2000). Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer. *Br J Cancer* 83(9):1154-60

Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H Jr, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ (1996). Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 88(20):1456-66

Heagerty PJ, Zheng Y (2003). Survival Model Predictive Accuracy and ROC Curves. *Harvard University Biostatistics Working Paper Series*. Paper 219

Henrique R, Jeronimo C, Teixeira MR, Hoque MO, Carvalho AL, Pais I, Ribeiro FR, Oliveira J, Lopes C, Sidransky D (2006). Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis. *Mol Cancer Res* 4(1):1-8

Hens JR, Dann P, Zhang JP, Harris S, Robinson GW, Wysolmerski J (2007). BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development* 134(6):1221-30

Herzog EL, Chai L, Krause DS (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102(10):3483-93

Hoang MP, Maitra A, Gazdar AF, Albores-Saavedra J (2001). Primary mammary small-cell carcinoma: a molecular analysis of 2 cases. *Hum Pathol* 32(7):753-7

Hogeveen KN, Talikka M, Hammond GL (2001). Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)n repeat element within an Alu sequence. *J Biol Chem* 276(39):36383-90

Holliday R, Pugh JE (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187(4173):226-32

Holmberg J, Liu CY, Hjalt TA (2004). PITX2 gain-of-function in Rieger syndrome eye model. *Am J Pathol* 165(5):1633-41

Holmqvist P, Lundstrom M, Stal O (1999). Apoptosis and Bcl-2 expression in relation to age, tumor characteristics and prognosis in breast cancer. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Int J Biol Markers* 14(2):84-91

Hong CY, Park JH, Seo KH, Kim JM, Im SY, Lee JW, Choi HS, Lee K (2003). Expression of MIS in the testis is downregulated by tumor necrosis factor alpha through the negative regulation of SF-1 transactivation by NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 23(17):6000-12

Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, Wood T, Jeronimo C, Rosenbaum E, Stern J, Yu M, Trink B, Kiviat NB, Sidransky D (2006). Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol* 24(26):4262-9

Horowitz N, Pinto K, Mutch DG, Herzog TJ, Rader JS, Gibb R, Bocker-Edmonston T, Goodfellow PJ (2002). Microsatellite instability, MLH1 promoter methylation, and loss of mismatch repair in endometrial cancer and concomitant atypical hyperplasia. *Gynecol Oncol* 86(1):62-8

Horseman ND, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E,

- Dorshkind K (1997). Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J* 16(23):6926-35
- Horseman ND (1999). Prolactin and mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4(1):79-88
- Hovey RC, Trott JF, Ginsburg E, Goldhar A, Sasaki MM, Fountain SJ, Sundararajan K, Vonderhaar BK (2001). Transcriptional and spatiotemporal regulation of prolactin receptor mRNA and cooperativity with progesterone receptor function during ductal branch growth in the mammary gland. *Dev Dyn* 222(2):192-205
- Hu M, Yao J, Cai L, Bachman KE, van den Brule F, Velculescu V, Polyak K (2005). Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet* 37(8):899-905
- Hu XC, Loo WT, Chow LW (2002). E-cadherin promoter methylation can regulate its expression in invasive ductal breast cancer tissue in Chinese woman. *Life Sci* 71(12):1397-404
- Huang TH, Perry MR, Laux DE (1999). Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet* 8(3):459-70
- Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JF, Sutherland RL (2000). INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. *Clin Cancer Res* 6(7):2777-87
- Ilyas M (2005). Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol* 205(2):130-44.
- Inadome Y, Noguchi M (2003). Selection of higher molecular weight genomic DNA for molecular diagnosis from formalin-fixed material. *Diagn Mol Pathol* 12(4):231-6
- Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL (1994). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 8(19):2302-12
- Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM (2004). Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103(5):1635-40
- Jackisch C (2006). HER-2-positive metastatic breast cancer: optimizing trastuzumab-based therapy. *Oncologist* 11 Suppl 1:34-41
- Jackson KA, Mi T, Goodell MA (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25):14482-6.
- Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P, Chambon P (1984). Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res* 12(6):2861-78
- Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, German NO Study Group (2001). Randomized adjuvant chemotherapy trial in high-risk, lymph node-negative breast cancer patients identified by urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1. *J Natl Cancer Inst* 93(12):913-20
- Jiang WG, Sampson J, Martin TA, Lee-Jones L, Watkins G, Douglas-Jones A, Mokbel K, Mansel RE (2005). Tuberin and hamartin are aberrantly expressed and linked to clinical outcome in human breast cancer: the role of promoter methylation of TSC genes. *Eur J Cancer* 41(11):1628-36
- Johnson GO, Kirschenbaum M, Mason G, Rush LR (2005-2006). The patient advocate view. *Breast Dis* 22:3-8
- Jones AV, Kreil S, Zoi K, Waghorn K, Curtis C, Zhang L, Score J, Seear R, Chase AJ, Grand FH, White H, Zoi C, Loukopoulos D, Terpos E, Vervessou EC, Schultheis B, Emig M, Ernst T, Lengfelder E, Hehlmann R, Hochhaus A, Oscier D, Silver RT, Reiter A, Cross NC (2005). Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 106(6):2162-8

- Jones C, Foschini MP, Chaggar R, Lu YJ, Wells D, Shipley JM, Eusebi V, Lakhani SR (2000). Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast. *Lab Invest* 80(6):831-6
- Jones PA, Baylin SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3(6):415-28
- Jones PA, Laird PW (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21(2):163-7
- Kallioniemi OP, Hietanen T, Mattila J, Lehtinen M, Lauslahti K, Koivula T (1987). Aneuploid DNA content and high S-phase fraction of tumour cells are related to poor prognosis in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23(3):277-82
- Kaplan EL, Meier P (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Ass* 53 (282): 457-81
- Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA (2006). Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 15(6):831-7
- Kerjean A, Vieillefond A, Thiounn N, Sibony M, Jeanpierre M, Jouannet P (2001). Bisulfite genomic sequencing of microdissected cells. *Nucleic Acids Res* 29(21):E106-6
- Khalil AA, Hall JC, Aziz FA, Price P (2006). Tumour necrosis factor: implications for surgical patients. *ANZ J Surg* 76(11):1010-6
- Kieusseian A, Chagraoui J, Kerdudo C, Mangeot PE, Gage PJ, Navarro N, Izac B, Uzan G, Forget BG, Dubart-Kupperschmitt A (2006). Expression of Pitx2 in stromal cells is required for normal hematopoiesis. *Blood* 107(2):492-500
- Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J, Waldman T (2002). Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 62(10):2744-8
- Kioussi C, Briata P, Baek SH, Rose DW, Hamblet NS, Herman T, Ohgi KA, Lin C, Gleiberman A, Wang J, Brault V, Ruiz-Lozano P, Nguyen HD, Kemler R, Glass CK, Wynshaw-Boris A, Rosenfeld MG (2002). Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development. *Cell* 111(5):673-85
- Kitazawa S, Kitazawa R, Maeda S (1999). Transcriptional regulation of rat cyclin D1 gene by CpG methylation status in promoter region. *J Biol Chem* 274(40):28787-93
- Kleer CG, van Golen KL, Merajver SD (2000). Molecular biology of breast cancer metastasis. Inflammatory breast cancer: clinical syndrome and molecular determinants. *Breast Cancer Res* 2(6):423-9
- Klopocki E, Kristiansen G, Wild PJ, Klamann I, Castanos-Velez E, Singer G, Stohr R, Simon R, Sauter G, Leibiger H, Essers L, Weber B, Hermann K, Rosenthal A, Hartmann A, Dahl E (2004). Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors. *Int J Oncol* 25(3):641-9
- Kluth A, Schmitt A, Habighorst D, Schuster M, Schwöpe I, Guetig D (2005). Method for the quantification of methylated DNA. Patent CA2559426
- Knudson AG Jr (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (4):820-3
- Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S (2004). Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 279(39): 40255-8
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105(3):369-77
- Krishnan N, Thellin O, Buckley DJ, Horseman ND, Buckley AR (2003). Prolactin suppresses glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis in vivo. *Endocrinology* 144(5):2102-10

- Krop IE, Sgroi D, Porter DA, Lunetta KL, LeVangie R, Seth P, Kaelin CM, Rhei E, Bosenberg M, Schnitt S, Marks JR, Pagon Z, Belina D, Razumovic J, Polyak K (2001). HIN-1, a putative cytokine highly expressed in normal but not cancerous mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9796-801
- Kuijper A, Buerger H, Simon R, Schaefer KL, Croonen A, Boecker W, van der Wall E, van Diest PJ (2002). Analysis of the progression of fibroepithelial tumours of the breast by PCR-based clonality assay. *J Pathol* 197(5):575-81
- Kurose K, Hoshaw-Woodard S, Adeyinka A, Lemeshow S, Watson PH, Eng C (2001). Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions. *Hum Mol Genet* 10(18):1907-13
- Kuykendall JR, Bogdanffy MS (1992). Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutat Res* 283(2):131-6
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6(11):1229-34
- Laird PW (2003). The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 3(4):253-66
- Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, Parl FF, Smith HS, Weitzman SA, Baylin SB, Issa JP, Davidson NE (1996). Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res* 2(5):805-10
- Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE (1998). The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3(1):85-94
- Lee KL, Harrell FE Jr, Tolley HD, Rosati RA (1983). A comparison of test statistics for assessing the effects of concomitant variables in survival analysis. *Biometrics* 39(2): 341-50
- Leek RD, Harris AL (2002). Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(2):177-89
- Lehmann U, Glockner S, Kleeberger W, von Wasielewski HF, Kreipe H (2000). Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 156(6):1855-64
- Lehmann U, Langer F, Feist H, Glockner S, Hasemeier B, Kreipe H (2002). Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development. *Am J Pathol* 160(2):605-12
- Lesche R, Fassbender A, Juenemann K, Foekens JA, Martens JWM (2006). Epigenetic Methods and nucleic acids for the detection of breast cell proliferative disorders. Patent WO2006008128
- Leu YW, Yan PS, Fan M, Jin VX, Liu JC, Curran EM, Welshons WV, Wei SH, Davuluri RV, Plass C, Nephew KP, Huang TH (2004). Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res* 64(22):8184-92
- Levine PH, Murali N, Tabbane F, Loon J, Terasaki P, Tsang P, Bekesi JG (1981). Studies on the role of cellular immunity and genetics in the etiology of rapidly progressing breast cancer in Tunisia. *Int J Cancer* 27(5):611-5
- Lewin J, Schmitt AO, Adorjan P, Hildmann T, Piepenbrock C (2004). Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics* 20(17):3005-12
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366(6453):362-5
- Li L, Xie T (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:605-31
- Li Q, Kopecky KJ, Mohan A, Willman CL, Appelbaum FR, Weick JK, Issa JP (1999). Estrogen receptor methylation is associated with improved survival in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 5(5):1077-

84

- Li T, Sotgia F, Vuolo MA, Li M, Yang WC, Pestell RG, Sparano JA, Lisanti MP (2006). Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status. *Am J Pathol* 168 (6):1998-2013
- Lin CR, Kioussi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG (1999). Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 401(6750):279-82
- Lin EY, Pollard JW (2004). Macrophages: modulators of breast cancer progression. *Novartis Found Symp* 256:158-68; discussion 168-72, 259-69
- Liu W, Selever J, Lu MF, Martin JF (2003). Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development* 130(25):6375-85
- Lo PK, Mehrotra J, D'Costa A, Fackler MJ, Garrett-Mayer E, Argani P, Sukumar S (2006). Epigenetic suppression of secreted frizzled related protein 1 (SFRP1) expression in human breast cancer. *Cancer Biol Ther* 5(3):281-6
- Lo YM, Wong IH, Zhang J, Tein MS, Ng MH, Hjelm NM (1999). Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 59(16):3899-903
- Locker GY (1998). Hormonal therapy of breast cancer. *Cancer Treat Rev* 24(3):221-40
- Lodygin D, Diebold J, Hermeking H (2004). Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression. *Oncogene* 23(56):9034-41
- Longo MC, Berninger MS, Hartley JL (1990). Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93(1):125-8
- Look MP, van Putten WL, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Ferno M, Eppenberger-Castori S, Sweep CG, Ulm K, Peyrat JP, Martin PM, Magdelenat H, Brunner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl PO, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broet P, Romain S, Daxenbichler G, Windbichler G, Cufer T, Borstnar S, Kueng W, Beex LV, Klijn JG, O'Higgins N, Eppenberger U, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA (2002). Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 94(2):116-28
- Lopez-Beltran A, MacLennan GT, Montironi R (2006). Cyclin E as molecular marker in the management of breast cancer: a review. *Anal Quant Cytol Histol* 28(2):111-4
- Lotem J, Sachs L (2006). Epigenetics and the plasticity of differentiation in normal and cancer stem cells. *Oncogene* 25(59):7663-72
- Luzzi V, Mahadevappa M, Raja R, Warrington JA, Watson MA (2003). Accurate and reproducible gene expression profiles from laser capture microdissection, transcript amplification, and high density oligonucleotide microarray analysis. *J Mol Diagn* 5(1):9-14
- Lyle R, Watanabe D, te Vruchte D, Lerchner W, Smrzka OW, Wutz A, Schageman J, Hahner L, Davies C, Barlow DP (2000). The imprinted antisense RNA at the Igf2r locus overlaps but does not imprint Mas1. *Nat Genet* 25(1):19-21
- Ma XJ, Salunga R, Tuggle JT, Gaudet J, Enright E, McQuary P, Payette T, Pistone M, Stecker K, Zhang BM, Zhou YX, Varnholt H, Smith B, Gadd M, Chatfield E, Kessler J, Baer TM, Erlander MG, Sgroi DC (2003). Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10):5974-9
- Macchetti AH, Marana HR, Silva JS, de Andrade JM, Ribeiro-Silva A, Bighetti S (2006). Tumor-infiltrating CD4+ T lymphocytes in early breast cancer reflect lymph node involvement. *Clinics* 61(3):203-8

- Maier S, Dahlstroem C, Haefliger C, Plum A, Piepenbrock C (2005). Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response. *Am J Pharmacogenomics* 5(4):223-32
- Maier S, Nimmrich I, Marx A, Eppenberger-Castori S, Jaenicke F, Paradiso A, Spyratos F, Foekens J, Schmitt M, Harbeck N (2004). DNA methylation profile predicts risk of recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients. ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). *J Clin Oncol.* 22 (14S):525
- Maier S, Lesche R, Nimmrich I, Eckhardt F, Dahlstroem C, Plum A (2005b). DNA methylation markers - an opportunity to further individualize therapy in breast cancer? *Personalized Medicine* 2: 339-47
- Majumder B, Biswas R, Chattopadhyay U (2002). Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *Int J Cancer* 97(4):493-500
- Malaguarnera L, Imbesi RM, Scuto A, D'Amico F, Licata F, Messina A, Sanfilippo S (2004). Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages. *J Cell Biochem* 93(1): 197-206
- Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B (2000). The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2):139-63
- Marchbank T, Westley BR, May FE, Calnan DP, Playford RJ (1998). Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects. *J Pathol* 185(2):153-8
- Marcil A, Dumontier E, Chamberland M, Camper SA, Drouin J (2003). Pitx1 and Pitx2 are required for development of hindlimb buds. *Development* 130(1):45-55
- Martens JW, Nimmrich I, Koenig T, Look MP, Harbeck N, Model F, Kluth A, Bolt-de Vries J, Sieuwerts AM, Portengen H, Meijer-Van Gelder ME, Piepenbrock C, Olek A, Hofler H, Kiechle M, Klijn JG, Schmitt M, Maier S, Foekens JA (2005). Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer. *Cancer Res* 65(10):4101-17
- Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R (1995). Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene* 157(1-2):261-4
- Martin V, Ribieras S, Song-Wang XG, Lasne Y, Frappart L, Rio MC, Dante R (1997). Involvement of DNA methylation in the control of the expression of an estrogen-induced breast-cancer-associated protein (pS2) in human breast cancers. *J Cell Biochem* 65(1):95-106
- Martin-Rendon E, Watt SM (2003). Stem cell plasticity. *Br J Haematol* 122(6):877-91
- McMahon C, Suthiphongchai T, DiRenzo J, Ewen ME (1999). P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(10):5382-7
- McNeil C (1998). Herceptin raises its sights beyond advanced breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 90(12):882-3
- Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ (2004). Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest* 84(4):493-501
- Millar DS, Paul CL, Molloy PL, Clark SJ (2002). A distinct sequence (ATAAA)_n separates methylated and unmethylated domains at the 5'-end of the GSTP1 CpG island. *J Biol Chem.* 2000 Aug 11;275(32):24893-9
- Millar DS, Warnecke PM, Melki JR, Clark SJ. Methylation sequencing from limiting DNA: embryonic, fixed, and microdissected cells. *Methods* 27(2):108-13
- Mimori K, Kataoka A, Yoshinaga K, Ohta M, Sagara Y, Yoshikawa Y, Ohno S, Barnard GF, Mori M (2005). Identification of molecular markers for metastasis-related genes in primary breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 22(1):59-67
- Mirza AN, Mirza NQ, Vlastos G, Singletary SE (2002). Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years. *Ann Surg* 235(1):10-26

- Mohri T, Fujio Y, Maeda M, Ito T, Iwakura T, Oshima Y, Uozumi Y, Segawa M, Yamamoto H, Kishimoto T, Azuma J (2006). Leukemia inhibitory factor induces endothelial differentiation in cardiac stem cells. *J Biol Chem* 281(10):6442-7.
- Monte D, DeWitte F, Hum DW (1998). Regulation of the human P450scc gene by steroidogenic factor 1 is mediated by CBP/p300. *J Biol Chem* 273(8):4585-91
- Mullen RD, Colvin SC, Hunter CS, Savage JJ, Walvoord EC, Bhangoo AP, Ten S, Weigel J, Pfaffle RW, Rhodes SJ (2007). Roles of the LHX3 and LHX4 LIM-homeodomain factors in pituitary development. *Mol Cell Endocrinol* 265-266:190-5
- Müller HM, Fiegl H, Widschwendter A, Widschwendter M (2004). Prognostic DNA methylation marker in serum of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 1022:44-9
- Murphy N, Millar E, Lee CS (2005). Gene expression profiling in breast cancer: towards individualising patient management. *Pathology* 37(4):271-7
- Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, Klos KS, Li P, Monia BP, Nguyen NT, Hortobagyi GN, Hung MC, Yu D (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6(2):117-27
- Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, De Marzo AM (2003). Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol* 163(3):923-33.
- Nicholson S, Wright C, Sainsbury JR, Halcrow P, Kelly P, Angus B, Farndon JR, Harris AL (1990). Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37(6):811-4
- Nouhi Z, Chughtai N, Hartley S, Cocolakis E, Lebrun JJ, Ali S (2006). Defining the role of prolactin as an invasion suppressor hormone in breast cancer cells. *Cancer Res* 66(3):1824-32
- Nunez AM, Berry M, Imler JL, Chambon P (1989). The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J* 8(3):823-9
- Nuovo GJ (2004). Methylation-specific PCR in situ hybridization. *Methods Mol Biol* 287:261-72
- Oakeley EJ (1999). DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol Ther* 84(3):389-400
- Oesterreich S, Allred DC, Mohsin SK, Zhang Q, Wong H, Lee AV, Osborne CK, O'Connell P (2001). High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer. *Br J Cancer* 84(4):493-8
- Okuducu AF, Janzen V, Hahne JC, Ko Y, Wernert N (2003). Influence of histochemical stains on quantitative gene expression analysis after laser-assisted microdissection. *Int J Mol Med* 11(4):449-53
- Osborne CK (1998). Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 51(3):227-38
- Ozisk G, Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL (2003). SF1 in the development of the adrenal gland and gonads. *Horm Res* 59 Suppl 1:94-8
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351(27):2817-26.
- Pakneshan P, Szyf M, Rabbani SA (2005). Hypomethylation of urokinase (uPA) promoter in breast and prostate cancer: prognostic and therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 5(7):471-88

- Pakneshan P, Tetu B, Rabbani SA (2004). Demethylation of urokinase promoter as a prognostic marker in patients with breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 10(9):3035-41
- Panning B, Jaenisch R (1998). RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 93(3):305-8.
- Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jeronimo C, Milanezi F, Schmitt FC (2005). P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res* 11(16):5869-77
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55(2):74-108
- Parks JS, Brown MR (1999). Transcription factors regulating pituitary development. *Growth Horm IGF Res* 9 Suppl B:2-8; discussion 8-11
- Paska C, Bogi K, Szilak L, Tokes A, Szabo E, Sziller I, Rigo J Jr, Sobel G, Szabo I, Kaposi-Novak P, Kiss A, Schaff Z (2004). Effect of formalin, acetone, and RNAlater fixatives on tissue preservation and different size amplicons by real-time PCR from paraffin-embedded tissue. *Diagn Mol Pathol* 13(4):234-40
- Petersen RP, Campa MJ, Sperlazza J, Conlon D, Joshi MB, Harpole DH Jr, Patz EF Jr (2006). Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. *Cancer* 107(12):2866-72
- Peyrat JP, Vennin P, Bonnetterre J, Hecquet B, Vandewalle B, Kelly PA, Djiane J (1984). Effect of bromocriptin treatment on prolactin and steroid receptor levels in human breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20(11):1363-7
- Pfeifer GP, Dammann R (2005). Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)* 70(5):576-83
- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, Brem H, Olivi A, Dimeco F, Vescovi AL (2006). Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 444(7120):761-5
- Piersma SJ, Jordanova ES, van Poelgeest MI, Kwappenberg KM, van der Hulst JM, Drijfhout JW, Melief CJ, Kenter GG, Fleuren GJ, Offringa R, van der Burg SH (2007). High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. *Cancer Res* 67(1):354-61
- Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG (2006). Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer* 42(9):1219-24
- Prall F, Duhrkop T, Weirich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H, Barten M (2004). Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol* 35(7):808-16.
- Prall OW, Rogan EM, Sutherland RL (1998). Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65(1-6):169-74
- Prest SJ, May FE, Westley BR (2002). The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J* 16(6):592-4.
- Pruvost M, Grange T, Geigl EM (2005). Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotechniques* 38(4):569-75
- Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trumper L, Binder C (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14):5454-9
- Purohit A, Newman SP, Reed MJ (2002). The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer. *Breast Cancer Res* 4(2):65-9

- Qi X, Li TG, Hao J, Hu J, Wang J, Simmons H, Miura S, Mishina Y, Zhao GQ (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(16):6027-32
- Quentien MH, Barlier A, Franc JL, Pellegrini I, Brue T, Enjalbert A (2006). Pituitary transcription factors: from congenital deficiencies to gene therapy. *J Neuroendocrinol* 18(9):633-42
- Quentien MH, Manfroid I, Moncet D, Gunz G, Muller M, Grino M, Enjalbert A, Pellegrini I (2002a). Pitx factors are involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *J Biol Chem* 277(46):44408-16
- Quentien MH, Pitoia F, Gunz G, Guillet MP, Enjalbert A, Pellegrini I (2002b). Regulation of prolactin, GH, and Pit-1 gene expression in anterior pituitary by Pitx2: An approach using Pitx2 mutants. *Endocrinology* 143(8):2839-51
- Quievryn G, Zhitkovich A (2000). Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis* 21(8):1573-80
- Rabbani SA, Mazar AP (2001). The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* 10(2):393-415
- Rebeck TR (2002). Inherited genotype and prostate cancer outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11(10 Pt 1):945-52
- Reik W, Dean W, Walter J (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293(5532):1089-93
- Rajan P, Panchision DM, Newell LF, McKay RD (2003). BMPs signal alternately through a SMAD or FRAP-STAT pathway to regulate fate choice in CNS stem cells. *J Cell Biol* 161(5):911-21
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414(6859):105-11
- Reynaud R, Saveanu A, Barlier A, Enjalbert A, Brue T (2004). Pituitary hormone deficiencies due to transcription factor gene alterations. *Growth Horm IGF Res* 14(6):442-8.
- Rice DA, Mouw AR, Bogerd AM, Parker KL (1991). A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol* 5(10):1552-61
- Rice JC, Ozcelik H, Maxeiner P, Andrulis I, Futscher BW (2000). Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis* 21(9):1761-5
- Riethdorf S, Fritsche H, Müller V, Rau T, Schindlbeck C, Rack B, Janni W, Coith C, Beck K, Jänicke F, Jackson S, Gornet T, Cristofanilli M, Pantel K (2007). Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. *Clin Cancer Res* 13(3):920-8
- Riggs AD (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14(1):9-25
- Rio MC, Bellocq JP, Gairard B, Rasmussen UB, Krust A, Koehl C, Calderoli H, Schiff V, Renaud R, Chambon P (1987). Specific expression of the pS2 gene in subclasses of breast cancers in comparison with expression of the estrogen and progesterone receptors and the oncogene ERBB2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):9243-7
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA (1999). The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 27(11):2291-8.
- Robertson KD (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6(8):597-610.

- Rodriguez-Canales J, Hanson J, Tangrea M, Erickson H, Albert P, Wallis B, Richardson A, Pinto P, Linehan W, Gillespie J, Merino M, Libutti S, Woodson K, Emmert-Buck M, Chuaqui R (2007). Identification of a unique epigenetic sub-microenvironment in prostate cancer. *J Pathol* 211(4):410-419
- Ronaghi M (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11(1):3-11
- Rosen EM, Fan S, Pestell RG, Goldberg ID (2003). BRCA1 in hormone-responsive cancers. *Trends Endocrinol Metab* 14(8):378-85
- Rosen PP, Oberman HA (1993). Tumors of the mammary gland. Atlas of Tumor Pathology. Third Series, Fascicle 7. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.
- Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ (2003a). The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 8(4):307-25
- Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, Symmans WF, Hortobagyi GN, Pusztai L (2004). Breast cancer biomarkers and molecular medicine: part II. *Expert Rev Mol Diagn* 4(2):169-88
- Ross JS, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Leschly N, Symmans WF, Hortobagyi GN, Pusztai L (2003). Breast cancer biomarkers and molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 3(5):573-85
- Ross JS, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN (2005). Breast cancer biomarkers. *Adv Clin Chem* 40:99-125
- Royston P, Sauerbrei W (2004). A new measure of prognostic separation in survival data. *Stat Med* 23(5):723-48
- Ruibal A, Schneider J, del Rio C, Arias J, Nunez MJ, Piqueras V, Tejerina A (1999). pS2 negativity in postmenopausal women with ER+PgR+ infiltrating ductal breast carcinoma is associated with reduced hormone dependence and increased proliferation and aneuploidy of the tumors. *Int J Biol Markers* 14(3):186-8
- Ryan AK, Blumberg B, Rodriguez-Esteban C, Yonei-Tamura S, Tamura K, Tsukui T, de la Pena J, Sabbagh W, Greenwald J, Choe S, Norris DP, Robertson EJ, Evans RM, Rosenfeld MG, Izpisua Belmonte JC (1998). Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates. *Nature* 394(6693):545-51
- Ryschich E, Notzel T, Hinz U, Autschbach F, Ferguson J, Simon I, Weitz J, Frohlich B, Klar E, Buchler MW, Schmidt J (2005). Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 11(2 Pt 1):498-504
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12):5463-7
- Sasaki M, Kaneuchi M, Fujimoto S, Tanaka Y, Dahiya R (2003). Hypermethylation can selectively silence multiple promoters of steroid receptors in cancers. *Mol Cell Endocrinol* 202(1-2):201-7
- Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(51):18538-43
- Schatz P, Dietrich D, Schuster M (2004). Rapid analysis of CpG methylation patterns using RNase T1 cleavage and MALDI-TOF. *Nucleic Acids Res* 32(21):e167
- Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP (1999). Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem* 274(47):33551-6
- Schlegel A, Wang C, Pestell RG, Lisanti MP (2001). Ligand-independent activation of oestrogen receptor alpha by caveolin-1. *Biochem J* 359(Pt 1):203-10

- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P, Bischoff J, Harich D, Schlimok G, Riethmuller G, Eils R, Klein CA (2003). From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(13):7737-42
- Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, Virtanen C, Winegarden N, Cheng J, Gingeras T, Petronis A (2006). Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res* 34(2):528-42
- Schumacher A, Petronis A (2006). Epigenetics of complex diseases: from general theory to laboratory experiments. *Curr Top Microbiol Immunol* 310:81-115
- Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM (2001). Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 61(10):3932-6
- Schwartz DR, Wu R, Kardia SL, Levin AM, Huang CC, Shedden KA, Kuick R, Misek DE, Hanash SM, Taylor JM, Reed H, Hendrix N, Zhai Y, Fearon ER, Cho KR (2003). Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res* 63(11):2913-22
- Schwartz LH, Koerner FC, Edgerton SM, Sawicka JM, Rio MC, Bellocq JP, Chambon P, Thor AD (1991). pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer. *Cancer Res* 51(2):624-8
- Schweickert A, Campione M, Steinbeisser H, Blum M (2000). Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry. *Mech Dev* 90(1):41-51
- Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC (1996). Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* 14(4):392-9
- Sgroi DC, Teng S, Robinson G, LeVangie R, Hudson JR Jr, Elkahloun AG (1999). In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res* 59(22):5656-61
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE (2006). Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439(7072):84-8
- Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, Brown JS, Vaughan ED, Lowe D, Field JK, Risk JM (2006). Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing. *Br J Cancer* 94(4):561-8.
- Shen L, Guo Y, Chen X, Ahmed S, Issa JP (2007). Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *Biotechniques* 42(1):48, 50, 52
- Shi H, Maier S, Nimrich I, Yan PS, Caldwell CW, Olek A, Huang TH (2003). Oligonucleotide-based microarray for DNA methylation analysis: principles and applications. *J Cell Biochem* 88(1):138-43
- Shi SR, Cote RJ, Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, Liu D, Lim H, Taylor CR (2002). DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem* 50(8):1005-11
- Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ, Taylor CR (2004). DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol* 122(3):211-8
- Shimura S, Yang G, Ebara S, Wheeler TM, Frolov A, Thompson TC (2000). Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 60(20):5857-61
- Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B (2005). Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 11(6):2156-62

- Shiratori H, Sakuma R, Watanabe M, Hashiguchi H, Mochida K, Sakai Y, Nishino J, Saijoh Y, Whitman M, Hamada H (2001). Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2. *Mol Cell* 7(1):137-49
- Sidenius N, Blasi F (2003). The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 22(2-3):205-22
- Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ (1996). Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 105(4):394-402
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63(18):5821-8
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432(7015):396-401
- Siwoski A, Ishkanian A, Garnis C, Zhang L, Rosin M, Lam WL (2002). An efficient method for the assessment of DNA quality of archival microdissected specimens. *Mod Pathol* 15(8):889-92
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235(4785):177-82
- Sledge GW Jr (2005). VEGF-targeting therapy for breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10(4):319-23
- Sleutels F, Zwart R, Barlow DP (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415(6873):810-3
- Sobin LH (1999). Frequently asked questions regarding the application of the TNM classification. TNM/Prognostic Factors Project (International Union Against Cancer [UICC]). *Cancer* 85(6):1405-6
- Somiari RI, Somiari S, Russell S, Shriver CD (2005). Proteomics of breast carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 815(1-2):215-25
- Spangrude GJ, Smith L, Uchida N, Ikuta K, Heimfeld S, Friedman J, Weissman IL (1991). Mouse hematopoietic stem cells. *Blood* 78(6):1395-402
- Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol* 161(6):1961-71
- St Amand TR, Zhang Y, Semina EV, Zhao X, Hu Y, Nguyen L, Murray JC, Chen Y (2000). Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of Pitx1 and Pitx2 in mouse tooth-forming anlage. *Dev Biol* 217(2):323-32
- Stach D, Schmitz OJ, Stilgenbauer S, Benner A, Dohner H, Wiessler M, Lyko F (2003). Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Res* 31(2):E2
- Sugiyama Y, Sugiyama K, Hirai Y, Akiyama F, Hasumi K (2002). Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues. *Am J Clin Pathol* 117(1):109-16
- Suh H, Gage PJ, Drouin J, Camper SA (2002). Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification. *Development* 129(2):329-37
- Sun R, Li AL, Wei HM, Tian ZG (2004). Expression of prolactin receptor and response to prolactin stimulation of human NK cell lines. *Cell Res* 14(1):67-73
- Surani MA (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414(6859):122-8
- Sutherland E, Coe L, Raleigh EA (1992). McrBC: a multisubunit GTP-dependent restriction endonuclease. *J Mol Biol* 225(2):327-48

- Suzuki T, Miki Y, Nakamura Y, Moriya T, Ito K, Ohuchi N, Sasano H (2005). Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 12(4):701-20
- Sweep CG, Geurts-Moespot J, Grebenschikov N, de Witte JH, Heuvel JJ, Schmitt M, Duffy MJ, Jänicke F, Kramer MD, Foekens JA, Brunner N, Brugal G, Pedersen AN, Benraad TJ (1998). External quality assessment of trans-European multicentre antigen determinations (enzyme-linked immunosorbent assay) of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its type 1 inhibitor (PAI-1) in human breast cancer tissue extracts. *Br J Cancer* 78(11):1434-41
- Tachibana T, Onodera H, Tsuruyama T, Mori A, Nagayama S, Hiai H, Imamura M (2005). Increased intratumor Valpha24-positive natural killer T cells: a prognostic factor for primary colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res* 11(20):7322-7
- Takahashi Y, Miyoshi Y, Takahata C, Irahara N, Taguchi T, Tamaki Y, Noguchi S (2005). Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clin Cancer Res* 11(4):1380-5
- Tetzner R, Dietrich D, Distler J (2007). Control of carry-over contamination for PCR-based DNA methylation quantification using bisulfite treated DNA. *Nucleic Acids Res* 35(1):e4
- Tetzner R, Dietrich D (2006). A method for the carry-over protection in DNA amplification systems targeting methylation analysis achieved by a modified pre-treatment of nucleic acid. WO2006040187
- Theriault BL, Shepherd TG, Mujoomdar ML, Nachtigal MW (2007). BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*. 2007 im Druck
- Tost J, Gut IG (2006). Analysis of gene-specific DNA methylation patterns by pyrosequencing(r) technology. *Methods Mol Biol* 373:89-102
- Tost J, Schatz P, Schuster M, Berlin K, Gut IG (2003). Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 31(9):e50
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP (1999). Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res* 59(10):2307-12
- Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP (2001). Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 97(9):2823-9
- Tremblay JJ, Goodyer CG, Drouin J (2000). Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms. *Neuroendocrinology* 71(5):277-86
- TwoRoger SS, Hankinson SE (2006). Prolactin and breast cancer risk. *Cancer Lett* 243(2):160-9
- Uchida T, Ohashi H, Aoki E, Nakahara Y, Hotta T, Murate T, Saito H, Kinoshita T (2000). Clonality analysis by methylation-specific PCR for the human androgen-receptor gene (HUMARA-MSP). *Leukemia* 14(1):207-12
- Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P (2002). Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 23(24):4072-9.
- Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S (2001). Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene* 20(26):3348-53
- Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M (2005). Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 23(28):7212-20
- Vadlamudi U, Espinoza HM, Ganga M, Martin DM, Liu X, Engelhardt JF, Amendt BA (2005). PITX2, beta-catenin and LEF-1 interact to synergistically regulate the LEF-1 promoter. *J Cell Sci* 118(Pt 6):1129-37
- van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH (2002). Gene

expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415(6871):530-6

van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP (2004). Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 57(7):675-81

Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E, Wiesmann F, Betz B, Galm O, Camara O, Durst M, Kristiansen G, Huszka C, Knuchel R, Dahl E (2006). Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 25(24):3479-88

Velkeniers B, Dogusan Z, Naessens F, Hooghe R, Hooghe-Peters EL (1998). Prolactin, growth hormone and the immune system in humans. *Cell Mol Life Sci* 54(10):1102-8

Vgenopoulou S, Lazaris AC, Markopoulos C, Boltetsou E, Kyriakou V, Kavantzias N, Patsouris E, Davaris PS (2003). Immunohistochemical evaluation of immune response in invasive ductal breast cancer of not-otherwise-specified type. *Breast* 12(3):172-8

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marincola FM (2000). High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol* 18(4):457-9

Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ (1997). Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 25(21):4422-6

Weber A, Hengge UR, Bardenheuer W, Tischoff I, Sommerer F, Markwarth A, Dietz A, Wittekind C, Tannapfel A (2005). SOCS-3 is frequently methylated in head and neck squamous cell carcinoma and its precursor lesions and causes growth inhibition. *Oncogene* 24(44):6699-708

Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ (2003). Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26):15901-5

Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ (2005). Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 65(20):9155-8

Wenger CR, Clark GM (1998). S-phase fraction and breast cancer--a decade of experience. *Breast Cancer Res Treat* 51(3):255-65

Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, Fiegl H, Marth C, Müller-Holzner E, Jones PA, Laird PW (2004). Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 64(11):3807-13

Wirtz M, Stach D, Kliem HC, Wiessler M, Schmitz OJ (2004). Determination of the DNA methylation level in tumor cells by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* 25(6):839-45

Wojdacz TK, Hansen LL (2006). Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *Biotechniques* 41(3):274, 276, 278

Woodson K, Gillespie J, Hanson J, Emmert-Buck M, Phillips JM, Linehan WM, Tangrea JA (2004). Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens. *Prostate* 60(1):25-31

Woodward WA, Chen MS, Behbod F, Rosen JM (2005). On mammary stem cells. *J Cell Sci* 118(Pt 16):3585-94

Wulfkühle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF 3rd (2001). New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics* 1(10):1205-15

Wulfkühle JD, Sgroi DC, Krutzsch H, McLean K, McGarvey K, Knowlton M, Chen S, Shu H, Sahin A, Kurek R, Wallwiener D, Merino MJ, Petricoin EF 3rd, Zhao Y, Steeg PS (2002). Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res* 62(22):6740-9

Xing RH, Rabbani SA (1999). Transcriptional regulation of urokinase (uPA) gene expression in breast cancer

cells: role of DNA methylation. *Int J Cancer* 81(3):443-50

Xiong Z, Laird PW (1997). COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 25(12):2532-4

Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Pequignot E (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 402(6758):187-91

Xu RH, Chen X, Li DS, Li R, Addicks GC, Glennon C, Zwaka TP, Thomson JA (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20(12):1261-4

Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2(3):185-90

Yan PS, Venkataramu C, Ibrahim A, Liu JC, Shen RZ, Diaz NM, Centeno B, Weber F, Leu YW, Shapiro CL, Eng C, Yeatman TJ, Huang TH (2006). Mapping geographic zones of cancer risk with epigenetic biomarkers in normal breast tissue. *Clin Cancer Res* 12(22):6626-36

Yang F, Foekens JA, Yu J, Sieuwerts AM, Timmermans M, Klijn JG, Atkins D, Wang Y, Jiang Y (2006). Laser microdissection and microarray analysis of breast tumors reveal ER-alpha related genes and pathways. *Oncogene* 25(9):1413-9

Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13(8):335-40

Yoshida R, Kimura N, Harada Y, Ohuchi N (2001). The loss of E-cadherin, alpha- and beta-catenin expression is associated with metastasis and poor prognosis in invasive breast cancer. *Int J Oncol* 18(3):513-20

Yu-Lee LY (2002). Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 57:435-55

Zhang J, Madden TL (1997). PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res* 7(6):649-56

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425(6960):836-41

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G (2003a). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348(3):203-13

Zhang X, Podsypanina K, Huang S, Mohsin SK, Chamness GC, Hatsell S, Cowin P, Schiff R, Li Y (2005). Estrogen receptor positivity in mammary tumors of Wnt-1 transgenic mice is influenced by collaborating oncogenic mutations. *Oncogene* 24(26):4220-31

Zhu NL, Li C, Huang HH, Sebald M, Londhe VA, Heisterkamp N, Warburton D, Bellusci S, Minoo P (2007). TNF-alpha represses transcription of human Bone Morphogenetic Protein-4 in lung epithelial cells. *Gene im Druck*

Zhu G, Reynolds L, Crnogorac-Jurcevic T, Gillett CE, Dublin EA, Marshall JF, Barnes D, D'Arrigo C, Van Trappen PO, Lemoine NR, Hart IR (2003). Combination of microdissection and microarray analysis to identify gene expression changes between differentially located tumour cells in breast cancer. *Oncogene* 22(24):3742-8

Zhu P, Baek SH, Bourk EM, Ohgi KA, Garcia-Bassets I, Sanjo H, Akira S, Kotol PF, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW (2006). Macrophage/cancer cell interactions mediate hormone resistance by a nuclear receptor derepression pathway. *Cell* 124(3):615-29

Zinger M, McFarland M, Ben-Jonathan N (2003). Prolactin expression and secretion by human breast

glandular and adipose tissue explants. *J Clin Endocrinol Metab* 88(2):689-96

Zirn B, Samans B, Wittmann S, Pietsch T, Leuschner I, Graf N, Gessler M (2006). Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 45(6):565-74

Zsikla V, Baumann M, Cathomas G (2004). Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J Clin Pathol* 57(6):654-6

8 Anhang

8.1 Oligonukleotide

Tabelle 10: Primersequenzen der unter 5.2.3 sequenzierten und unter 5.2.4 per DNA Chip analysierten PCR Amplifikate. Dargestellt sind zusätzlich die Positionen der Amplifikate im Genom basierend auf Ensembl v41. Alle C-reichen Primer tragen am 5'-Ende eine Cy3[®]-Markierung. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (D) bezogen.

Gene	Amplifikat	Primersequenzen		Chromosom	Position im Genom	
		Vorwärtsprimer bzw. Sequenzierprimer	Rückwärtsprimer		Start	Ende
BARX1	1	GGTAAAAAGGAGGGGGTT	TAATACCCTCACATCACTATCTAAA	9	95757597	95757811
BARX1	2	TTGAGGGGTAGAATATGGG	ACCTCCTCCCAATAAAA	9	95760589	95760898
BMP2	1	GGGGTGTATTGGAGTAAGG	ATTATTCTCCCTACAAATTCAA	20	6696899	6697237
BMP4	1	TTGGAAGAAGTTTGTAGGGAT	CCAATCTAACCCCAACTA	14	53492175	53492489
GAD1	1	TAAGGTGGAGAGATTATTTTAAATG	ACAAACCCTAACCTCCTCTA	2	171387061	171387450
GATA4	1	ATTGAGTAAAGGGTTTTAGGTTT	CCTCTCCCAAACCTTACCT	8	11602562	11603053
GATA4	2	ATAAGGGTTGGAGAATGTGTAT	ACTCCACAAAACCAATCA	8	11599056	11599524
GATA4	3	TGATTGGTTTGTGGGAGT	AACAATCTAAATATCTCCTAAACCTC	8	11598608	11599073
GATA4	4	AGTAAAGGGTTTTAGGTTTTTGT	TAAACCACCCTCTCTTTTCTA	8	11602737	11603049
ISL1	1	GTAAGAGATAAGGAAGAGAGGTGTT	CACACAAAATACAATCAATTTCC	5	50715003	50715493
LHX3	1	GGTAGAGGTTTGAGTTGGAGTAT	AATTACCCTTCTCCCTAAC	9	138235098	138235369
LHX3	2	GGGTTTGAGTTTAGGGA	CCTCAATATCCTACTAAAACCTTACC	9	138236577	138237025
LHX3	3	GGGTTTAGGTTAGGTTTTT	CCCACTCACCCCTTCTA	9	138235028	138235253
LHX4	1	GTTTTAGGGATTTAAGATAGGGT	CCTAACCAATTCCTTTCTAC	1	178465033	178465372
LMO2	1	AGATTAATGATAAAGAGAAAGG	AACCTAAACCCTTCAAATAAATA	11	33847059	33847484
LMX1A	1	GGAATGTTTGTAGAAGTAAAAGAGT	CACCCAAAACCTAAACC	1	163592079	163592535
PITX3	1	TTAGAGGGTAGGTAGGGGTT	AAACCTAAAAATCCACAATAAA	10	103991131	103991399
POU4F1	1	TTGTTTTTGTGGTGGTTATT	TAAACCTAAACCCACTTCT	13	78075719	78075925
TCF4	1	GATGTGTGAGTGAGAGGGAA	CACAACCAAATCCCTAACT	18	51406427	51406851
ZNFN1A1	1	AAAGAAAGTTGGGAAGAGTTT	TTAAATTCACCAATTACCCCA	7	50314817	50315119
CCND2	1	GGGAGAGGTGAGGGTAGA	ACCCCTAACATACAAAATAATA	12	4252946	4253335
FGF4	1	TTGGTTTAGGTGGATTTTTATT	ACCTCTTACACTTTATCCCTACC	11	69299578	69299942
GAD1	2	GTGATGGGAAAAGAAGGTT	TCTAACCAACAACCTCAAATATAAA	2	171380570	171380925
GATA4	5	GAGGAGTATTAGTTTTTGGATTTT	AAATTACCAACCCCTACTCT	8	11599356	11599822
LHX3	4	TGGTGATGGAATGGTTTT	ATAAACCCCAACAAAACACTAA	9	138236186	138236600
LHX4	2	ATTGAAAATAGATTGGGGA	TCTAACTAATACCCCTACCCTATAA	1	178466086	178466512
NR5A1	1	GGAGTTAGAGATGGGAAGAAAT	CTAATCCAATCCCCACC	9	126305959	126306096
PITX3	2	AGGGTGGGGTAGGTTAT	CCCATTACCCTAATCTATATCTTC	10	103981547	103981875
DLX2	1	GGTTTGGTATTGGTAGGAATTTA	CCTCCTTTCTTATTTCCCC	2	172675231	172675643
DLX2	2	GGGAAATAAGAAAGGAGGTA	AATACCCACACTTCAAAAACC	2	172675625	172675903
FGF8	1	TGTATGGGGGATAGTGTTG	TACCTCAAACCCAAATAAAA	10	103525384	103525501
GATA2	1	GTTTATAGGGTAGGAGTTGGG	AACCTTAAATAAAAATCCCTTAAT	3	129689352	129689690
LEF1	1	AATTTAAGGGTGGGGGAG	CTTCTAATCCTTACACCTTCTTTA	4	109308441	109308940

Gene	Amplifikat	Primersequenzen		Chromosom	Position im Genom	
		Vorwärtsprimer bzw. Sequenzierprimer	Rückwärtsprimer		Start	Ende
LMO4	2	TTTGAGAAAGATGGTAAGTTTTT	CAAAATCCCAACTACTCCC	1	87566331	87566739
NR0B1	1	AGTTTTGTTTAGTGTTGTTTT	ACTATTCTTCATTTCCAACTTTTA	X	30237423	30237623
PAX2	1	TTATTTGAGAAGGAAAAAGAGAA	TTAACAAATTAACCTAACCTAAATC	10	102579386	102579563
TCF1	1	GTTTATTTAGTGTGGATTAGTGTT	ACCATAACTCCCTATCCCTC	12	119900612	119901051
BRMS1	1	GATGTTTATAGTTGGATAGTTGGT	CCTAAAATTCCTAATTCTCTCAAAA	11	65869190	65869583
CCND1	1	GATTATAGGGGAGTTTTGTTGA	CACCTCCAACATCCAAATA	11	69165060	69165463
CITED2	1	GAGGGGAAATAAAAGGGA	AATCAACCCTCCTCATCCTA	6	139737105	139737425
CREBBP	1	TGAATGTAGTTTGGTTAATGTGT	TATCACCCCCACCTAAAAA	16	3869372	3869793
CTNNB1	1	TGGGGTGTGTTAGTATTTTATT	ACTACTCTCAAACCTTCTC	3	41215800	41216089
EP300	1	AATTAAGGGGTAGGGAATTAGA	CATCCCTCTCCAACCACT	22	39818780	39819162
FGFR1	1	AATTTAAGGGAAGGGTTTGA	CCCCCTACAACCTACTACTAAA	8	38445374	38445817
GATA3	1	TATTTTGGGGGTTTGGAGAG	CAACCTACCCCATTCATAAAA	10	8135972	8136298
GATA6	1	TTGGAAGAGTAGTTTGGAGG	CTAAATCCTTCCCAACAAAAA	18	18004008	18004401
HDAC1	1	AAGTGGGATTGTTAAGTTTATAGAG	CCTCAACCTCCAAATTCC	1	32530016	32530472
HTATIP	1	GGGGAGGTGGGTAGAGTT	CTCCTTCAATCACAAATACCA	11	65236363	65236690
HTATIP	2	TAGTGGAGGGGAGGGAAGAT	AATACCACCCCTTTCCAA	11	65236298	65236676
LDB1	1	TGGTGTGTTTATAGTAGAGGGGT	AACAACCTCAACAACCTCATATCC	10	103864239	103864606
LDB1	2	TTTTGTTGGGGTATTAGG	TCTCTCCCAATCTCTATCTCTC	10	103864590	103864894
LMX1B	1	GGATTGATAAGTAGGTGATAGAGG	AACAACACCCCCAAAATAA	9	128416279	128416686
LMX1B	2	GAGAAGGAGTAGGAAGTGATGT	TACTTACAAAATCACAACCC	9	128428434	128428933
MSX1	1	AAAAGAAGTAGTAGAGGAGAGAAATAA	TCCCCAACAAACCAACTC	4	4911895	4912388
MSX2	1	GAGAGGGGAAAAAGAGTTGT	CTACACTCTACAAAACCTCCATAAATA	5	174092014	174092481
NCOR1	1	GGGAGAGGGGTTGAGTTA	TCTTCTCCAAACTCCATAAA	17	16059157	16059585
NR0B1	2	GGGTAGTATTTGGAAGTAGGGTAA	CAACAAAACACACCCCTCTACT	X	30236565	30236780
PAX2	2	TATAGAGTGGTGAATTTATTGTT	ACTCCCCTAAAACCTAATCATC	10	102495204	102495649
PAX9	1	GAGAAGGGAGTTGTGGTATTAG	AAACTATCCCCAAACCATATAA	14	36201284	36201731
PITX1	1	GAGTTGGGAGTAGGGTTTG	AACCTCCCTCTCTATCTCTCTAAATA	5	134396890	134397245
PROP1	1	GGAGGGAATAGGTGTGGA	CCTCCTAACCTTCTTCATAAAA	5	177355344	177355625
SMAD4	1	GTTTAGGGGAGAGTAGGAAGG	ACCCAAATCCAAATTCAAAA	18	46810409	46810726
TCF7L1	1	AATAATGAAGAAAAGGTGATTTTTA	CCCCTAACTTTCTCCCAA	2	85213393	85213732
TDGF1	1	GGATTGAAATGTTAGGTGAGG	AAAAATTCCTTAAAAACTCCAA	3	46593291	46593716
TGFB1	1	TTGGTATTAGAAGGTGGGTG	AACAAAACCTTAAAAACCCCAA	19	46551005	46551303
TRRAP	1	AGATTAGGGAAAAAGGAGTTT	CCCACAACCTCCTCTCAA	7	98313907	98314399
DLX4	1	TTAGGTAATGGGAGGAGTAGG	CCCAAACTACCAACAATAAA	17	45404066	45404446
DLX4	2	ATTTGAAGGGGAGTTAAGTGT	CCCAAAAACCATCCAATA	17	45400745	45401176
HDAC1	2	GGTGAGTTTAGGAGGGGA	CCACATCAAACCTCCTCAA	1	32530228	32530664
LDB1	3	GTGGTAGTGTGGTGTATTTT	CACAAATCCCAACCCCTT	10	103870575	103870880
LEF1	2	GAAGGAGGTGGTGATTGA	CCTCTCCCCACTATCAAAA	4	109309669	109310082
NODAL	1	AGTTTATAGGTAGAAGGTAGGTAGTGT	CAATCCCAAAACCAAAACC	10	71870944	71871252
POU4F2	1	GAATTTGGGATTAGGGTTATT	TTACCCCTTCTTCTCTCTAC	4	147778898	147779351
TGFB1	2	AGGAGGTAGGATTTGGGG	CCCCTACAAAACCTAAAAATCTC	19	46550856	46551307
PITX2 ^{b,a}		GTAGGGGAGGGAAGTAGATGT	TCCTCAACTCTACAAACCTAAAA	4	111777835	111778242

Gene	Amplifikat	Primersequenzen		Position im Genom		
		Vorwärtsprimer bzw. Sequenzierprimer	Rückwärtsprimer	Chromosom	Start	Ende
PITX2 ^{b,c}		GAGTGATAGGGATAGGTAGGTG	CCTTAAACTAAACAAAACTAAATTCC	4	111763491	111763967
TFF1 ^b		TTGGTGATGTTGATTAGAGTTT	TAAAACACCTTACATTTTCCCT	21	42656343	42656791
uPA ^b		GGTAAGGGGGTTTGAGGT	TCCCTCCCCTATCTTACAA	10	75340488	75340826

^a Promotor der Transkripte A und B, ^b wurde nicht sequenziert, sondern nur mit dem DNA Chip analysiert, ^c Promotor des Transkripts C

Tabelle 11: Sequenzen der Primer, die zur Generierung von Amplifikaten verschiedener Länge (Kapitel 5.3.2.1.1) verwendet wurden. Dargestellt sind zusätzlich die Länge der Amplifikate, die Namen der Gene und die Positionen der Amplifikate im Genom basierend auf Ensembl v41. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (D) bezogen.

Gene	Länge [bp]	Primersequenzen		Position im Genom		
		Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Chromosom	Start	Ende
CYP2B6	185	TTTTTGTAGTTTAGAAGGAGGTTAG	ACACAATAAATTCAACCACCAA	19	46207753	46207937
CDKN2A	210	GGGAGATTTAATTTGGGG	CACCCTCTAATAACCAACCA	9	21964894	21965103
MLNR	235	TTAGGTATAAGTTGGTGGTGG	CCCATAAACACCCCTAAAA	13	48692472	48692706
SLC25A29	260	AGGTATAGGATGGGGAATTAGT	AACCCAAACCCCTTATACAAAC	14	99829095	99829354
RPA2	285	GTTTTTGGAGTTAATTGGGAG	CACCCCATCATTACTATTC	1	28113517	28113801
ECGF1	310	AGGGTAGAGGGTGTGGT	CCAAAACTATAAACCTTCCCA	22	49316155	49316464
PTPRN2	335	TTAGTATGGGTTGAGAGGAGT	CCTCTTTCCTAAAACCTACACATTC	7	157088803	157089137
MAGEB4	360	GGATTATTGTTGGGTATTTGTT	ACACTTCCCTAAAATCTTCAA	X	30170608	30170967
XE7	385	GTTGGATTGTTTAGAGAGAGG	ACATTTAACTCTTTATCCCAAAA	X	1677590	1677974
AUTS2	410	TTATTTGATGGGGATAGAGATT	ACAAACAACACACCCTCATA	7	69174278	69174687
EMR1	435	TGTAATGAAAGAAGGTGTTGAG	TTAACTAAACCATCCATAACCC	19	6838306	6838740
SMAD6	460	GGATTATAGGAATTAGAATGGGT	TCTTCCAACCTCAACATCTTACT	15	64786807	64787266
PIK3CB	485	TGGTGGTATGGATTGGATAA	TCCCCCAAATAACACAATATAC	3	139960651	139961135
VIM	511	AGAGGAAAAGATAAGGAATTTTT	CTTATCCCCCACAAAACC	10	17310360	17310870
TMEFF2	535	GGTGGAGGGAGAGTTAAGG	CCAACAAAACGCCCTCTCC	2	192767835	192768369
PMS2	561	GATTGAGATTATTTGGGTTTT	ACTTAAACCTTCCCTCTCCAC	7	6016906	6017466
GNAS	586	TTAAGTATTGGATTTGGGGTTA	ACCTACCCTCTAACTCTACAAAA	20	56847945	56848530
TP73	606	AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA	AAAAACCTCTAAAACCTACTCTCC	1	3557673	3558278
MGMT	636	AAGTTTTAGGGAAGAGTGTTT	ACCTTTTCTATCACAAAATAA	10	131154724	131155359
ESR1	662	AGGGGGAATTAATAGAAAGAG	CAATAAACCATCCCAAATACT	6	152170124	152170785
CEACAM5	678	TATGGGAGGAGGTTAGTAAGTG	CCCCAAATCCTACATATAAAAA	19	46903217	46903894
SKIV2L	711	GTATTATGTGGTTAAGGAGGG	ACTCCAACAATCAACAACCT	6	32034433	32035143

Tabelle 12: Sequenzen der Primer, die für die mPCR Voramplifikation und als Sequenzierprimer verwendet wurden. Dargestellt sind zusätzlich die Namen der Gene und die Positionen der Amplifikate im Genom basierend auf Ensembl v41. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (D) bezogen.

Gene	Primersequenzen		Chromosom	Position im Genom	
	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer		Start	Ende
HS3ST2	GGGATTTTTGGAGAAGTTTTTG	CTCCTACACTTACCTATATTACAA	16	22733516	22733643
LHX3	AGAAGGGTAGGGTTAGTGTTT	ACCCCTCTAAAACCCAAAATAA	9	138236973	138237108
LIMK1	AAGGGAGGTTTGGTGATTTT	AATACCCTATAAACCACCCC	7	73146958	73147164
PITX2 ^a	GTAGGGGAGGGAAGTAGATGTT	TTCTAATCCTCCTTTCCACAATAA	4	111777835	111777978
PITX2 ^b	AGAGGGATAAAGAGTAAAGATT	CCAATAACCTCTCCCTATAAC	4	111773195	111773407
PITX2 ^c	GATAGGTAGGTGATATTAGATTTT	CCTAAATACCTAAAATAACTAC	4	111763501	111763655
PITX2 ^d	TTTTGGAAAGTGGTTTTAGTTTT	CCAACAACCCAACTCTTC	4	111761842	111762075
PITX3	TTTTAGTAGGGTAGTTGAAAG	TACTACCACCCCAACC	10	103991253	103991366
RASSF1A	AAGGAGGGAAGGAAGGGT	TCCCCAAAATCCAACTAAA	3	50353329	50353441
SLIT2	GTGAGTGAGTAGAGTTAGAGT	AAAAATCTCAATAAATATTATAACCCC	4	19863903	19864076
SLITRK1	GAGGTGATAAATATTAGTAGAGTTT	AAATTCATACTCCTCTCCAATA	13	83351752	83351943
TFF1	AGTTGGTGATGTTGATTAGAGTT	CCCTCCAATATACAAATAAAACTA	21	42656341	42656529
uPA	GTTAGGTGTATGGGAGGAAGTA	ACTCCCTCCCCTATCTTACAA	10	75340661	75340828

^a Promotor der Transkripte A und B, ^b Region 3, ^c Promotor des Transkripts C, ^d Region 8

Tabelle 13: Sequenzen der Primer, die zur Reamplifikation der mPCR verwendet wurden. Alle Primer besitzen am 5'-Ende eine Domäne (ACTCC bei G-reichen und AGGTG bei C-reichen Primern) zur Generierung des Normalisierungssignals. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (D) bezogen.

Gene	Primersequenzen	
	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
HS3ST2	ACTCCGGGATTTTTGGAGAAGTTTTTGGT	AGGTGCTCCTACACTTACCTATATTACAAC
LHX3	ACTCCAGAAGGGTAGGGTTAGTGTTTTT	AGGTGACCCCTCTAAAACCCAAAATAACC
LIMK1	ACTCCAAGGGAGGTTTGGTGATTTTTT	AGGTGAATACCCTATAAACCACCCCCC
PITX2 ^a	ACTCCGTAGGGGAGGGAAGTAGATGTTAG	AGGTGTTCTAATCCTCCTTTCCACAATAAAA
PITX2 ^b	ACTCCAGAGGGATAAAGAGTAAAGATTTAG	AGGTGCCAATAACCTCTCCCTATAAC
PITX2 ^c	ACTCCGATAGGTAGGTGATATTAGATTTTTT	AGGTGCCTAAATACCTAAAATAACTAC
PITX2 ^d	ACTCCTTTTGGAAAGTGGTTTTAGTTTTTG	AGGTGCCAAACAACCCAACTCTTCCAC
PITX3	ACTCCTTTTAGTAGGGTAGTTGAAAGGG	AGGTGTACTACCACCCCAACC
RASSF1A	ACTCCAAGGAGGGAAGGAAGGGTAA	AGGTGTCCCCAAAATCCAACTAAAC
SLIT2	ACTCCGTGAGTGAGTAGAGTTAGAGT	AGGTGAAAAATCTCAATAAATATTATAACCCC
SLITRK1	ACTCCGAGGTGATAAATATTAGTAGAGTTT	AGGTGAAATTCATACTCCTCTCCAATAAC
TFF1	ACTCCAGTTGGTGATGTTGATTAGAGTTTT	AGGTGCCCTCCAATATACAAATAAAACTACT
uPA	ACTCCGTTAGGTGTATGGGAGGAAGTA	AGGTGACTCCCTCCCCTATCTTACAAC

^b Region 3, ^a Promotor der Transkripte A und B, ^c Promotor des Transkripts C, ^d Region 8

Tabelle 14: Sequenzen der Primer, die in den Kapiteln 5.1.1 zur Analyse der verschiedenen Regionen von PITX2 in Zelllinien verwendet wurden (PCR- und Sequenzierprimer). Dargestellt sind zusätzlich die Positionen der Amplifikate im Chromosom 4 basierend auf Ensembl v41. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (D) bezogen.

PITX2 Region	Primersequenzen		Position	
	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Start	Ende
1 (Promotor AB)	GTAGGGGAGGGAAGTAGATGTT	TTCTAATCCTCCTTTCCACAATAA	111777835	111777978
2	GTAGGAGAAGGGGTTTTTATT	TTATAATCCTCTAACCTCTAAAC	111773537	111773865
3 (Intron 2)	AGAGGGATAAAGAGTAAAGATTT	CCAATAACCTCTCCCTATAAC	111773195	111773407
4	GGAAGAATTTGTTGTTGGTTGTT	TCAACTCTTTCCTCTAACTAAA	111772972	111773236
5 (Promotor C)	GATAGGTAGGTGATATTAGATTTT	CCTAAATACCTAAAACCTAACTAC	111763501	111763655
6	GAGATGGTGTGTATTTTATGTT	TCCATAAACTACATAAAAAACCC	111762887	111763068
7	GATGTTGGGATTTTGTGATTT	CCCAAAAAATCAACCCCTC	111762571	111762794
8 (Exon 5)	TTTTGGAAAGTGGTTTTAGTTTT	CCAAACAACCCAACCTCTTC	111761842	111762075

Tabelle 15: Sequenzen der Primer, die in den Kapiteln 5.2.1 zur Identifizierung weiterer potentieller Biomarker verwendet wurden (PCR- und Sequenzierprimer). Dargestellt sind zusätzlich die Namen der Gene und die Positionen der Amplifikate im Genom basierend auf Ensembl v41. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (D) bezogen.

Gene	Primersequenzen		Chromosom	Position im Genom	
	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer		Start	Ende
PITX2 ^a	GTAGGGGAGGGAAGTAGATGTT	TTCTAATCCTCCTTTCCACAATAA	4	111777835	111777978
uPA	GTTAGGTGTATGGGAGGAAGTA	ACTCCCTCCCCTATCTTACAA	10	75340661	75340828
TFF1	AGTTGGTGATGTTGATTAGAGTT	CCCTCCCAATATACAAATAAAACTA	21	42656341	42656529
LHX3 ^b	TAGTGTTTTGTTGGGGTTTTATT	CCAAACCCAATAACTCCC	9	138236580	138236803
LHX3 ^c	GGAAAGGTTTGAGGATTTTTTG	ACCTACTACTAACACTACTAAC	9	138234555	138234657
PITX3 ^b	TTTTAGTAGGGTAGTTGGAAAG	TACTACCACCCCAACC	10	103991139	103991299
PITX3 ^c	TTGGGGATGAAGTTGTTATGTT	CAAAACCTCCCTCCATAA	10	103981660	103981842
PITX1	AGGTTGGAGAAGGAGGGGT	CAACCCAAAATAAATAATATTTACC	5	134398236	134398387
LHX4	GTTTGGTTGAGTTGGGTTA	CAACCCCTAATCCCCTTC	1	178465214	178465317
DLX4 ^d	ATAGGGAGTTGGGTGGTG	TCTACACTTAACTCCCCTTCAA	17	45401153	45401290
DLX4 ^e	TAGAGTTTAGAGTAATGTTTAGAG	AAACTAATATTCAAATCCTCTCAAC	17	45404900	45405012

^a Promotorregion der Transkripte A und B, ^b Promotorregion des Transkripts A, ^c Promotorregion des Transkripts B, ^d Promotorregion, ^e Intron

Tabelle 16: Primer und Detektionssonden für die QM Assays. Alle Detektionssonden tragen an 3' einen Quencher- (BHQ-1) und an 5' einen Reporterfarbstoff (6-FAM bei CG-Sonden und HEX bei TG-Sonden). Die Primer und Detektionssonden wurden von Biomers (D) bezogen.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	CG-Probe	TG-Probe
PITX2 ^a	GTAGGGGAGGGAAGTAG ATGTT	TTCTAATCCTCCTTTCCAC AATAA	AGTCGGAGTCGGGAGAG CGA	AGTTGGAGTTGGGAGAGT GAAAGGAGA
PITX2 ^c	GATAGGTAGGTGATATTA GATTTT	CCTAAATACCTAAAATAA ACTAC	CGACTCCTATTGACCGC CCG	CCCAACTCCTATTCAACCA CCCCAAAAA
TFF1	GATGGTATTAGGATAGAA GTATTA	CCCTCCCAATATACAAATA AAAATA	CACCGTTCGTAAAATCC	ACACCATTATAAAATCCC CTAAT
uPA	GTTTTTTTTAAATTTTTGTG AG	CCTCCCCTATCTTACAA	ACCCGAACCCCGCGTACT TC	ACCCAAACCCACATACT TCCACA
ABHD9	GGTGTTAGGGTTTAGGGG TT	CCAAATATTTACCTAACAC TCAAATA	AACTATTTTCTATCGAAAC CGCCCG	AACTATTTTCTATCAAAAC CACCCACCTCT

^a Promotor der Transkripte A und B, ^c Promotor des Transkripts C

Tabelle 17: Sequenzen der für die Herstellung des DNA Chips verwendeten Oligonukleotide. Alle Oligonukleotide tragen eine C6-Aminomodifikation am 5'-Ende. Die Oligonukleotide sind sortiert nach dem Gen, für dessen PCR Amplifikat sie spezifisch sind und nach dem zugehörigen CG- bzw. TG-Partneroligonukleotid, mit dem sie jeweils die selben CpG-Positionen abdecken. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (D) bezogen.

Gen	Oligopaar 1		Oligopaar 2		Oligopaar 3		Oligopaar 4		Oligopaar 5	
	CG	TG	CG	TG	CG	TG	CG	TG	CG	TG
BARX1	GTAGACGGCG TGGGTT	AGGTAGATGGTG TGGGTT	GTTACGTGAAA GAGGTCGGT	GTTATGTGAAA GAGGTTGGT	AGCGGAGCGTA CGTTT	AGATTGAGTGG GTGTATGT	AGTCGGAGAGT TCGGGA	GTTGGAGAGTT TGGGAGG		
LHX4	AGGGTCGAGT TGGACGA	GGGTTGAGTTGG ATGATTG	TAGGGCGGTCG GGGAG	GTAGGGTGGTT GGGGAG	TTCGTCGCGGG GAGGT	AGGTTTTGTTGT GGGGAG	TTTCGGGTCGA GTACGG	TTTTGGGTTGA GTATGGGT		
CCND2	AAACGCGGTT TTTCGTT	TTAAATGTGGTT TTTTGTTATTT	TTCGATTTAATT TTAAACGCGGTT	TTGATTTAATT TTAAATGTGGTT	TTTGAAGCGGT GACGT	AGTGGTGATGTA AGTTGGT				
FGF4	TGCGTTAAGG CGGTCGG	TTGTGTTAAGGT GGTTGGA	GGTTGCGTTAA GGCGG	GGGTTGTGTTA AGGTGGT	GGAGTTTCGGA TGTTGCA	AGGAGTTTTGGA TGTTTGAG	TAGGTTTCGGT GTCGTTTA	TAGTTAGGTTTT GGTGTGTT		
TFF1	GAGGGACGTC GATGGT	GGAGGGATGTT GATGGTA	TTTACGAACGGT GTCGT	TATGAATGGTG TTGTTGAAAT	TACGAACGGTG TCGTCGA	GGATTTTATGAA TGGTGTGTT	GAACGGTGTGCG TCGAA	AATGGTGTGTT TGAAATAGTA	GTGTCGTCGAA ATAGTAGT	GGTGTGTTGAA ATAGTAGTT
TCF4	TTCGGAGTAA GTCGCGT	ATTTGGAGTAAG TTGTGTTTT	ATTTTTGGCGA GGCGG	TATTTTTGGTG AGGTGGG	GTGTTTCGATGA ATTTTCGTT	AGGTGTTTGATG AATTTTTGT	TTCGAGGGATG TAACGGGA	TTTGAGGGATG TAATGGGTA		
uPA	TTGCGGAAGT ACGCGG	TGTGGAAGTATG TGGGGT	TACGCGGGGTT CGGGT	AGTATGTGGGG TTTGGG	TTCGGGTCGTT GAGCGT	GTTTGGGTTGTT GAGTGT	GGTCGTTGAGC GTTGTA	GTTGTTGAGTG TTGTAAGAT		
PITX2 ^c	TGTCGAGACG TTATTTTCGT	TGGTGTGAGAT GTTATTTTGT	AGTAGTGCGGG GTCGG	AGTAGTGTGGG GTTGGG	TGTAGTTACGA CGCGGT	GTTGTAGTTATG ATGTGGTTTT	TTTCGGGCGGT CGAAT	TTTTGGGTGGT TGAATAGGA	TAGGCGAGCGA CGGAT	TAGGTGAGTGAT GGATTAGAT
PITX2 ^a	TTTGCCTTAAT TCGGTAGT	TTTGTGTTAATTT GGTAGTTTTA	AGCGTTAGGGT AGCGGGG	GGAGTGTTAGG GTAGTGG	AGCGGGTCGAA GAGTCGG	AGTGGGTTGAA GAGTTGG	TTGGGACGAGG CGTGT	GGGATGAGGT GTGTGGA	GAGTCGGGAGA GCGAA	AGTTGGGAGAGT GAAAGG
BMP4	GATTCGGGAA TTACGGGA	GGGATTTGGGAA TTATGGG	GGTTTCGTAAGT CGACGA	TGGGTTTTGTA AGTTGATGA	TTCGTGGAGAA GGCAGGT	TTTGTGGAGAAG GTGTGT	TTAGGGCGTTT CGTTAGT	AGGGTGTGTTG TTAGTTGG		
ISL1	ATTGTCGGTT TTTATTTTCGG	GTTGGTTTTTATT TTTGGGAAA	GGTGTTCGAGT CGCGT	AGAGGTGTTTG AGTTGTGT	ATTTTCGTCGGT TTAAATTGG	AATTTTGTGTTG TTAAATTGGA	GGCGTAGTCCA GTAGCGG	GGTGTAGTTGA GTAGTGGT		
GAD1	GGTATTCGGC GTTTCGTT	TAGGGTATTTGG TGTTTGTGTT	TACGGTATCGG GTGGGA	TATGGTATTGG GTGGGAGT	ATTCGATTGCG CGGGT	ATTTGATTGTGT GGGTGGA	ATTGCGCGGGT GGAGG	ATTGTGTGGGT GGAGGT		
GATA4	TTCGTCGTAG TCGGGGT	TTTGTGTTAGTT GGGGTTTTAA	TTCGCGGTTATA GGCGT	ATTTGTGGTTAT AGGTGTAGAA	GGCGTACGAGT TTTCGG	TGGTGTATGAGT TTTTGGGT	GGAGGTGGCGT ACGAG	TGGAGGTGGTG TATGAGT		
ZNFN1A1	AGAGTTTCGC GGTTAAGT	GGGAAGAGTTTT GTGGTTAA	GGCGGTGATTG CGGTA	GGGTGGTGATT GTGGTAA	GGGCGGGACG TTCGGT	TGGGTGGGATG TTTGGT	GTTTTAAAGCG CGACGT	TTGGTTTTTAA GTGTGATGAT	AGCGCGACGTA TAAATTTACGT	AAAGTGTGATGT ATAAATTTATGT
BMP2	GGTAATTCGT TTGGTATCGA	GGTAATTTGTTT GGTATTGAGA	TTCTTTGGTAT CGAGATCGT	ATTTGTTGGTA TTGAGATTGT	TTGGATTCGGC GTCGT	GGATTTGGTGT GTTTAGGA	TATGGGTCGCG GCGGA	ATGGGTTGTGG TGGAGT		
NR5A1	GGCGAGAGAT AACGATCGA	TTGGTGAGAGAT AATGATTGA	ATCGGGCGTAG ATACGA	ATTGGGTGTAG ATATGAGGT	GGGCGTAGATA CGAGGT	GGTGTAGATATG AGGTTAGTT	AATTCGGCGGG GACGA	AATTTGGTGGG GATGAGAT		

Gen	Oligopaar 1		Oligopaar 2		Oligopaar 3		Oligopaar 4		Oligopaar 5	
	CG	TG	CG	TG	CG	TG	CG	TG	CG	TG
PITX3	GTCGGGTATT CGGTCGG	GTTGGGTATTTG GTTGGAG	AGGGGTCGGGT ATTCGG	GGGTTGGGTA TTTGGT	ATTCGGTCGGA GTGGG	ATTTGGTTGGAG TGGG	AGGGCGTTTTT AGTTCGT	ATTAGGGTGTT TTTAGTTTGT	TAGTTCGTCGC GGCGA	TTAGTTTGTGT GGTGAGT
LMO2	AGGTCGTGGA TATCGGG	GGTTGTGGATAT TGGGGG	TTCGTAGAGGC GTCGGG	GTTTGTAGAGG TGTTGGGT	TTCGGAATTATT CGGGAGG	TTTTGGAATTAT TTGGGAGGA	AAGGGTACGTC GCGAG	GGTTAAGGGTA TGTTGTGAG		
POU4F1	TTCGCGAGAG TTTTTCGG	TTTGTGAGAGTT TTTTGGGA	AGAGCGCGCGT TAGAT	AAGGAGAGTGT GTGTTAGAT	TACGGGGTCGT CGAGA	TATGGGGTTGTT GAGAAGG	AGCGGTTTTTA CCGGTT	AGAGTGGTTTT TATGTGTTGG		
LHX3	AGGAGCGGGT ACGGTT	GGGAGGAGTGG GTATGG	ATCGGGGCGAC GAGAG	GGGGATTGGGG TGATGA	AGTATCGCGGA TAGCGT	TATTGTGGATAG TGTTAGTTT	ATCGAGCGAGG TTCGG	ATTGAGTGAGG TTTGGGGT	GGCGGGATTTCG GGGTA	GGGTGGGATTTG GGGTA
LMX1A	AAGAGTCGTT TCGGGA	GTTGTTTTGGGG AGGAGT	TAGTCGGAGGA GTCGTTT	ATTGTAGTTGG AGGAGTTGT	TTCGGAGCGTC GGGGA	TTTTGGAGTGTT GGGGAG	GACGTGGTCGC GAGTT	GGGATGTGTT GTGAGTT		

^a Promotor der Transkripte A und B, ^c Promotor des Transkripts C

8.2 DNA-Chip Ergebnisse

Tabelle 18: Ergebnisse (Konkordanzindex [K-Index], die Separationscore [Sep], die zeitabhängigen AUCs [36AUC – 72AUC] und der p-Wert des Cox Modells) der einzelne Chip-Oligopaare in der Chip-Studie. Dargestellt sind die Ergebnisse in der Gesamtpopulation (384 Patientinnen), in der Gruppe der Östrogenrezeptor-positiven (284 Patientinnen) und Östrogenrezeptor-negativen (97 Patientinnen) Gruppe.

Gen	Oligopaar	Östrogenrezeptor-positive Patientinnen							Gesamtpopulation							Östrogenrezeptor-negative Patientinnen							
		Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	
NR5A1	1	0,68	0,62	0,64	0,64	0,63	0,64	0,000023	0,46	0,57	0,57	0,58	0,58	0,59	0,00069	0,17	0,53	0,55	0,53	0,53	0,53	0,53	0,51
BMP4	3	0,71	0,63	0,68	0,69	0,65	0,64	0,000024	0,48	0,6	0,63	0,64	0,62	0,61	0,00021	-0,03	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,82
BMP4	4	0,62	0,61	0,64	0,66	0,61	0,62	0,000074	0,43	0,58	0,6	0,62	0,6	0,6	0,00040	-0,03	0,51	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,71
BMP4	1	0,52	0,6	0,63	0,63	0,61	0,61	0,00034	0,23	0,54	0,55	0,56	0,55	0,55	0,035	0,48	0,59	0,63	0,62	0,62	0,62	0,62	0,056
PITX2 ^a	3	0,42	0,59	0,65	0,61	0,61	0,6	0,00094	0,36	0,58	0,6	0,59	0,59	0,59	0,00056	0,32	0,57	0,56	0,58	0,58	0,58	0,58	0,071
ZNFN1A1	5	0,51	0,6	0,64	0,63	0,62	0,62	0,0010	0,3	0,55	0,55	0,56	0,56	0,57	0,017	0,12	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,88
ZNFN1A1	4	0,49	0,6	0,66	0,64	0,61	0,61	0,0011	0,34	0,56	0,58	0,58	0,57	0,58	0,0046	0,26	0,55	0,56	0,55	0,55	0,55	0,55	0,40

Gen	Oligopaar	Östrogenrezeptor-positive Patientinnen							Gesamtpopulation							Östrogenrezeptor-negative Patientinnen						
		Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert
FGF4	2	0,52	0,61	0,62	0,62	0,64	0,62	0,0013	0,43	0,57	0,57	0,58	0,6	0,6	0,0028	0,36	0,56	0,58	0,57	0,57	0,57	0,21
LMX1A	2	0,46	0,6	0,66	0,63	0,59	0,59	0,0015	0,38	0,58	0,62	0,6	0,58	0,58	0,0053	0,21	0,54	0,56	0,56	0,56	0,56	0,79
BARX1	3	0,52	0,61	0,65	0,66	0,65	0,62	0,0021	0,43	0,58	0,59	0,62	0,61	0,59	0,0015	0,39	0,55	0,57	0,58	0,58	0,58	0,077
BMP4	2	0,47	0,58	0,63	0,62	0,59	0,58	0,0042	0,35	0,56	0,59	0,59	0,58	0,56	0,014	0,21	0,53	0,55	0,55	0,55	0,55	0,62
BARX1	1	0,43	0,58	0,61	0,61	0,58	0,59	0,0048	0,23	0,54	0,55	0,55	0,54	0,55	0,075	0,17	0,53	0,55	0,55	0,55	0,55	0,41
PITX2 ^a	5	0,45	0,59	0,61	0,61	0,62	0,62	0,0055	0,34	0,57	0,56	0,57	0,58	0,59	0,016	0,26	0,55	0,56	0,54	0,54	0,54	0,42
GATA4	3	0,36	0,59	0,64	0,62	0,6	0,6	0,0056	0,29	0,58	0,61	0,6	0,59	0,59	0,017	0,23	0,56	0,58	0,57	0,57	0,57	0,60
LHX4	1	0,34	0,56	0,62	0,56	0,56	0,57	0,0056	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,52	0,058	0,31	0,56	0,62	0,57	0,57	0,57	0,35
BARX1	4	0,46	0,59	0,62	0,62	0,61	0,61	0,0062	0,22	0,54	0,54	0,55	0,56	0,56	0,097	0,17	0,52	0,55	0,54	0,54	0,54	0,53
TCF4	4	0,4	0,57	0,57	0,57	0,57	0,59	0,0065	0,26	0,54	0,53	0,53	0,54	0,55	0,031	0,04	0,51	0,48	0,49	0,49	0,49	0,86
FGF4	3	0,35	0,58	0,58	0,59	0,62	0,6	0,0072	0,3	0,56	0,55	0,57	0,59	0,59	0,013	0,3	0,55	0,56	0,57	0,57	0,57	0,36
LMO2	3	0,45	0,58	0,59	0,6	0,59	0,61	0,0081	0,31	0,56	0,56	0,56	0,56	0,58	0,024	0,03	0,52	0,52	0,49	0,49	0,49	0,98
uPA	2	0,34	0,59	0,63	0,6	0,58	0,59	0,0090	0,42	0,59	0,62	0,61	0,6	0,61	0,00080	0,72	0,65	0,67	0,67	0,67	0,67	0,012
LHX4	4	0,52	0,59	0,62	0,6	0,59	0,61	0,010	0,39	0,57	0,56	0,57	0,58	0,59	0,026	0,12	0,54	0,51	0,56	0,56	0,56	0,96
FGF4	1	0,41	0,6	0,65	0,64	0,62	0,6	0,011	0,36	0,58	0,6	0,61	0,61	0,59	0,0090	0,31	0,59	0,58	0,6	0,6	0,6	0,21
uPA	3	0,3	0,56	0,56	0,58	0,56	0,57	0,012	0,32	0,55	0,55	0,56	0,56	0,57	0,0078	0,49	0,59	0,6	0,59	0,59	0,59	0,17
GATA4	4	0,33	0,6	0,64	0,61	0,62	0,62	0,012	0,25	0,57	0,6	0,59	0,59	0,6	0,037	0,11	0,54	0,54	0,53	0,53	0,53	0,80
ZNFN1A1	3	0,27	0,56	0,6	0,58	0,55	0,56	0,013	0,19	0,53	0,54	0,55	0,53	0,54	0,026	0,11	0,51	0,49	0,53	0,53	0,53	0,48
LMX1A	3	0,37	0,59	0,68	0,63	0,59	0,59	0,013	0,27	0,56	0,61	0,59	0,56	0,56	0,051	-0,03	0,5	0,51	0,5	0,5	0,5	0,76
BARX1	2	0,37	0,57	0,58	0,58	0,58	0,58	0,016	0,2	0,53	0,52	0,54	0,55	0,55	0,11	0,14	0,51	0,53	0,51	0,51	0,51	0,79
BMP2	1	0,42	0,58	0,56	0,6	0,61	0,61	0,018	0,29	0,55	0,52	0,57	0,57	0,58	0,051	0,11	0,51	0,5	0,52	0,52	0,52	0,76
BMP2	2	0,37	0,56	0,56	0,56	0,57	0,58	0,018	0,14	0,51	0,48	0,5	0,52	0,53	0,12	0,39	0,58	0,6	0,58	0,58	0,58	0,60
FGF4	4	0,39	0,58	0,59	0,59	0,59	0,58	0,021	0,34	0,56	0,56	0,56	0,57	0,57	0,019	0,31	0,56	0,58	0,57	0,57	0,57	0,21
BMP2	3	0,27	0,56	0,58	0,58	0,58	0,59	0,021	0,16	0,53	0,53	0,54	0,54	0,55	0,088	0,03	0,52	0,53	0,52	0,52	0,52	0,57
uPA	4	0,33	0,56	0,56	0,55	0,55	0,57	0,022	0,27	0,54	0,54	0,53	0,54	0,56	0,025	0,2	0,54	0,56	0,55	0,55	0,55	0,35
ISL1	3	0,4	0,58	0,6	0,6	0,59	0,58	0,022	0,22	0,54	0,53	0,54	0,55	0,55	0,12	0,01	0,51	0,49	0,52	0,52	0,52	0,89
TCF4	3	0,29	0,55	0,56	0,55	0,54	0,56	0,023	0,15	0,52	0,51	0,51	0,51	0,52	0,11	0,1	0,51	0,55	0,55	0,55	0,55	0,67
CCND2	2	0,33	0,58	0,6	0,62	0,6	0,61	0,024	0,33	0,57	0,6	0,6	0,59	0,6	0,0044	0,37	0,58	0,61	0,58	0,58	0,58	0,071

Gen	Oligopaar	Östrogenrezeptor-positive Patientinnen							Gesamtpopulation							Östrogenrezeptor-negative Patientinnen						
		Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert
PITX2 ^a	2	0,35	0,58	0,61	0,6	0,58	0,58	0,024	0,34	0,58	0,6	0,59	0,58	0,59	0,011	0,34	0,58	0,6	0,6	0,6	0,6	0,15
PITX3	3	0,34	0,58	0,61	0,62	0,58	0,58	0,026	0,18	0,53	0,54	0,55	0,53	0,54	0,12	-0,03	0,49	0,49	0,5	0,5	0,5	1,00
LMX1A	4	0,29	0,57	0,59	0,58	0,56	0,58	0,028	0,24	0,55	0,55	0,56	0,55	0,56	0,039	0,3	0,56	0,57	0,58	0,58	0,58	0,31
uPA	1	0,33	0,56	0,58	0,61	0,58	0,56	0,029	0,29	0,55	0,55	0,58	0,57	0,56	0,022	0,26	0,53	0,53	0,55	0,55	0,55	0,24
NR5A1	3	0,31	0,58	0,64	0,61	0,57	0,59	0,029	0,21	0,55	0,58	0,56	0,55	0,56	0,086	0,2	0,55	0,56	0,55	0,55	0,55	0,58
LHX4	3	0,22	0,55	0,59	0,56	0,55	0,56	0,031	0,11	0,52	0,54	0,53	0,52	0,53	0,12	0,1	0,51	0,51	0,52	0,52	0,52	0,57
NR5A1	2	0,29	0,56	0,59	0,59	0,58	0,56	0,032	0,23	0,55	0,56	0,57	0,57	0,55	0,054	0,1	0,52	0,5	0,54	0,54	0,54	0,65
LHX3	4	0,3	0,56	0,59	0,57	0,56	0,56	0,034	0,21	0,53	0,54	0,54	0,54	0,54	0,067	0,14	0,53	0,52	0,53	0,53	0,53	0,51
ZNFN1A1	1	0,33	0,57	0,6	0,6	0,56	0,57	0,038	0,18	0,54	0,54	0,55	0,53	0,55	0,19	-0,07	0,47	0,46	0,47	0,47	0,47	0,78
CCND2	1	0,32	0,56	0,59	0,59	0,58	0,57	0,047	0,37	0,57	0,59	0,59	0,58	0,58	0,011	0,59	0,61	0,63	0,62	0,62	0,62	0,10
NR5A1	4	0,3	0,56	0,61	0,57	0,57	0,56	0,052	0,09	0,52	0,53	0,53	0,52	0,52	0,51	0,37	0,58	0,62	0,58	0,58	0,58	0,14
ZNFN1A1	2	0,28	0,56	0,6	0,57	0,56	0,55	0,055	0,2	0,54	0,56	0,54	0,53	0,54	0,11	0,19	0,54	0,54	0,52	0,52	0,52	0,60
LHX3	5	0,36	0,56	0,58	0,57	0,55	0,55	0,063	0,32	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,065	0,32	0,56	0,56	0,57	0,57	0,57	0,23
GATA4	2	0,26	0,57	0,57	0,59	0,59	0,6	0,064	0,2	0,55	0,55	0,57	0,57	0,58	0,15	0,18	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,92
PITX3	2	0,24	0,54	0,57	0,56	0,54	0,54	0,070	0,01	0,49	0,48	0,5	0,49	0,49	0,50	0,82	0,63	0,68	0,64	0,64	0,64	0,028
ISL1	4	0,29	0,55	0,54	0,56	0,56	0,57	0,073	0,2	0,53	0,51	0,54	0,54	0,54	0,23	0,12	0,51	0,51	0,53	0,53	0,53	0,95
ISL1	1	0,3	0,56	0,56	0,58	0,57	0,55	0,075	0,21	0,54	0,52	0,55	0,55	0,54	0,13	0,09	0,51	0,52	0,55	0,55	0,55	0,68
TFF1	3	0,28	0,55	0,55	0,52	0,54	0,57	0,082	0,17	0,54	0,54	0,5	0,53	0,54	0,19	0,09	0,5	0,5	0,53	0,53	0,53	0,79
GATA4	1	0,23	0,56	0,6	0,58	0,57	0,57	0,11	0,3	0,57	0,59	0,58	0,58	0,58	0,015	0,63	0,61	0,64	0,65	0,65	0,65	0,020
ISL1	2	0,2	0,54	0,55	0,55	0,54	0,54	0,12	0,07	0,51	0,51	0,52	0,51	0,52	0,31	0,17	0,53	0,54	0,53	0,53	0,53	0,86
PITX3	1	0,22	0,54	0,57	0,57	0,52	0,52	0,13	0,13	0,52	0,54	0,54	0,51	0,51	0,33	0,16	0,54	0,55	0,55	0,55	0,55	0,52
PITX2 ^c	2	0,29	0,57	0,59	0,58	0,58	0,58	0,14	0,25	0,55	0,55	0,55	0,56	0,57	0,10	0,4	0,55	0,56	0,59	0,59	0,59	0,14
POU4F1	1	0,21	0,56	0,59	0,58	0,56	0,58	0,14	0,17	0,54	0,54	0,54	0,54	0,56	0,14	0,33	0,56	0,58	0,57	0,57	0,57	0,21
LMO2	4	0,27	0,56	0,61	0,6	0,58	0,57	0,15	0,25	0,55	0,57	0,58	0,58	0,57	0,089	0,27	0,55	0,55	0,57	0,57	0,57	0,30
POU4F1	3	0,23	0,55	0,55	0,57	0,55	0,56	0,15	0,19	0,53	0,52	0,54	0,54	0,55	0,21	0,31	0,56	0,58	0,58	0,58	0,58	0,39
LHX4	2	0,27	0,56	0,61	0,58	0,55	0,56	0,16	0,22	0,55	0,57	0,56	0,54	0,55	0,18	0,05	0,51	0,47	0,52	0,52	0,52	0,73
LHX3	1	0,21	0,54	0,6	0,57	0,54	0,52	0,17	0,23	0,54	0,57	0,56	0,54	0,53	0,080	0,47	0,58	0,59	0,59	0,59	0,59	0,10
GAD1	3	0,2	0,53	0,54	0,54	0,52	0,52	0,18	0,17	0,52	0,52	0,53	0,52	0,52	0,19	0,24	0,53	0,54	0,55	0,55	0,55	0,40

Gen	Oligopaar	Östrogenrezeptor-positive Patientinnen							Gesamtpopulation							Östrogenrezeptor-negative Patientinnen						
		Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert	Sep	K-Index	36AUC	48AUC	60AUC	72AUC	p-Wert
LMX1A	1	0,17	0,54	0,57	0,56	0,56	0,55	0,18	0,05	0,5	0,5	0,51	0,52	0,52	0,50	0,26	0,58	0,62	0,58	0,58	0,58	0,42
PITX2 ^c	3	0,16	0,52	0,5	0,54	0,52	0,54	0,29	0,02	0,51	0,54	0,51	0,51	0,49	0,91	0,34	0,54	0,58	0,58	0,58	0,58	0,22
GAD1	4	0,14	0,52	0,55	0,54	0,51	0,51	0,31	0,12	0,52	0,52	0,53	0,51	0,51	0,35	0,16	0,53	0,52	0,54	0,54	0,54	0,57
LMO2	1	0,14	0,55	0,61	0,58	0,55	0,54	0,31	0,11	0,53	0,55	0,55	0,54	0,53	0,36	0,14	0,51	0,5	0,52	0,52	0,52	0,72
PITX3	5	0,15	0,54	0,6	0,58	0,54	0,52	0,32	0,08	0,52	0,54	0,54	0,51	0,51	0,46	0,09	0,52	0,5	0,51	0,51	0,51	0,78
PITX2 ^c	5	0,1	0,53	0,5	0,53	0,55	0,55	0,34	0,05	0,51	0,48	0,51	0,53	0,53	0,37	0,16	0,55	0,54	0,55	0,55	0,55	0,28
PITX2 ^a	1	0,16	0,55	0,59	0,57	0,54	0,54	0,35	0,17	0,55	0,57	0,56	0,55	0,55	0,39	0,21	0,56	0,57	0,57	0,57	0,57	0,80
TFF1	2	0,13	0,56	0,59	0,59	0,58	0,56	0,41	0,08	0,53	0,53	0,55	0,55	0,54	0,57	0,09	0,51	0,49	0,52	0,52	0,52	0,82
POU4F1	4	0,15	0,53	0,55	0,54	0,53	0,52	0,41	0,09	0,51	0,51	0,52	0,52	0,52	0,69	0,21	0,54	0,54	0,56	0,56	0,56	0,85
GAD1	1	0,09	0,51	0,54	0,53	0,51	0,51	0,43	0,12	0,52	0,52	0,53	0,52	0,52	0,41	0,29	0,54	0,54	0,56	0,56	0,56	0,57
TFF1	1	0,1	0,53	0,55	0,55	0,55	0,55	0,45	0,11	0,53	0,54	0,55	0,55	0,55	0,45	0,08	0,51	0,5	0,53	0,53	0,53	0,97
POU4F1	2	0,1	0,53	0,56	0,54	0,54	0,54	0,45	0,01	0,5	0,49	0,5	0,51	0,52	0,79	0,05	0,49	0,49	0,51	0,51	0,51	0,83
BMP2	4	0,13	0,55	0,59	0,56	0,54	0,53	0,47	0,13	0,55	0,58	0,56	0,54	0,54	0,30	0,06	0,51	0,5	0,52	0,52	0,52	0,58
LHX3	3	0,13	0,54	0,59	0,55	0,53	0,53	0,48	0,05	0,52	0,53	0,52	0,51	0,51	0,80	0	0,49	0,53	0,51	0,51	0,51	0,90
CCND2	3	0,11	0,53	0,57	0,58	0,53	0,51	0,53	0,02	0,51	0,5	0,54	0,51	0,5	0,81	0,14	0,52	0,59	0,53	0,53	0,53	0,77
PITX2 ^a	4	0,11	0,55	0,6	0,56	0,55	0,56	0,54	0,07	0,53	0,56	0,55	0,54	0,55	0,64	0,07	0,52	0,52	0,49	0,49	0,49	0,97
LHX3	2	0,06	0,51	0,48	0,51	0,52	0,52	0,62	0,03	0,52	0,56	0,52	0,51	0,51	0,93	0,25	0,56	0,63	0,6	0,6	0,6	0,44
GAD1	2	0,08	0,52	0,57	0,55	0,53	0,51	0,64	0,08	0,52	0,54	0,53	0,53	0,51	0,64	0,36	0,57	0,57	0,6	0,6	0,6	0,35
PITX2 ^c	1	0,09	0,54	0,57	0,57	0,54	0,52	0,67	0	0,51	0,52	0,53	0,51	0,5	0,99	0,13	0,51	0,52	0,53	0,53	0,53	0,85
TCF4	1	0,09	0,54	0,58	0,54	0,53	0,53	0,79	0,12	0,53	0,55	0,54	0,53	0,53	0,35	0,14	0,52	0,51	0,52	0,52	0,52	0,12
TCF4	2	0,05	0,52	0,56	0,53	0,5	0,51	0,88	0,03	0,52	0,55	0,53	0,51	0,51	0,89	0,11	0,52	0,54	0,53	0,53	0,53	0,70
PITX3	4	-0,02	0,51	0,51	0,49	0,52	0,52	0,91	0,03	0,52	0,53	0,51	0,53	0,52	0,64	0,04	0,51	0,51	0,52	0,52	0,52	0,83
LMO2	2	0,05	0,52	0,57	0,52	0,5	0,52	0,91	0,06	0,49	0,46	0,49	0,51	0,5	0,71	0,43	0,56	0,59	0,58	0,58	0,58	0,25
PITX2 ^c	4	0,04	0,49	0,48	0,48	0,5	0,5	0,97	0,08	0,54	0,55	0,55	0,53	0,52	0,42	0,36	0,56	0,57	0,57	0,57	0,57	0,20

^a Promotor der Transkripte A und B, ^c Promotor des Transkripts C

8.3 Mikrodissezierte Proben

Tabelle 19: Mikrodissezierte Proben. Dargestellt sind die Nummer der LMD Probe, die Nummer des Paraffinblocks und der Patientin, von dem diese abstammt, die die Art der Tumorkomponente und die Verknüpfung zu den entsprechenden Fotos der Proben. Ebenfalls aufgelistet sind die makrodissezierte Proben und Prozesskontrollen, sowie die Dicke der angefertigten Mikrodissektionsschnitte.

Probe	Paraffin-block	Patientin	Schnitt-dicke [µm]	Gewebe	Anmerkung	Abbildung / Seite
LMD1	1	A	5	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 39 / S. 169
LMD2	1	A	5	IDC		Abb. 40 / S. 170
LMD3	1	A	5	Stroma		Abb. 41 / S. 171
LMD4	1	A	5	IDC		Abb. 42 / S. 172
LMD5	1	A	5	IDC		Abb. 43 / S. 173
LMD6	2	A	5	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 44 / S. 174
LMD7	2	A	5	IDC		Abb. 45 / S. 175
LMD8	2	A	5	Stroma		Abb. 46 / S. 176
LMD9	3	A	5	Muskel	makrodisseziert	
LMD10	3	A	5	Fett	makrodisseziert	
LMD11	-	A	5	-	Prozesskontrolle	
LMD12	2	A	5	IDC		Abb. 47 / S. 177
LMD13	2	A	5	IDC		Abb. 48 / S. 178
LMD14	2	A	5	Stroma		Abb. 49 / S. 179
LMD15	4	A	5	normale Duktuli		Abb. 50 / S. 180
LMD16	4	A	5	normale Duktuli		Abb. 51 / S. 181
LMD17	4	A	5	normale Duktuli		Abb. 51 / S. 181
LMD18	4	A	5	normale Duktuli		Abb. 52 / S. 182
LMD19	4	A	5	Stroma		Abb. 52 / S. 182
LMD20	4	A	5	normale Duktuli		Abb. 53 / S. 183
LMD21	4	A	5	Stroma		Abb. 53 / S. 183
LMD22	5	A	5	IDC		Abb. 54 / S. 184
LMD23	5	A	5	DCIS		Abb. 55 / S. 184
LMD24	-	A	5	-	Prozesskontrolle	
LMD25	3	A	5	Muskel		Abb. 55 / S. 185
LMD26	3	A	5	Fett		Abb. 55 / S. 185
LMD27	6	B	3	DCIS		Abb. 56 / S. 186
LMD28	6	B	3	DCIS		Abb. 56 / S. 186
LMD29	6	B	3	IDC		Abb. 57 / S. 187
LMD30	6	B	3	normale Duktuli		Abb. 58 / S. 188
LMD31	6	B	3	normale Duktuli		Abb. 59 / S. 189
LMD32	6	B	3	normale Duktuli		Abb. 60 / S. 190
LMD33	6	B	3	normale Duktuli		Abb. 61 / S. 191
LMD34	6	B	3	Stroma		Abb. 62 / S. 192
LMD35	6	B	3	Stroma		Abb. 62 / S. 192
LMD36	7	B	3	DCIS		Abb. 63 / S. 193
LMD37	7	B	3	DCIS		Abb. 63 / S. 193
LMD38	7	B	3	DCIS		Abb. 63 / S. 193
LMD39	7	B	3	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 63 / S. 193

LMD40	-	B	3	-	Prozesskontrolle	
LMD41	7	B	3	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 64 / S. 194
LMD42	7	B	3	IDC		Abb. 65 / S. 195
LMD43	7	B	3	Stroma		Abb. 64 / S. 194
LMD44	7	B	3	Stroma		Abb. 64 / S. 194
LMD45	8	B	3	normale Duktuli (Adenose)		Abb. 66 / S. 196
LMD46	8	B	3	normale Duktuli (Adenose)		Abb. 66 / S. 196
LMD47	8	B	3	normale Duktuli (Adenose)		Abb. 66 / S. 196
LMD48	8	B	3	normale Duktuli (Adenose)		Abb. 66 / S. 196
LMD49	8	B	3	normale Duktuli		Abb. 67 / S. 197
LMD50	8	B	3	normale Duktuli		Abb. 67 / S. 197
LMD51	8	B	3	Stroma		Abb. 68 / S. 198
LMD52	8	B	3	Stroma		Abb. 69 / S. 199
LMD53	8	B	3	Stroma		Abb. 69 / S. 199
LMD54	-	B	3	-	Prozesskontrolle	
LMD55	9	C	3	DCIS		Abb. 70 / S. 200
LMD56	9	C	3	IDC		Abb. 70 / S. 200
LMD57	9	C	3	IDC		Abb. 71 / S. 201
LMD58	9	C	3	DCIS		Abb. 71 / S. 201
LMD59	9		3	IDC		Abb. 72 / S. 202
LMD60	9	C	3	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 72 / S. 202
LMD61	9	C	3	IDC		Abb. 73 / S. 203
LMD62	9	C	3	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 73 / S. 203
LMD63	9	C	3	Stroma		Abb. 74 / S. 204
LMD64	10		3	DCIS		Abb. 74 / S. 204
LMD65	10	C	3	IDC		Abb. 75 / S. 205
LMD66	10	C	3	IDC		Abb. 75 / S. 205
LMD67	10	C	3	IDC		Abb. 76 / S. 206
LMD68	-	C	3	-	Prozesskontrolle	
LMD69	10	C	3	IDC		Abb. 77 / S. 207
LMD70	10	C	3	normale Duktuli		Abb. 77 / S. 207
LMD71	10	C	3	normale Duktuli		Abb. 78 / S. 208
LMD72	10	C	3	normale Duktuli		Abb. 78 / S. 208
LMD73	10	C	3	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 79 / S. 209
LMD74	10	C	3	Stroma		Abb. 80 / S. 210
LMD75	11	C	3	IDC		Abb. 80 / S. 210
LMD76	11	C	3	normale Duktuli		Abb. 81 / S. 211
LMD77	11	C	3	IDC		Abb. 82 / S. 212
LMD78	11	C	3	normale Duktuli		Abb. 83 / S. 213
LMD79	11	C	3	DCIS		Abb. 82 / S. 212
LMD80	11	C	3	DCIS		Abb. 83 / S. 213
LMD81	11	C	3	infiltrierende Lymphozyten		Abb. 84 / S. 214
LMD82	-		3	-	Prozesskontrolle	
LMD83	11	C	3	Fett	makrodisseziert	
LMD84	10	C	3	Fett	makrodisseziert	
LMD85	9	C	3	Fett	makrodisseziert	

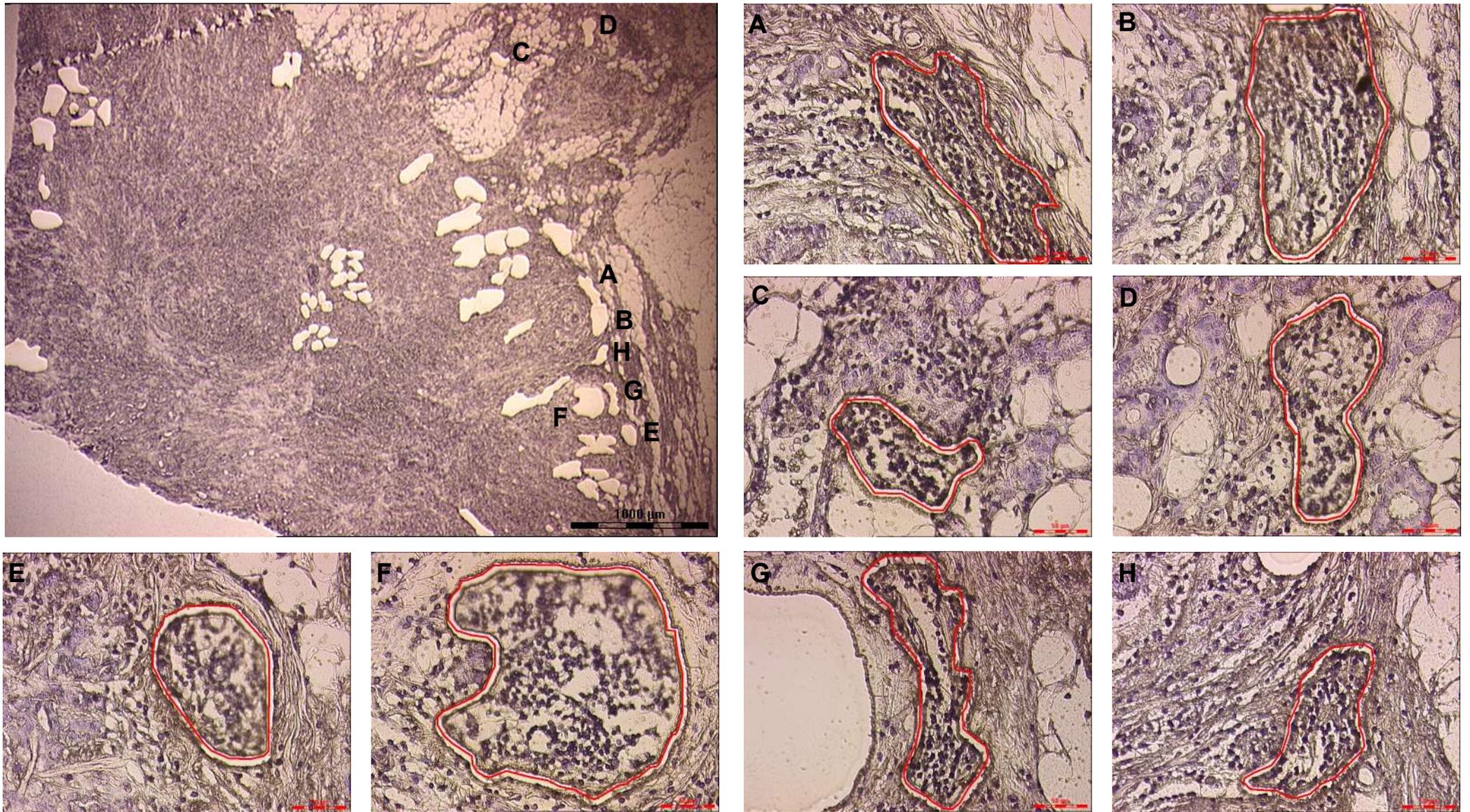


Abbildung 39: LMD Probe 1.

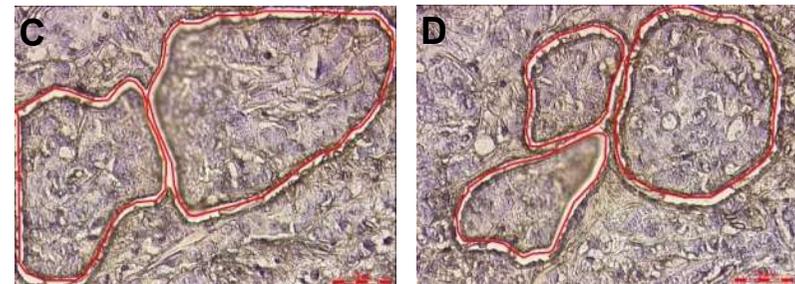
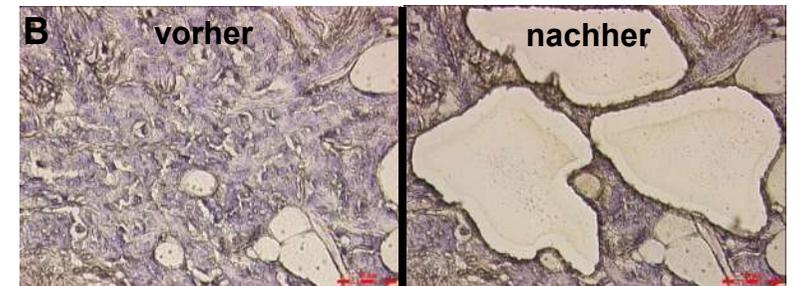
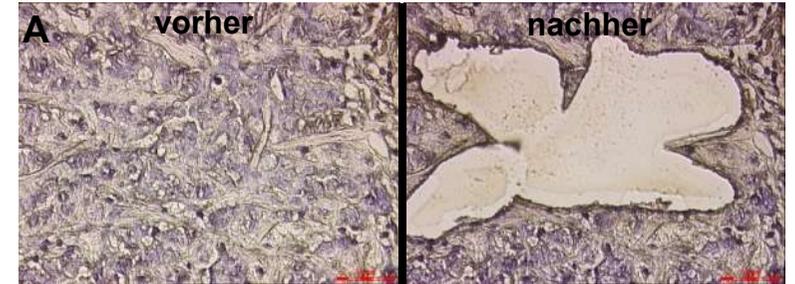
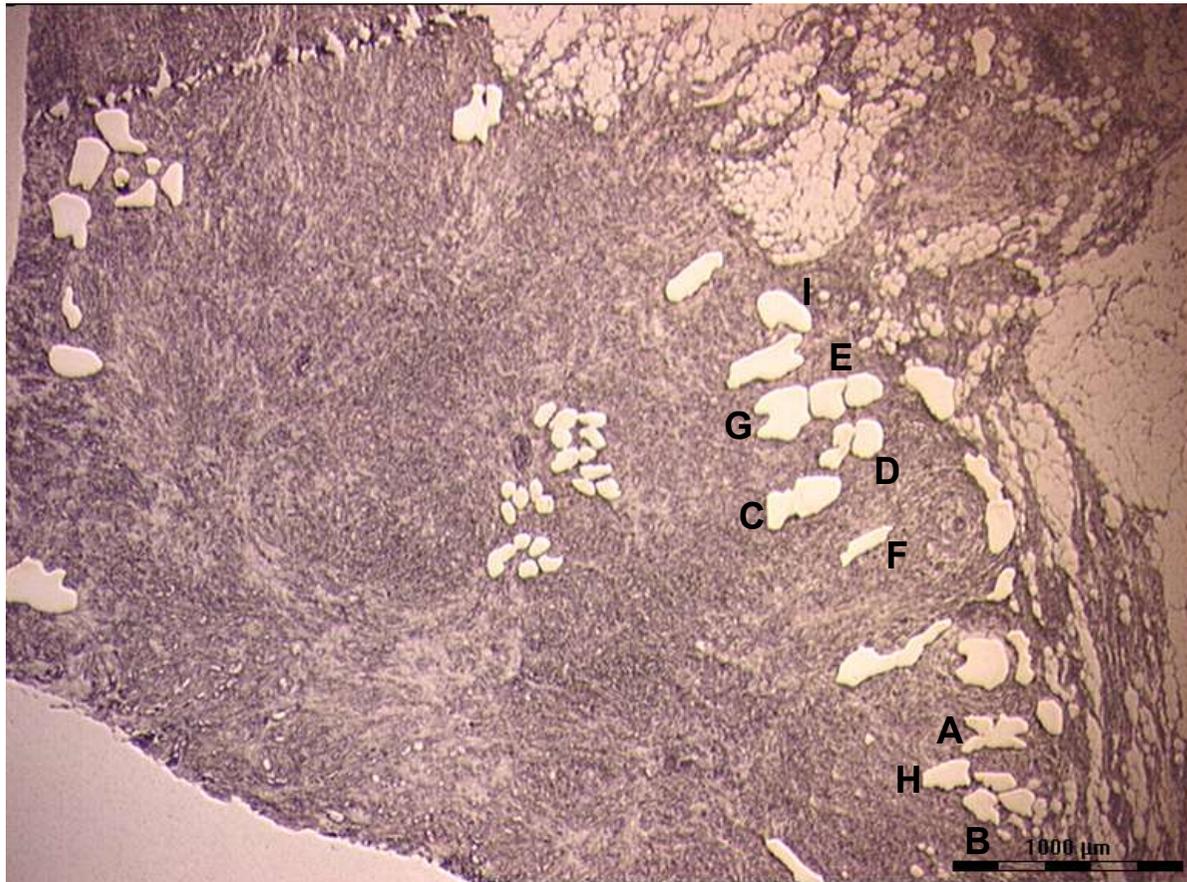


Abbildung 40: LMD Probe 2.

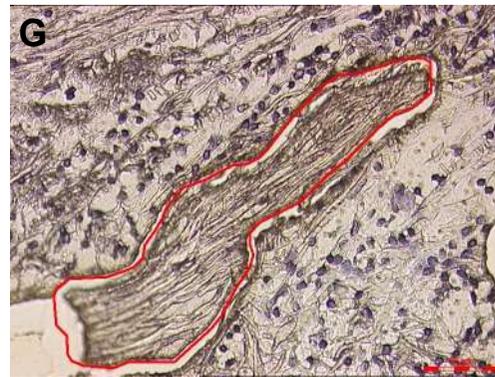
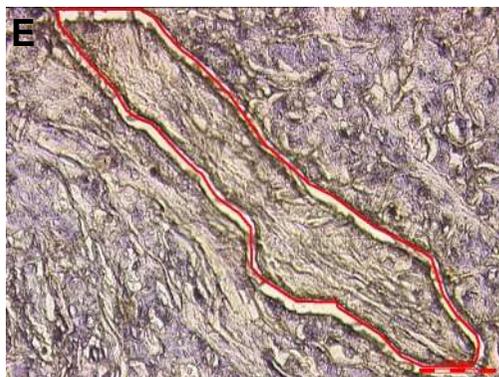
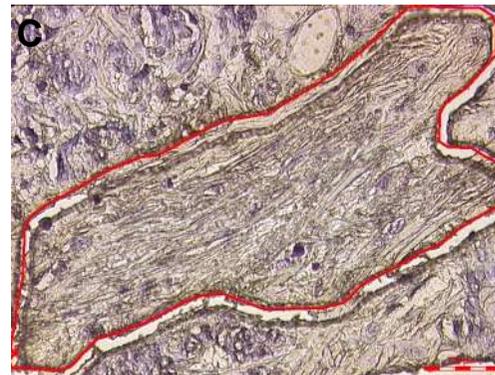
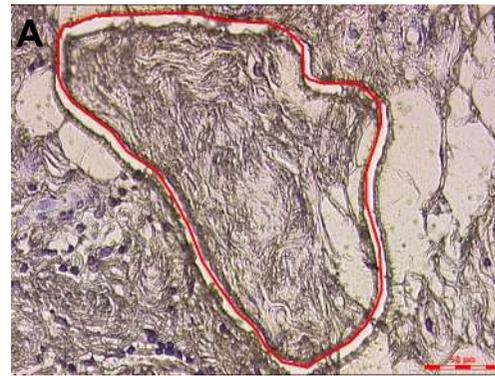
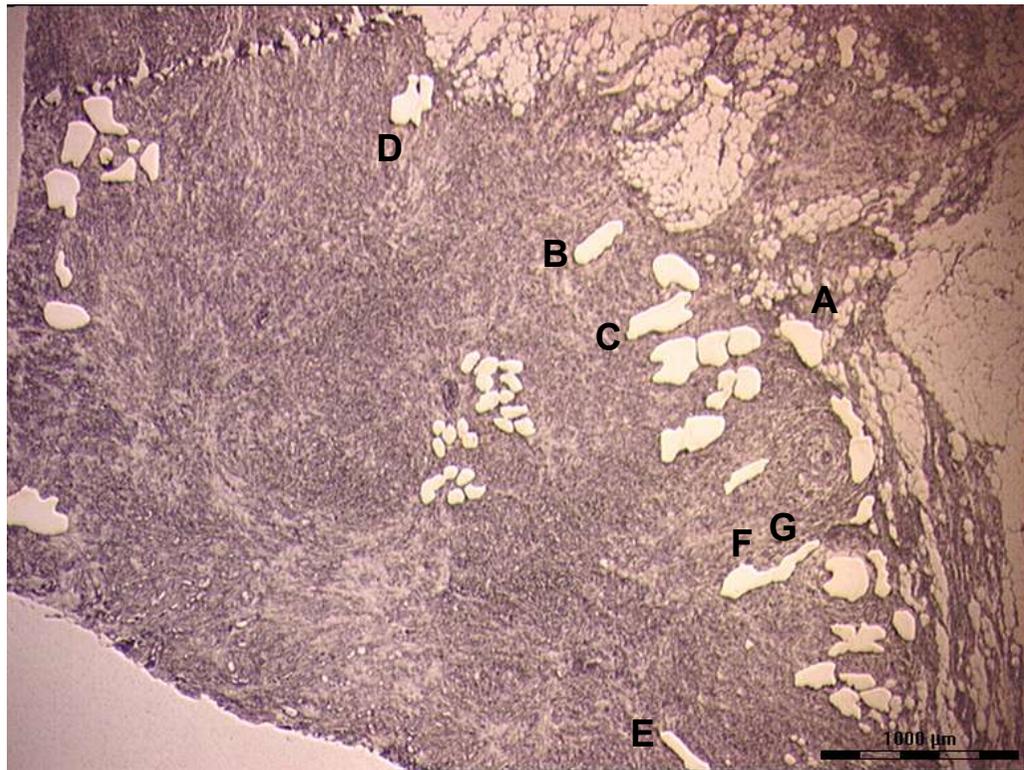


Abbildung 41: LMD Probe 3.

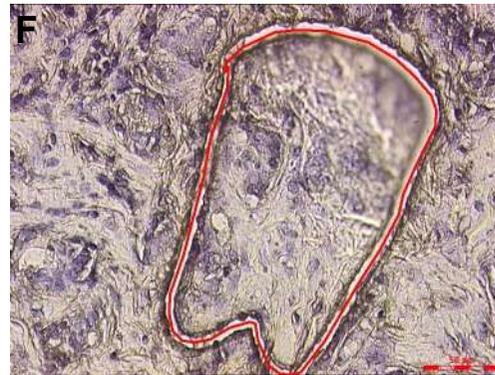
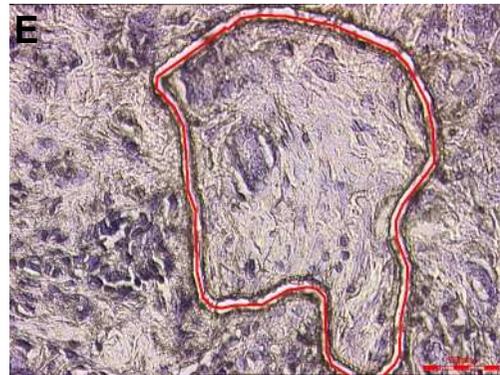
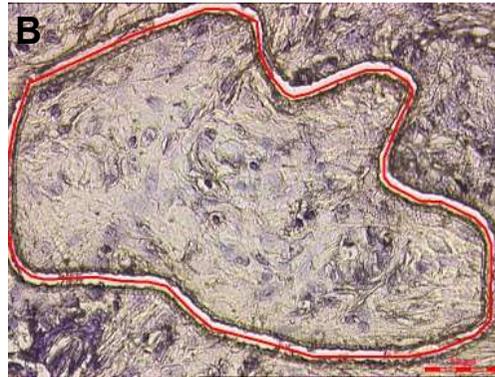
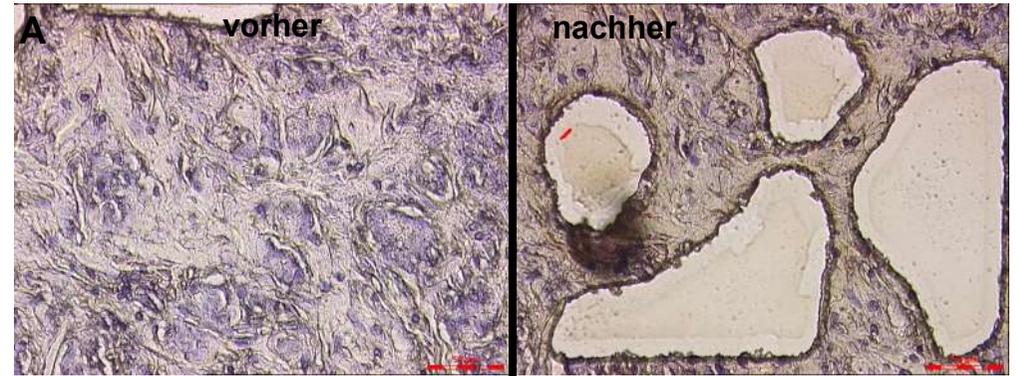
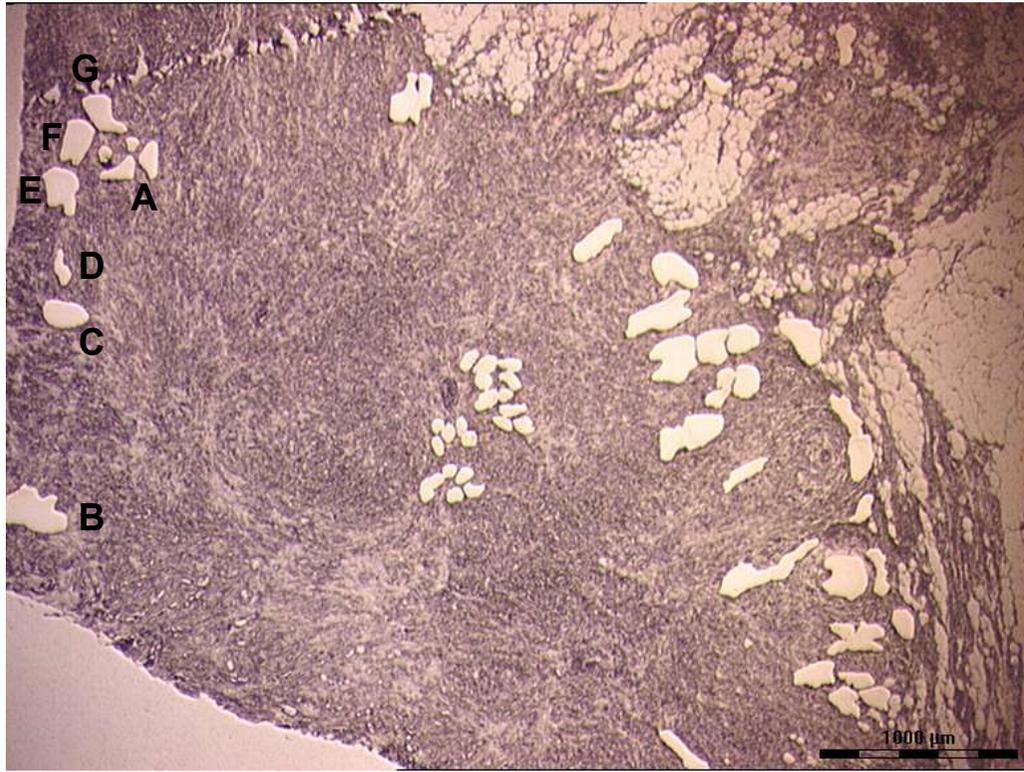


Abbildung 42: LMD Probe 4.

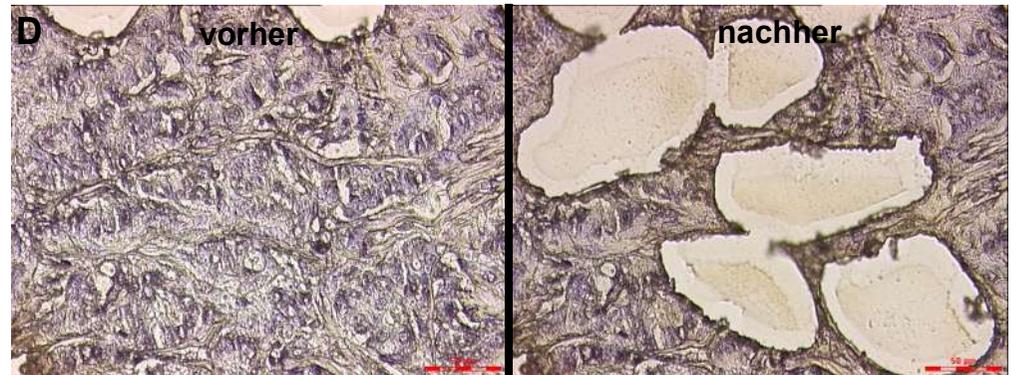
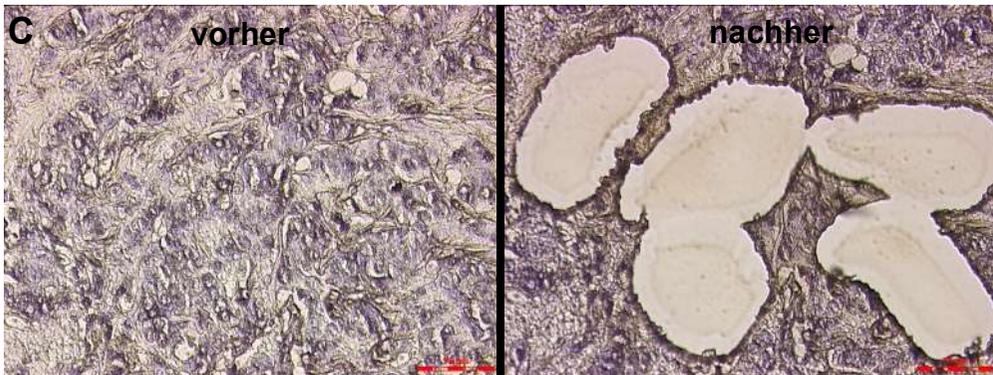
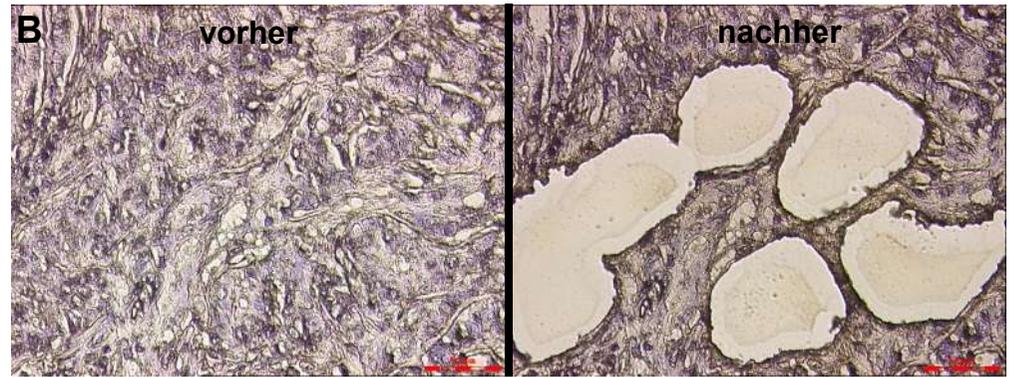
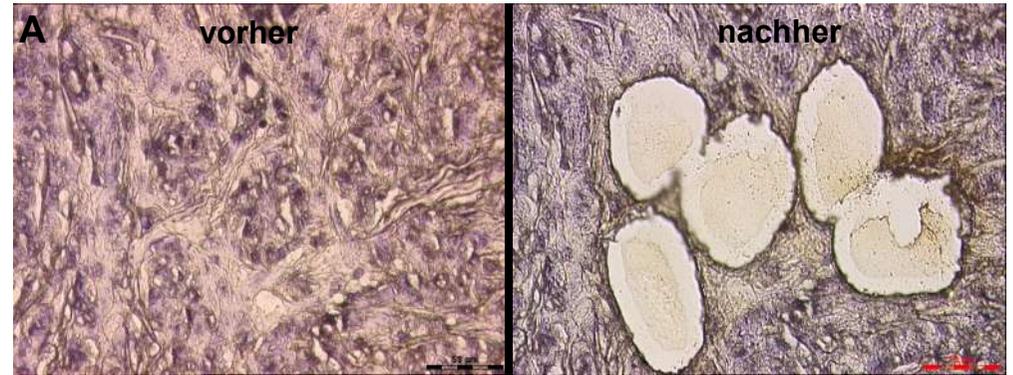
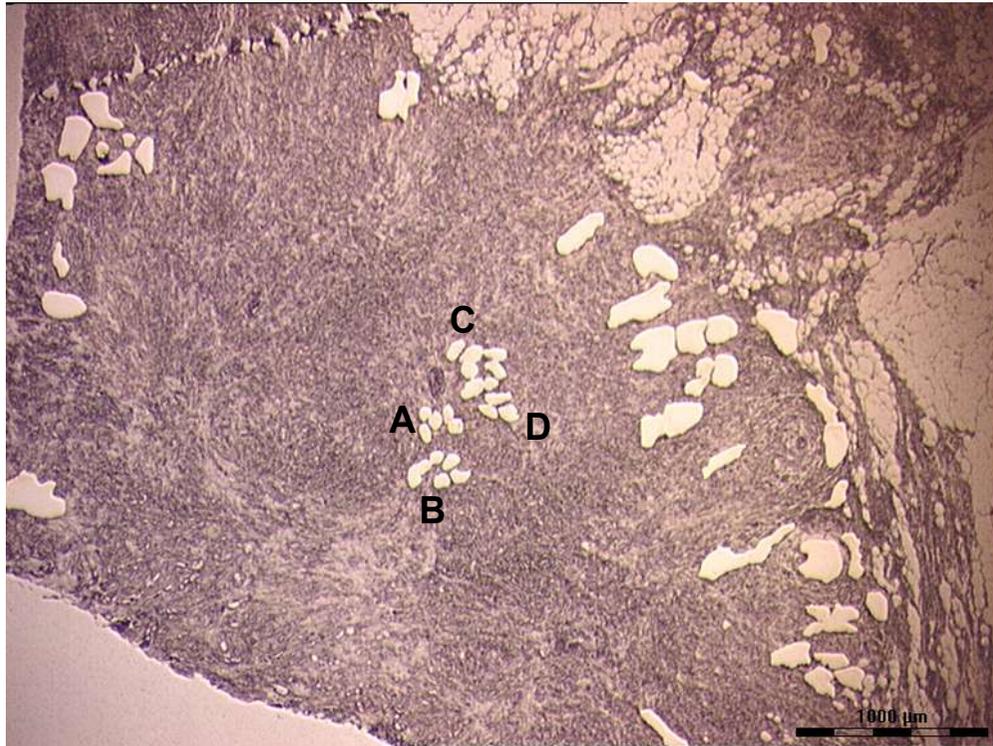


Abbildung 43: LMD Probe 5.

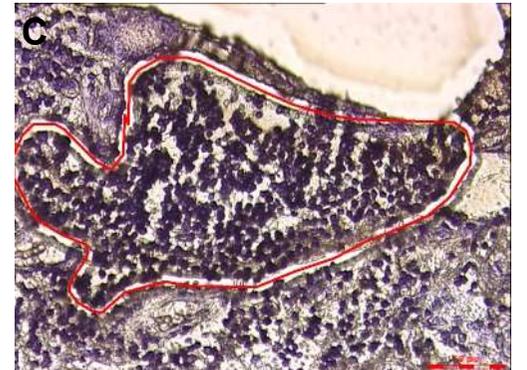
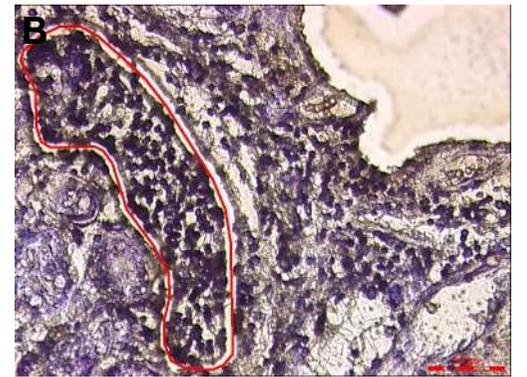
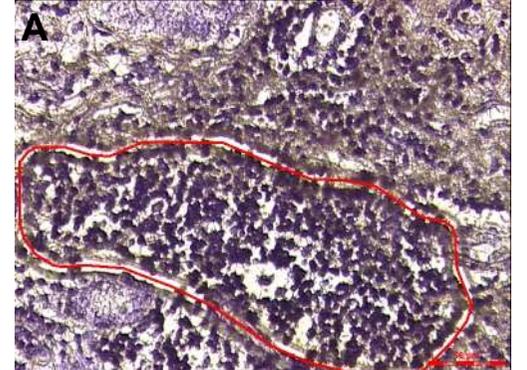
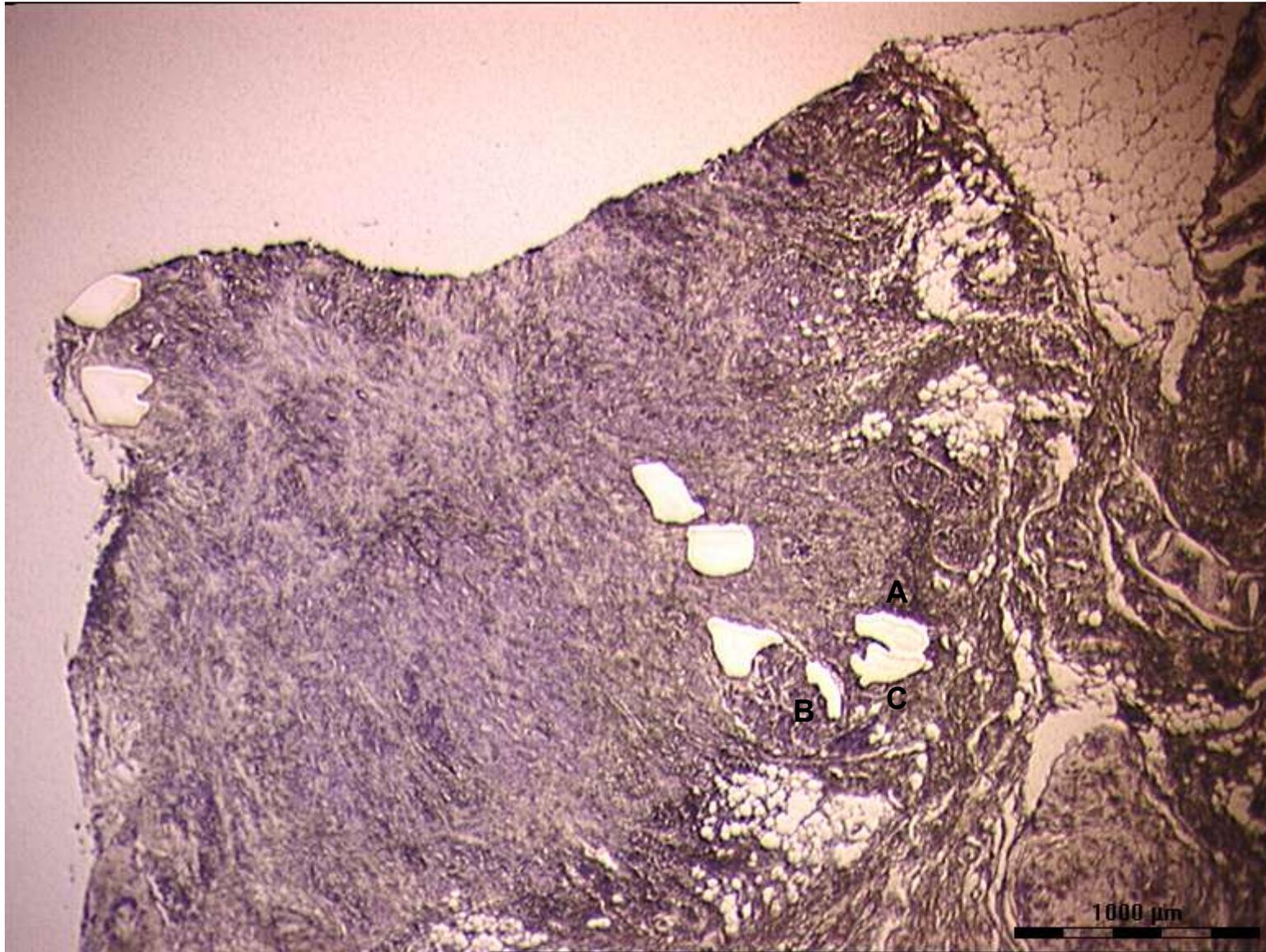


Abbildung 44: LMD Probe 6.

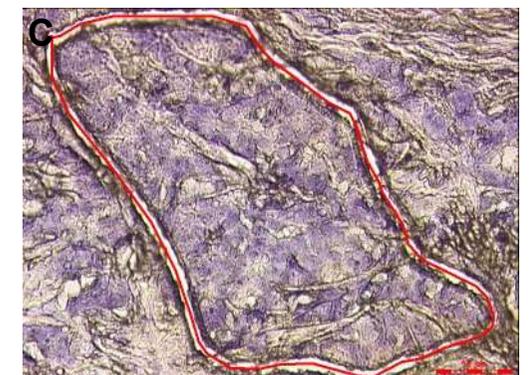
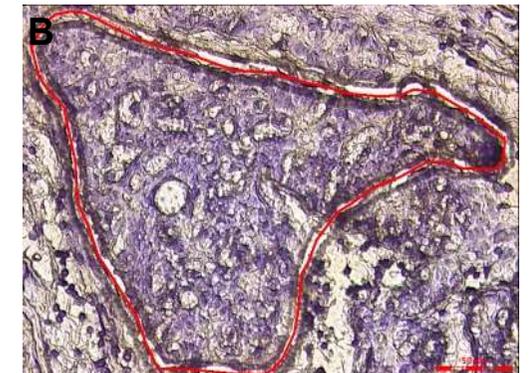
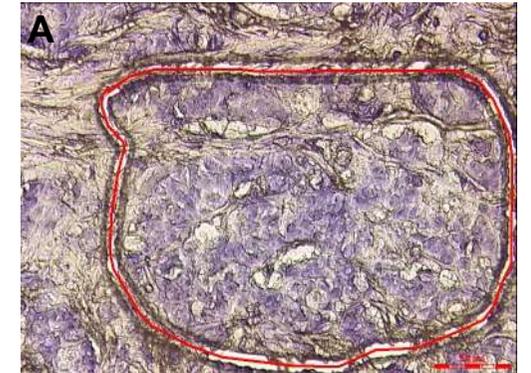
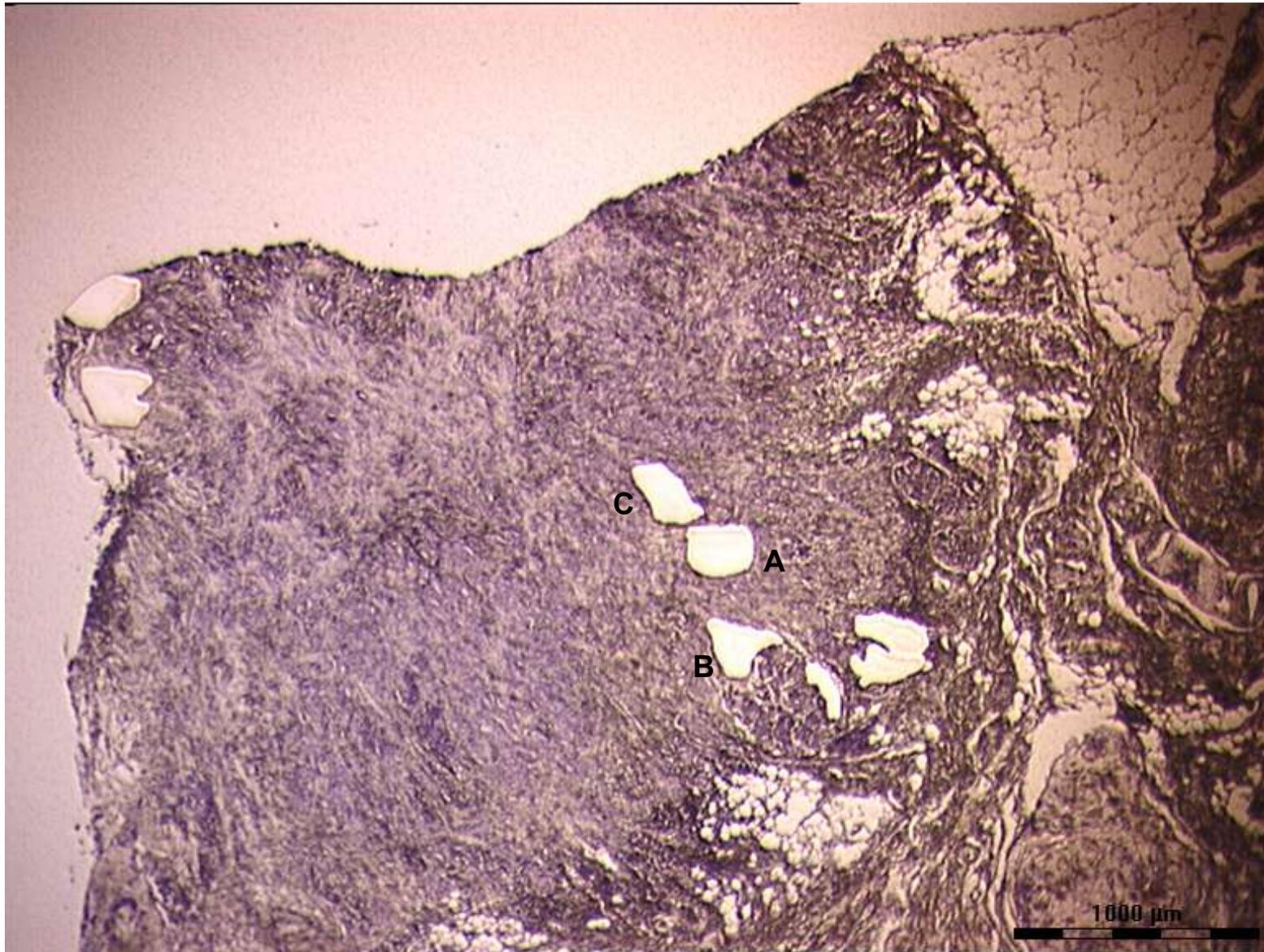


Abbildung 45: LMD Probe 7.

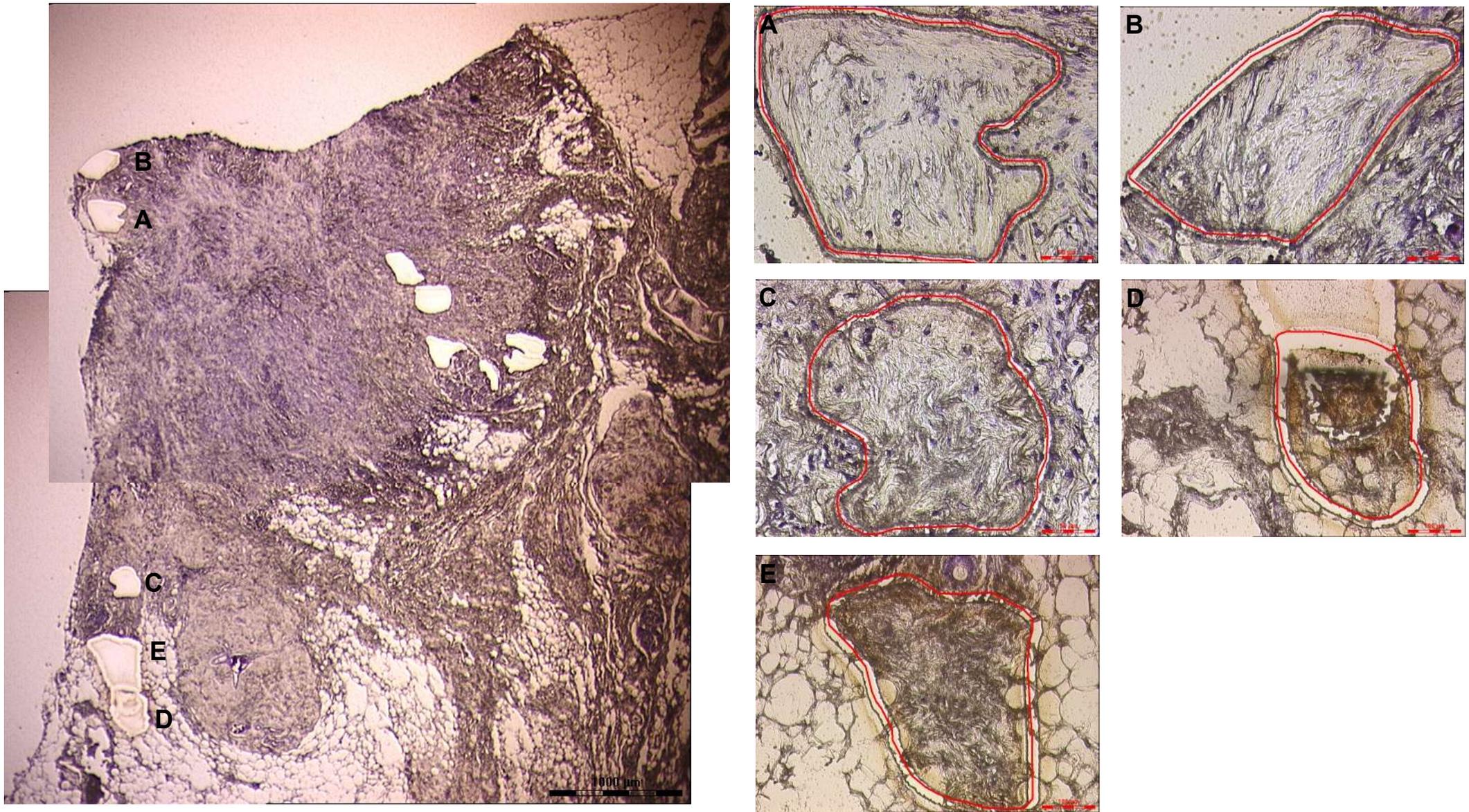


Abbildung 46: LMD Probe 8.

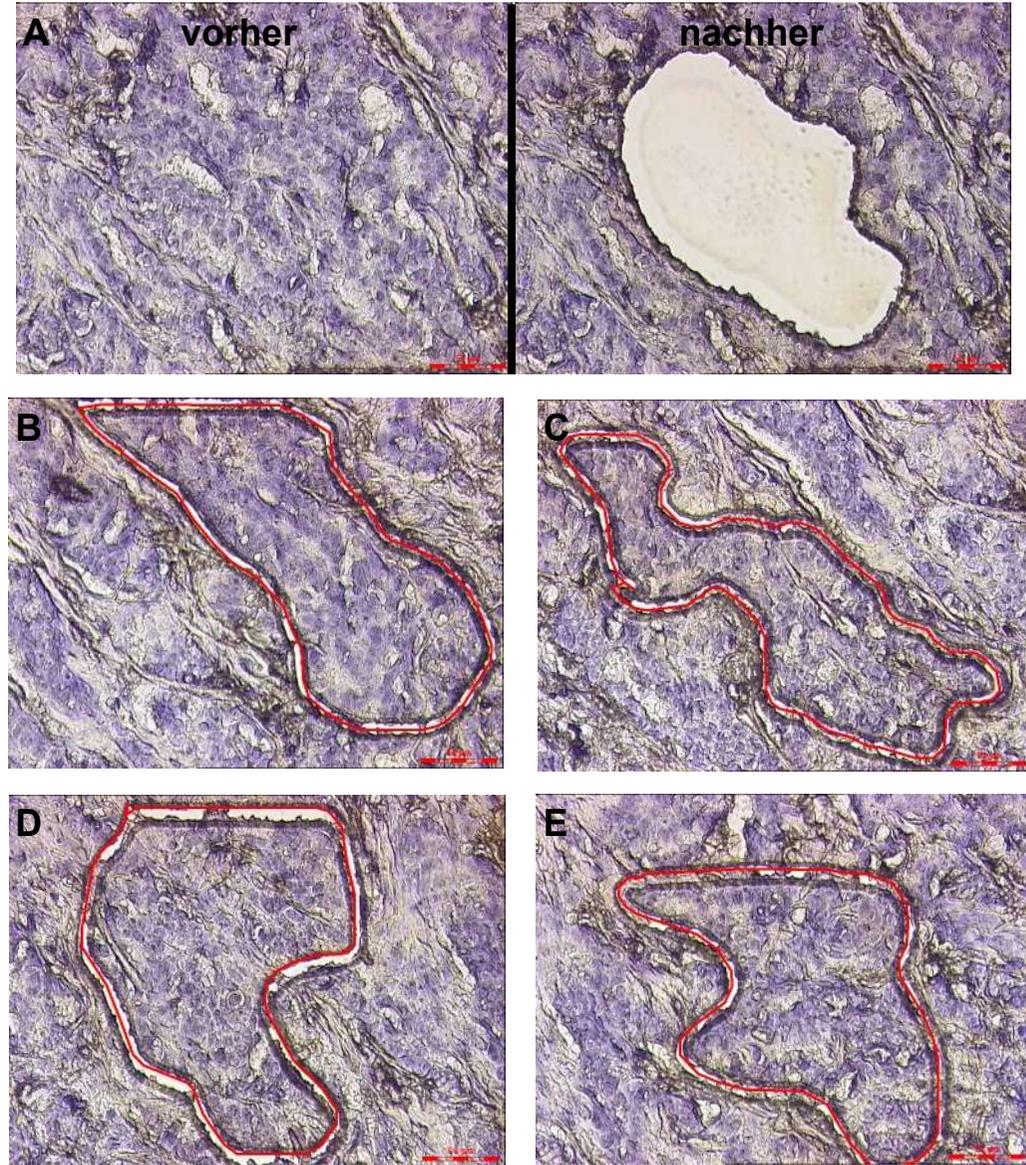


Abbildung 47: LMD Probe 12.

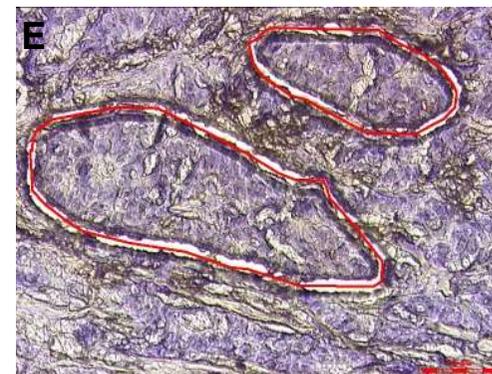
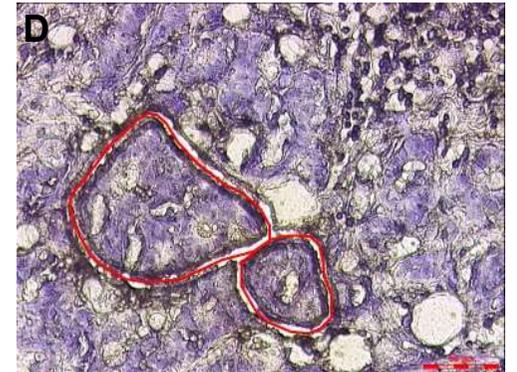
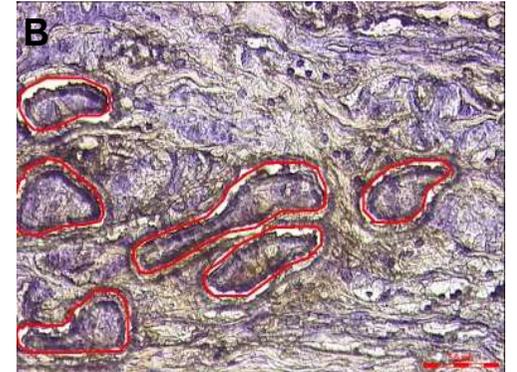
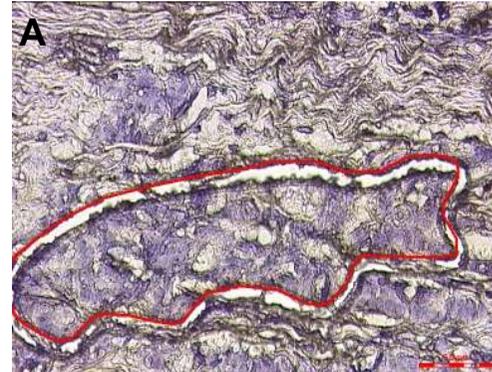
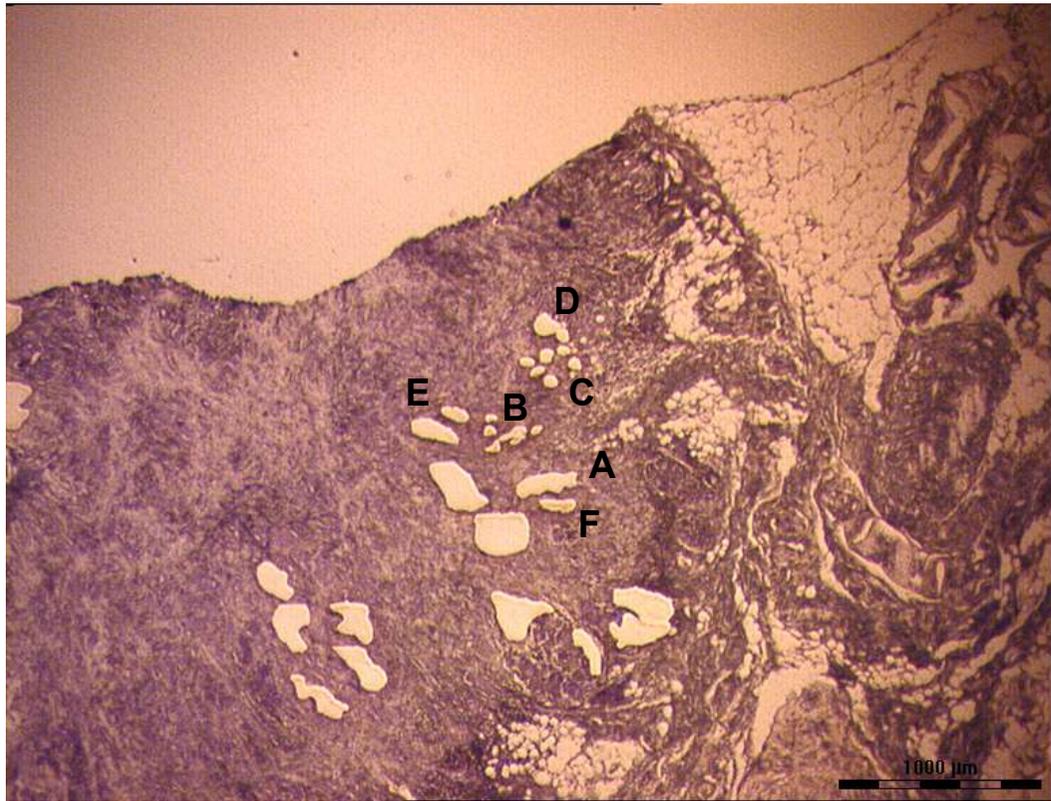


Abbildung 48: LMD Probe 13.

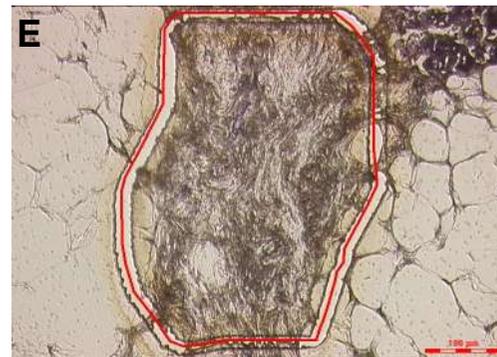
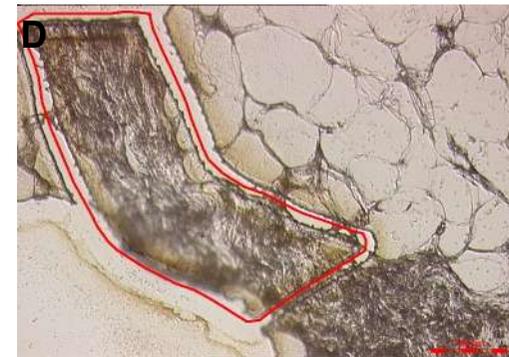
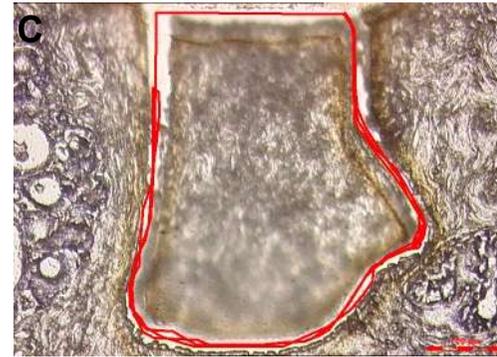
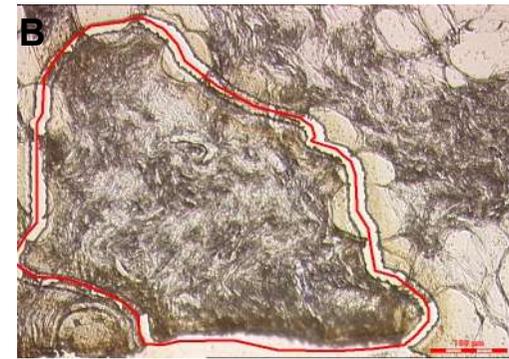
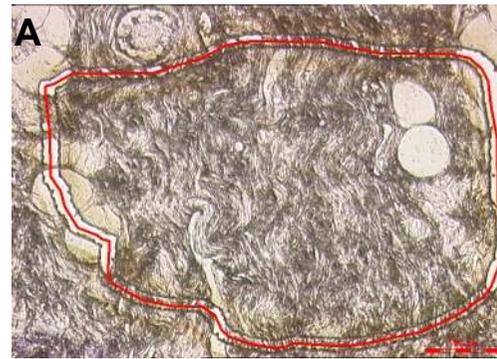
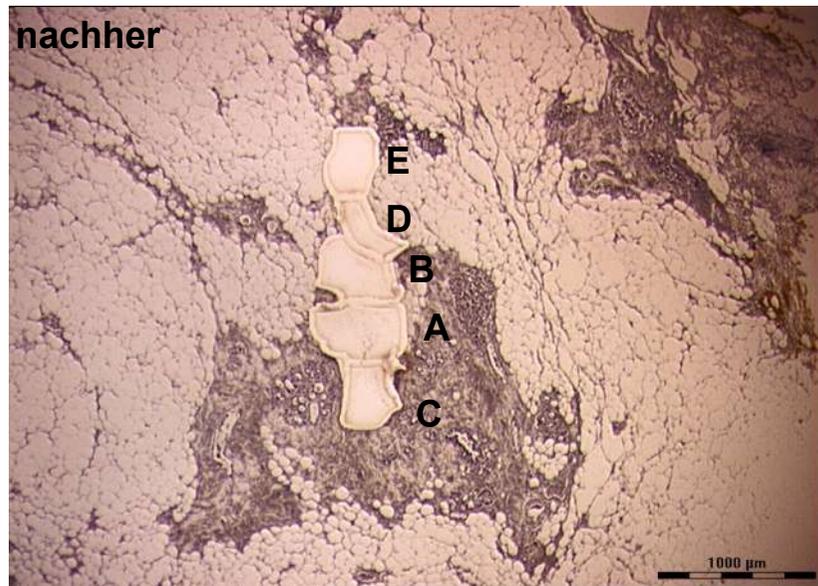
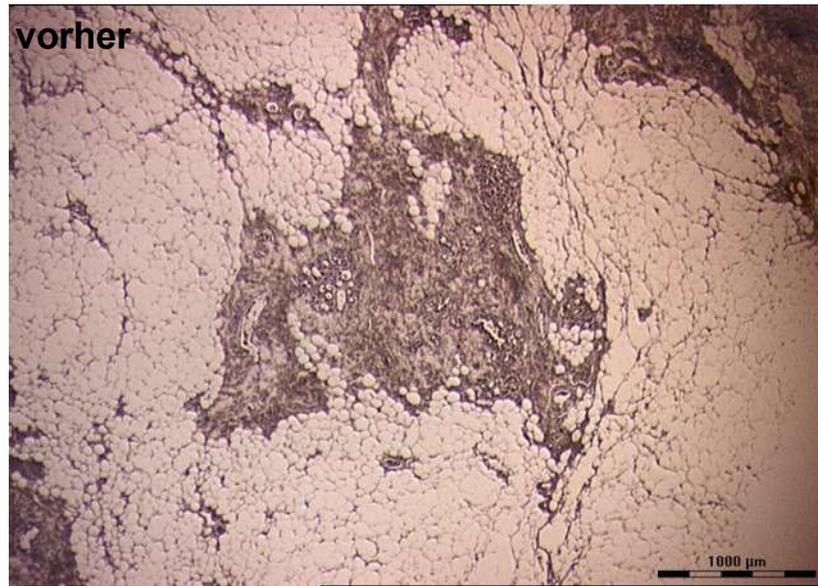


Abbildung 49: LMD Probe 14.

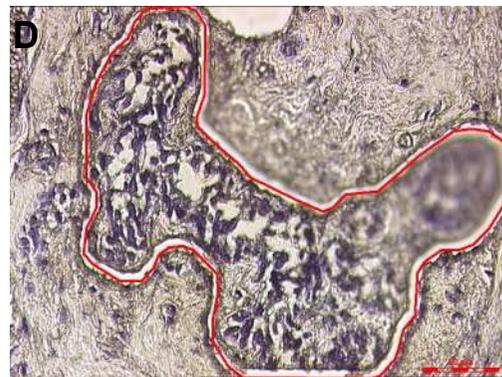
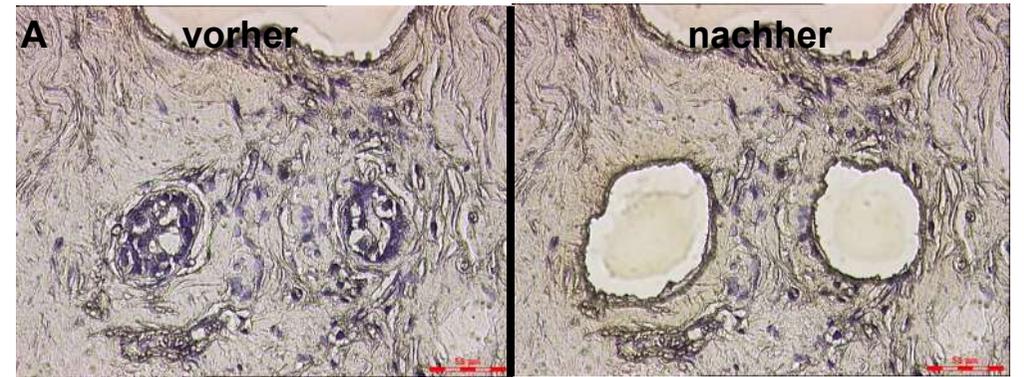
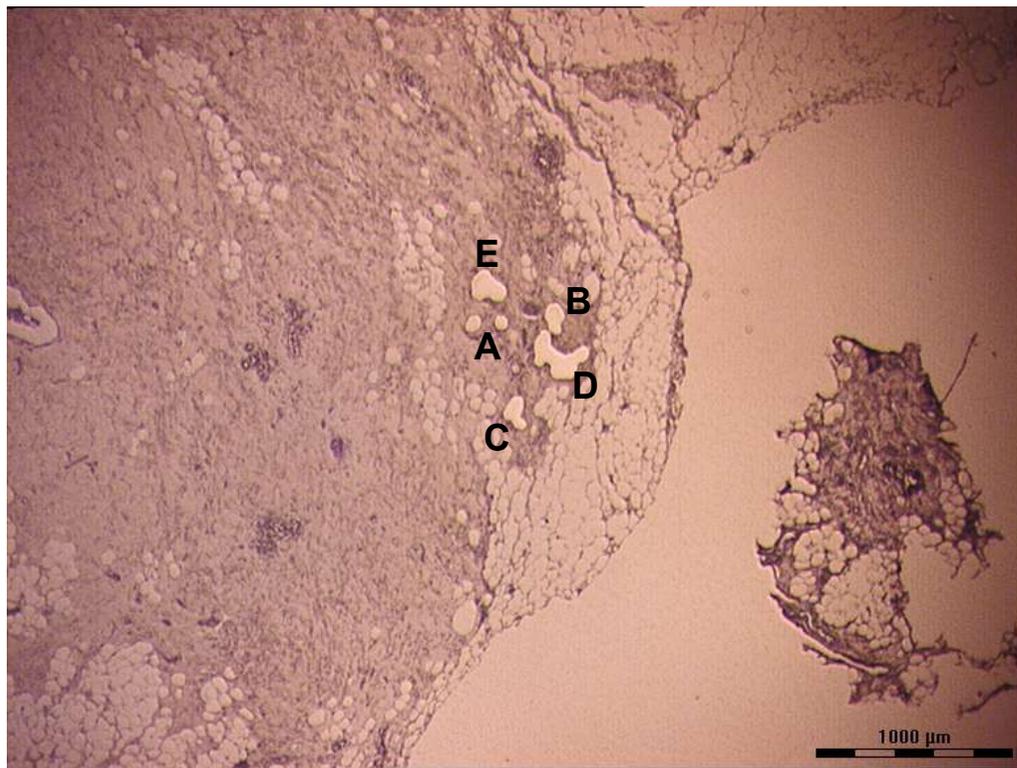


Abbildung 50: LMD Probe 15.

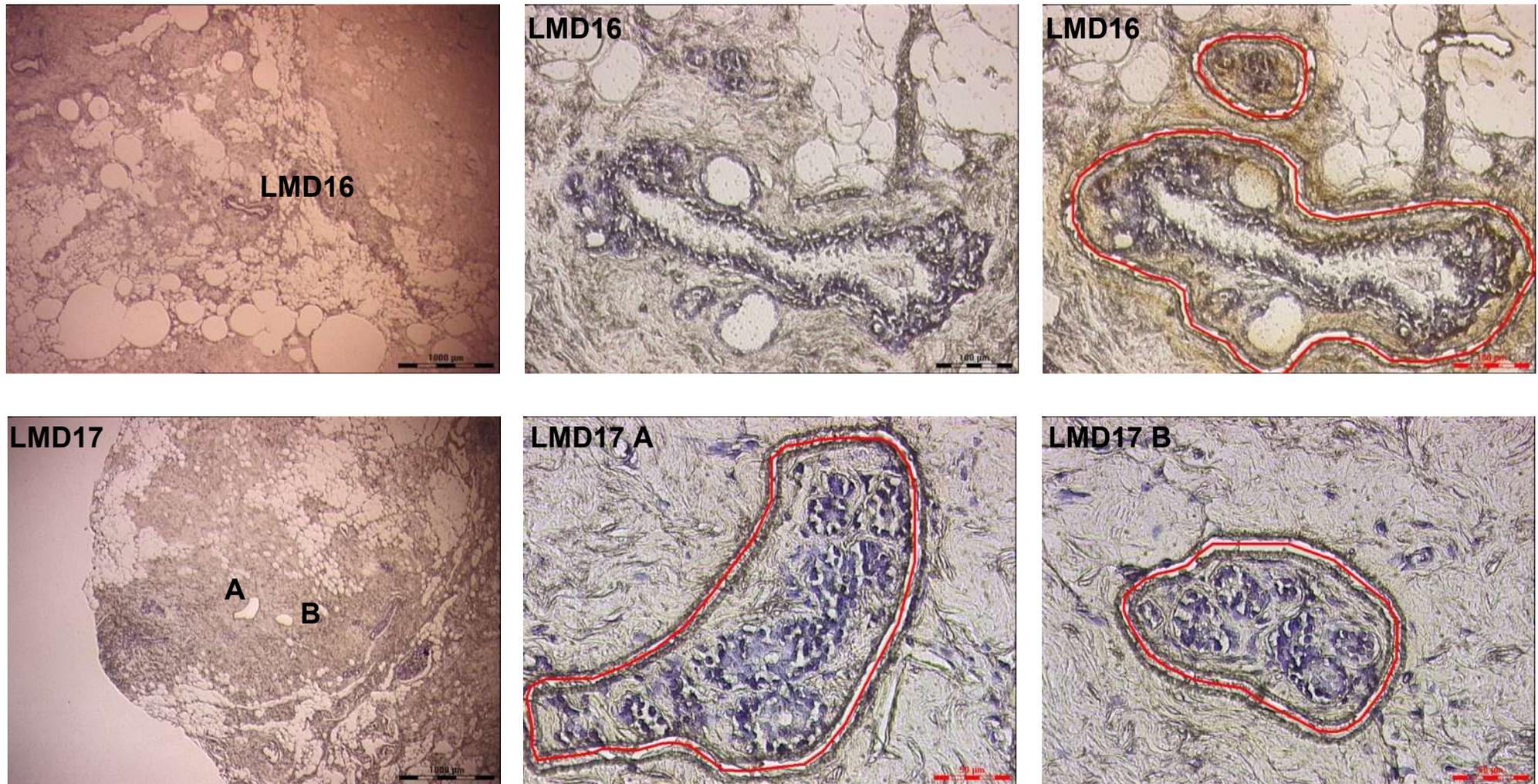


Abbildung 51: LMD Proben 16 und 17.

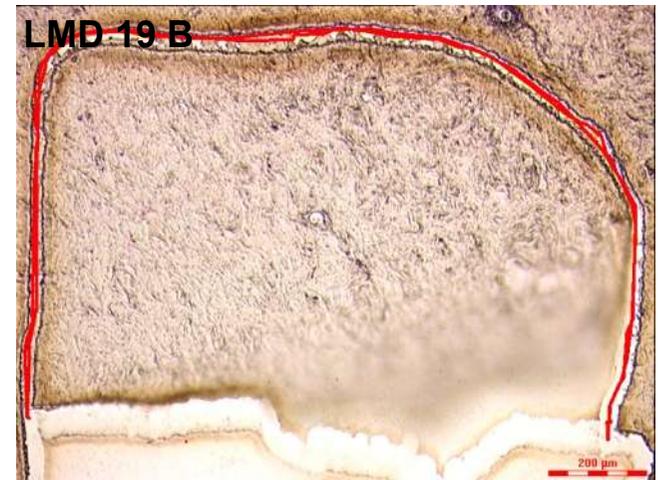
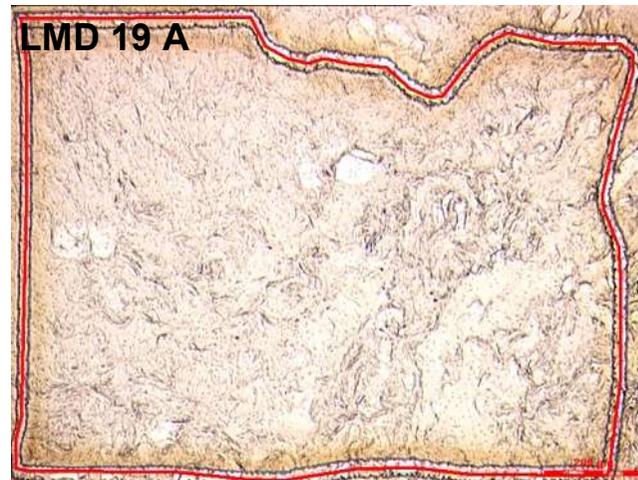
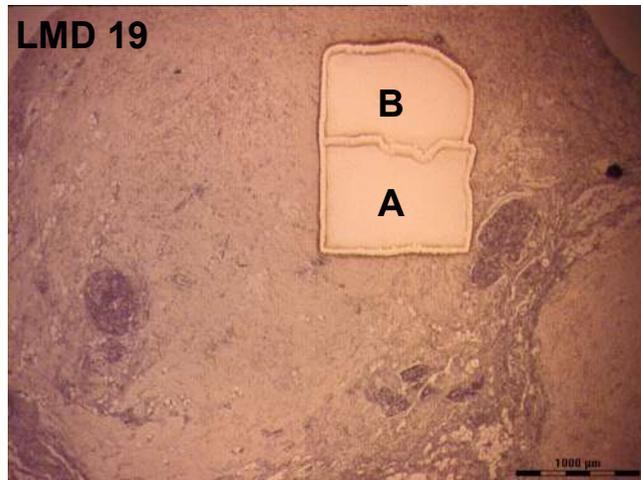
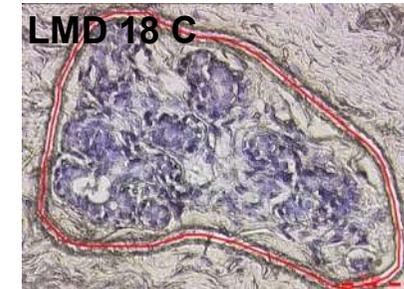
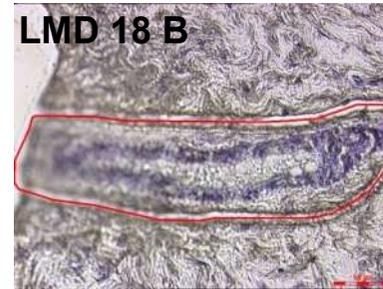
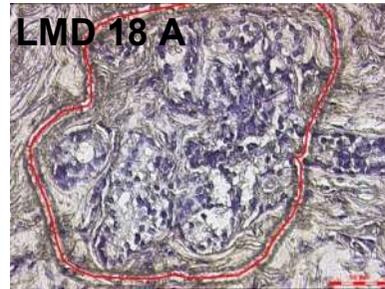
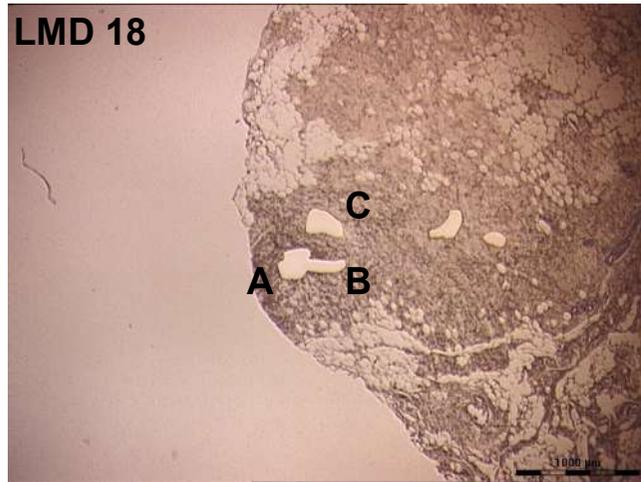


Abbildung 52: LMD Proben 18 und 19.

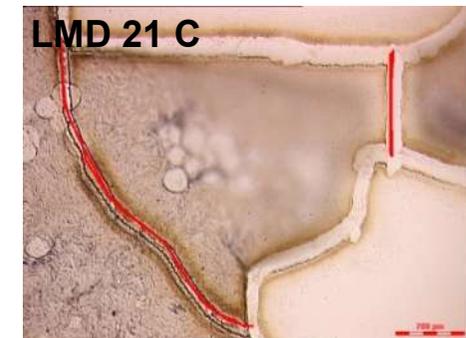
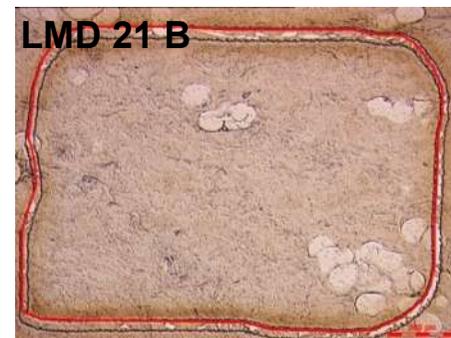
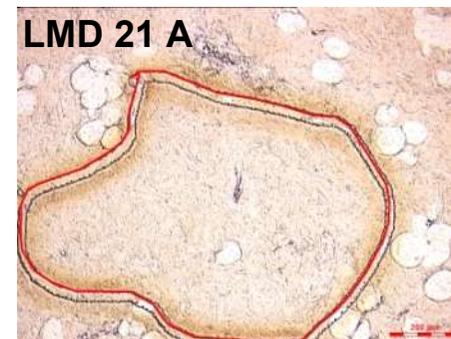
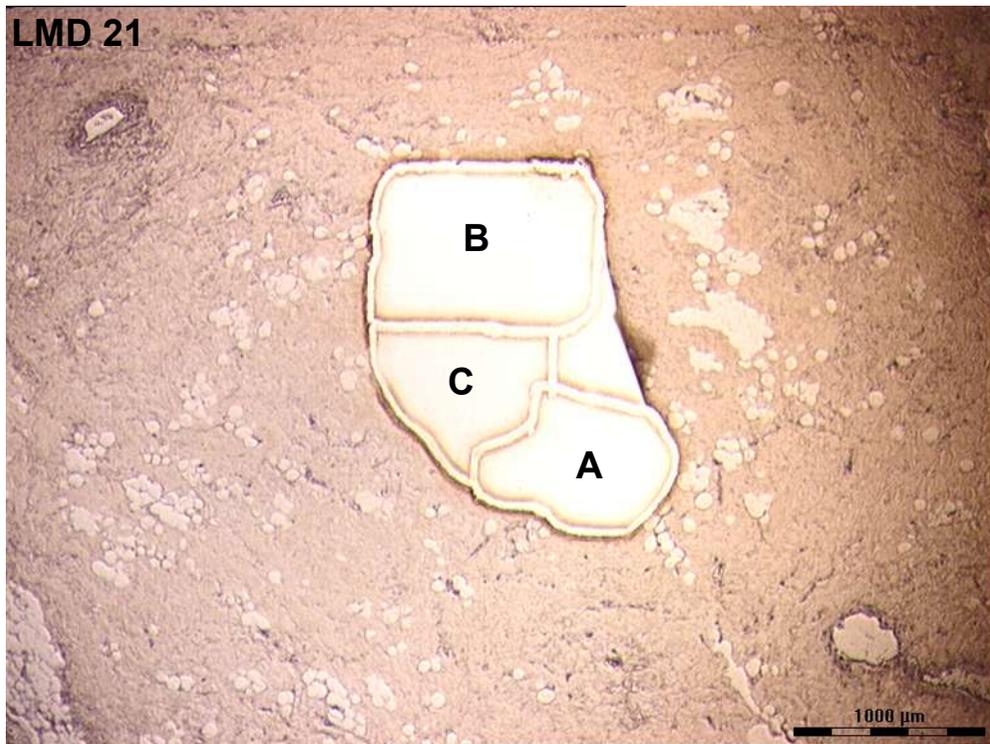
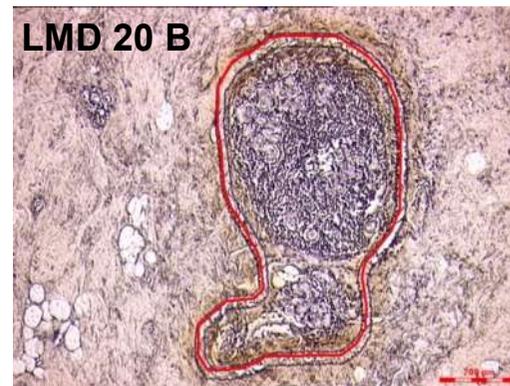
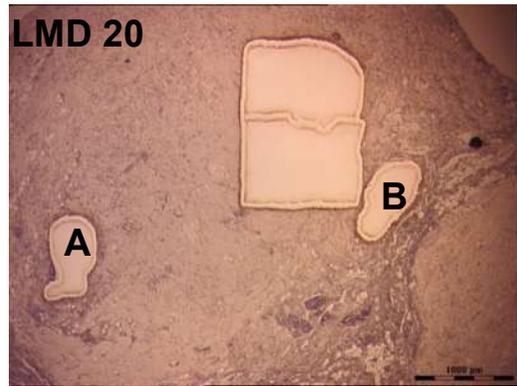


Abbildung 53: LMD Proben 20 und 21.

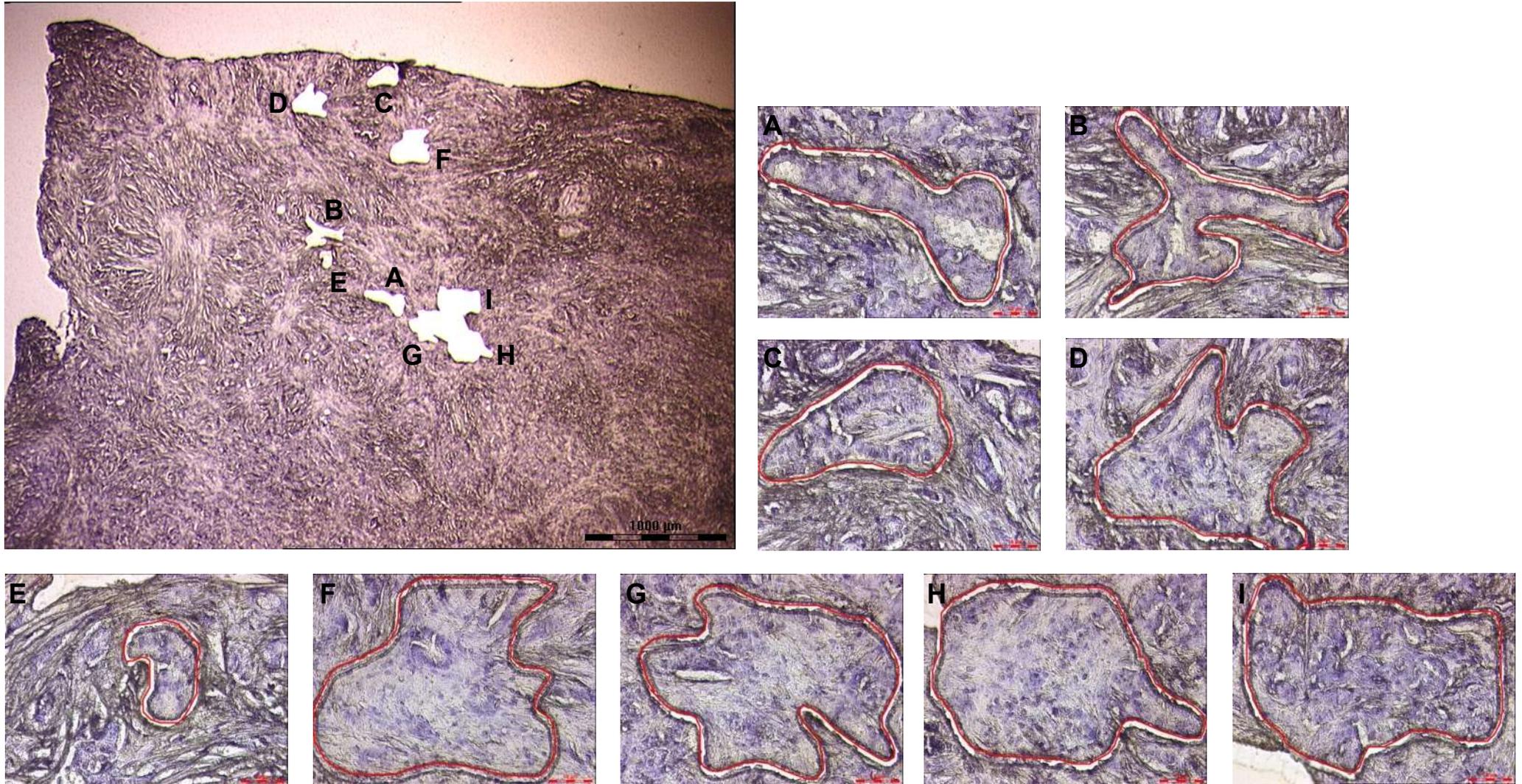


Abbildung 54: LMP Probe 22.

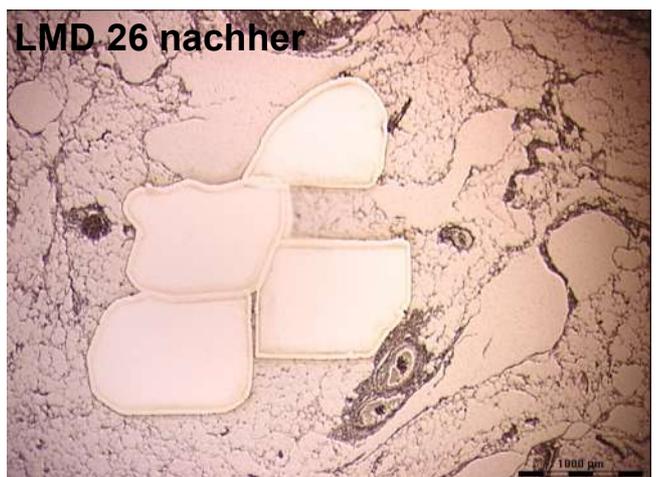
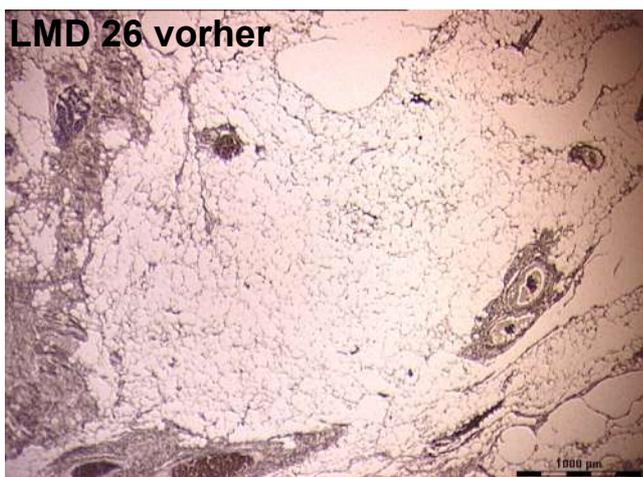
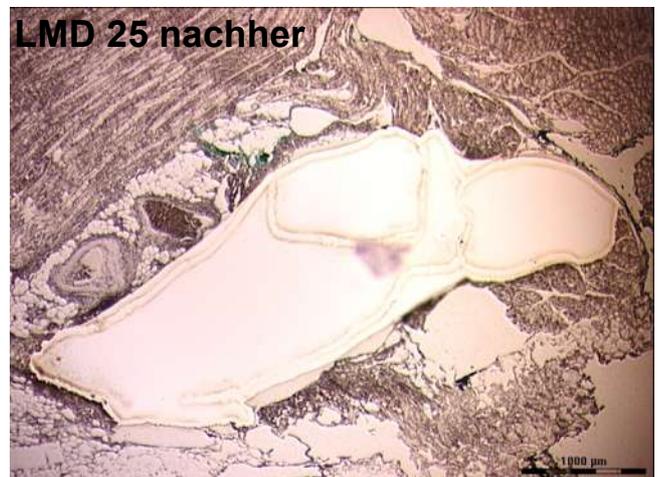
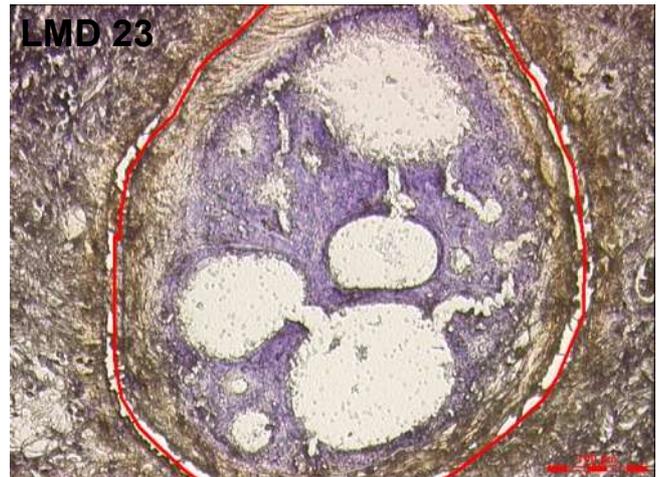
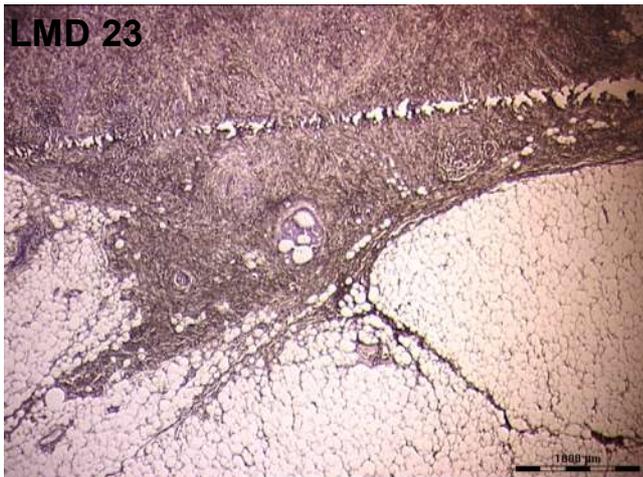


Abbildung 55: LMD Proben 23, 25 und 26.

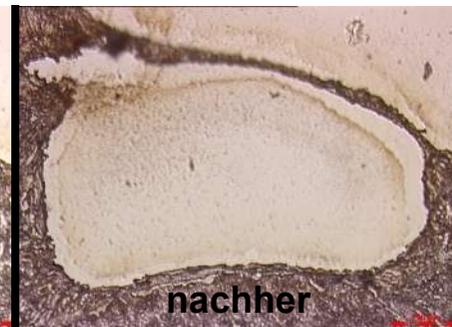
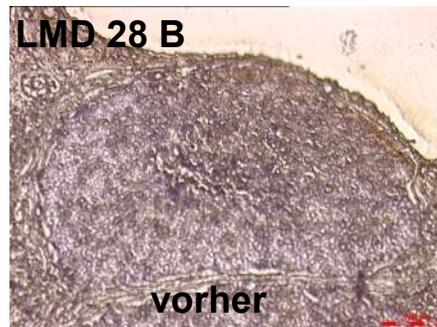
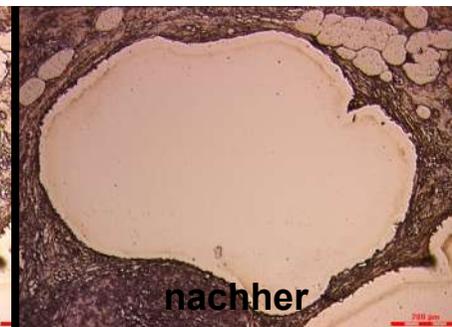
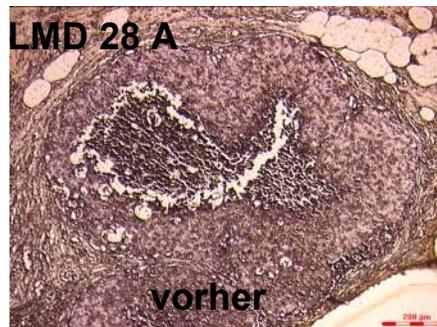
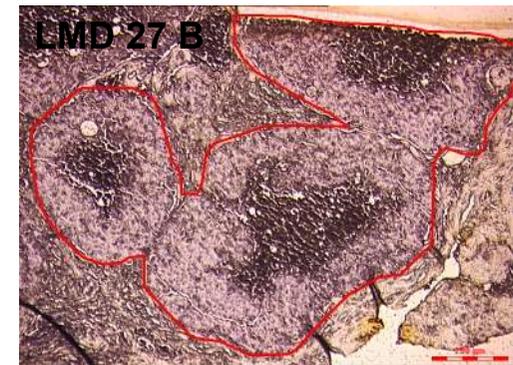
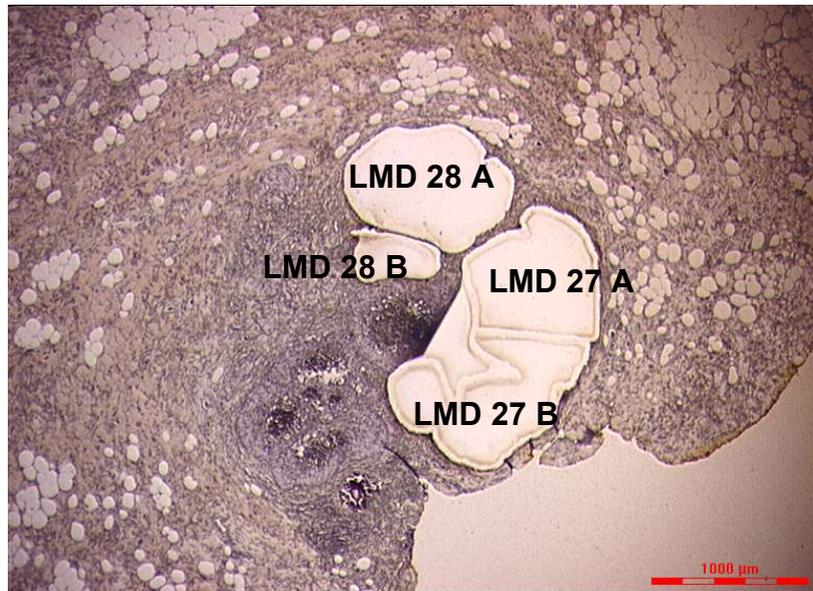
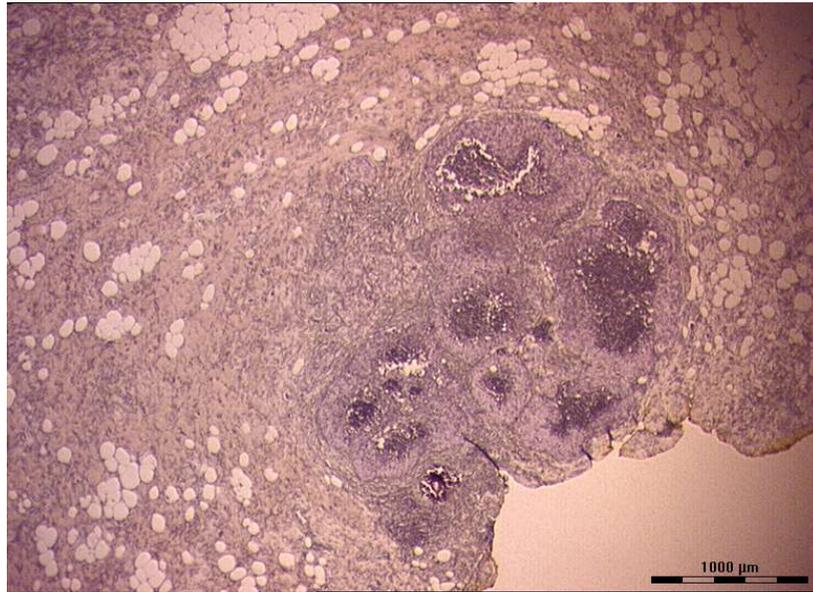
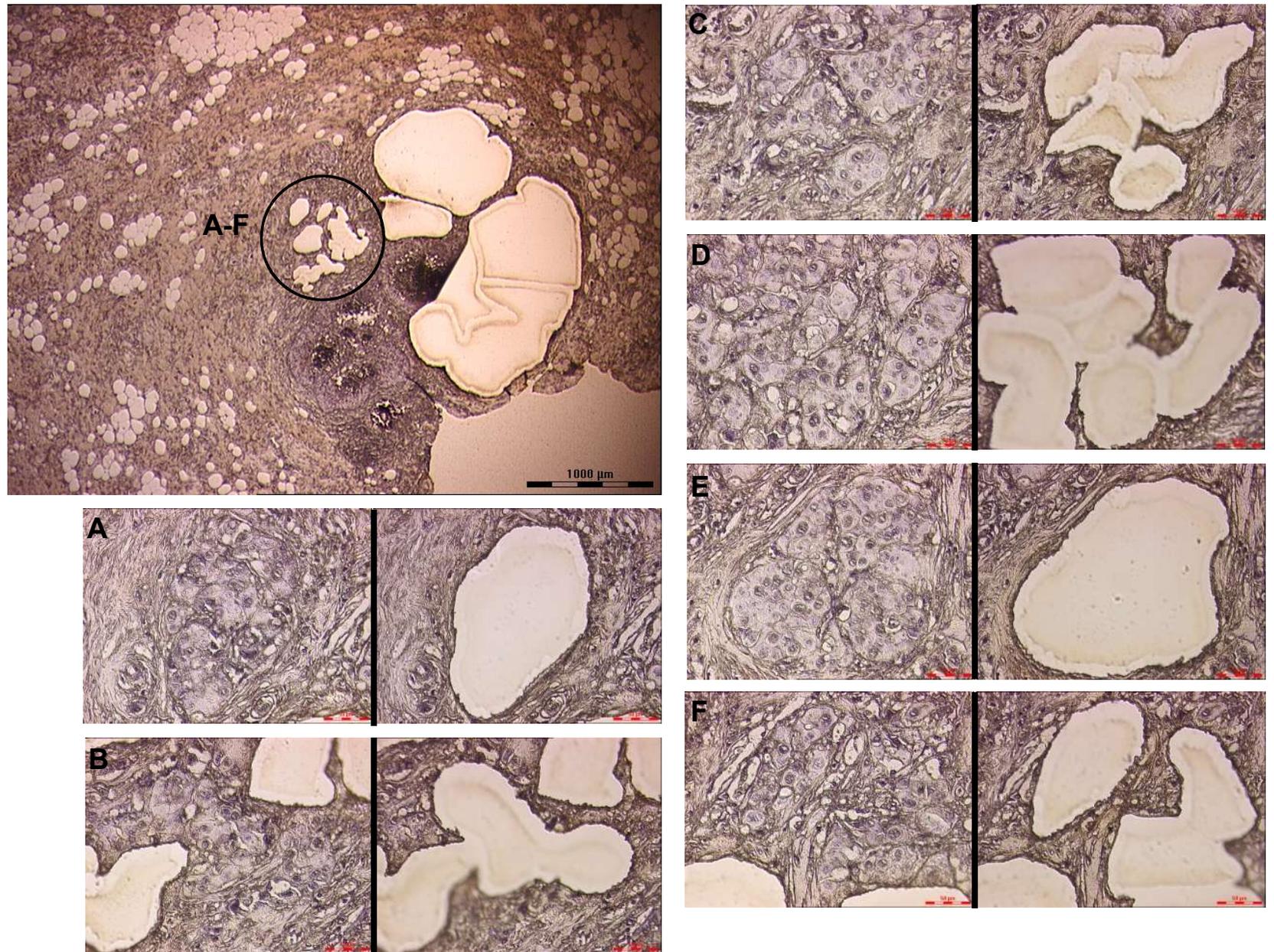


Abbildung 56: LMD Proben 27 und 28.

Abbildung 57: LMD Probe 29.



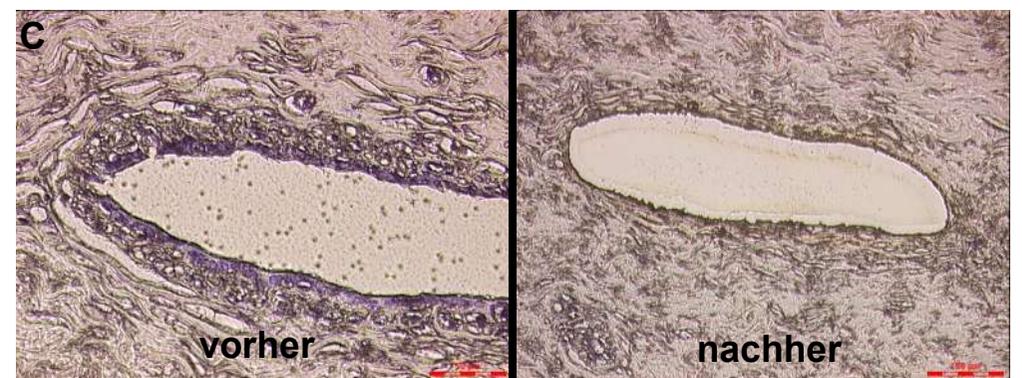
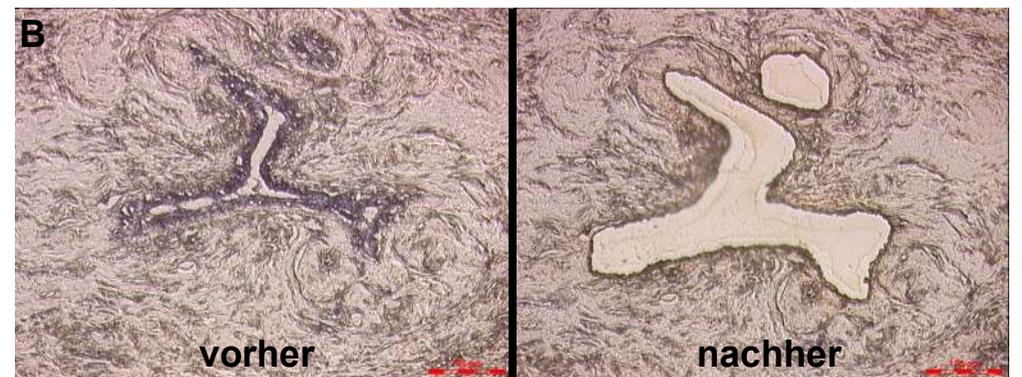
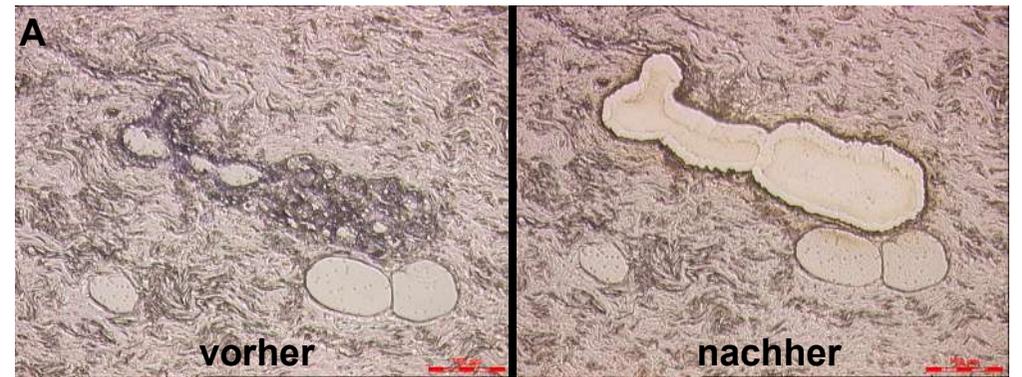
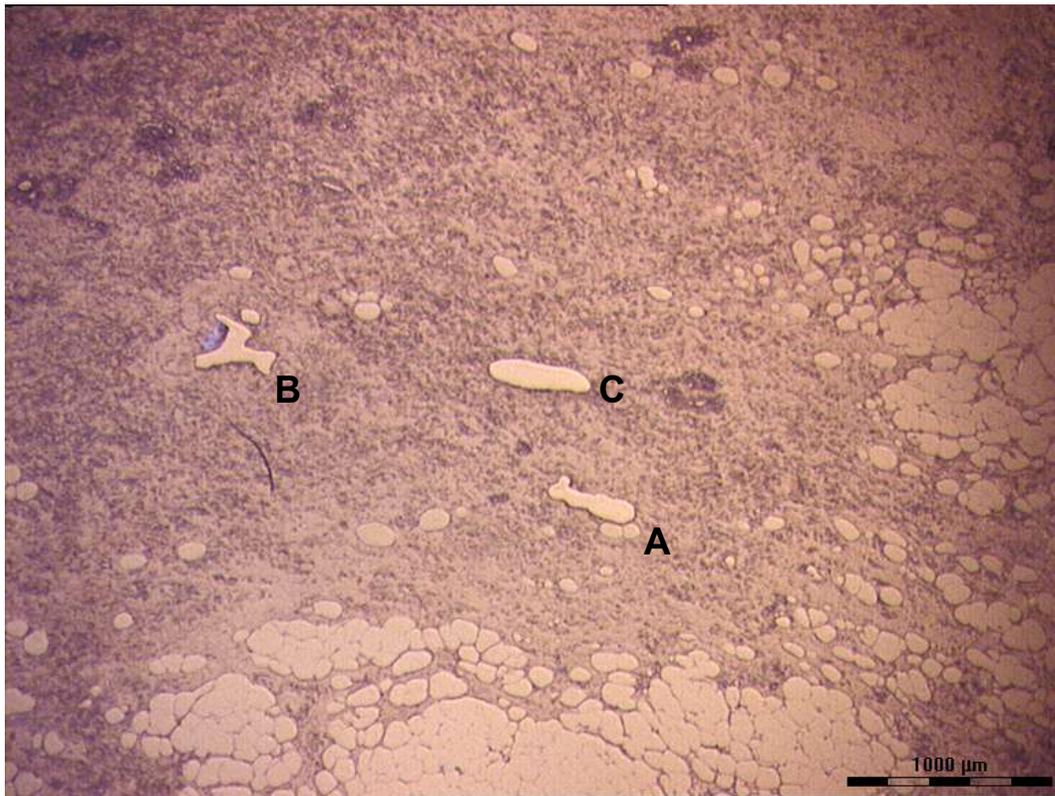


Abbildung 58: LMD Probe 30.

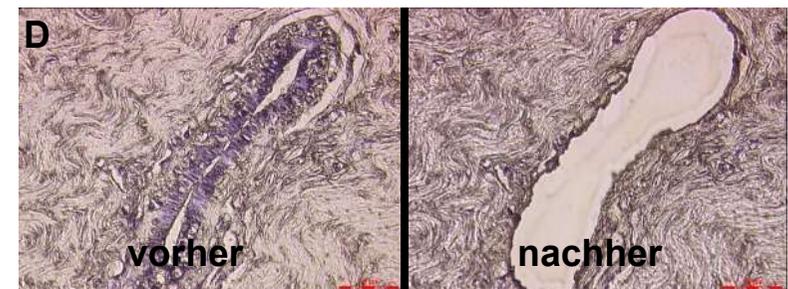
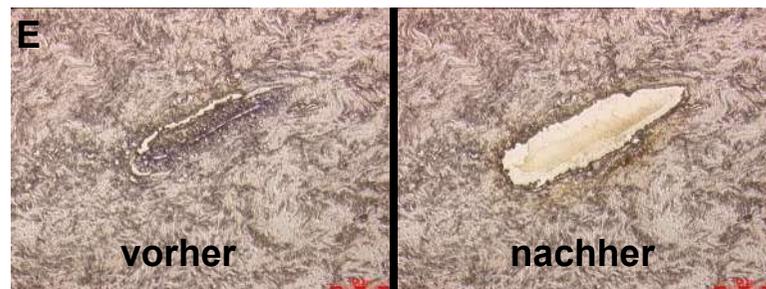
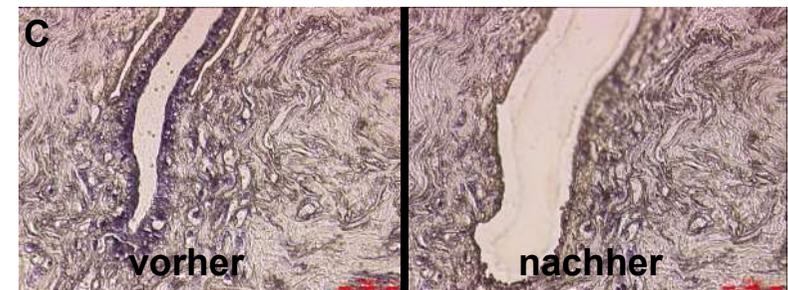
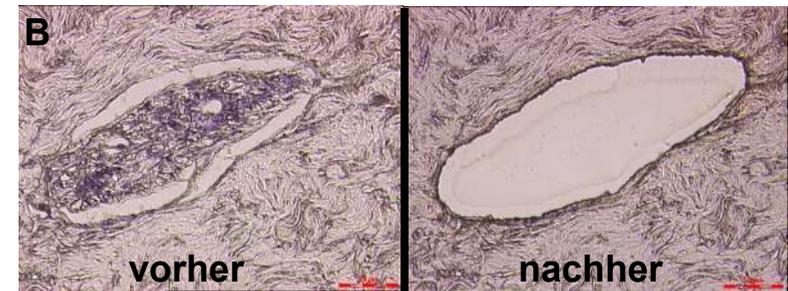
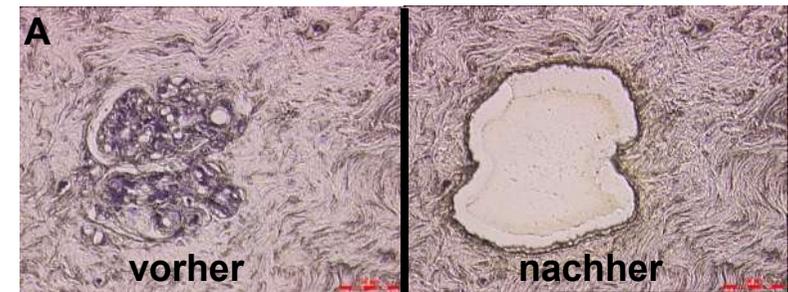
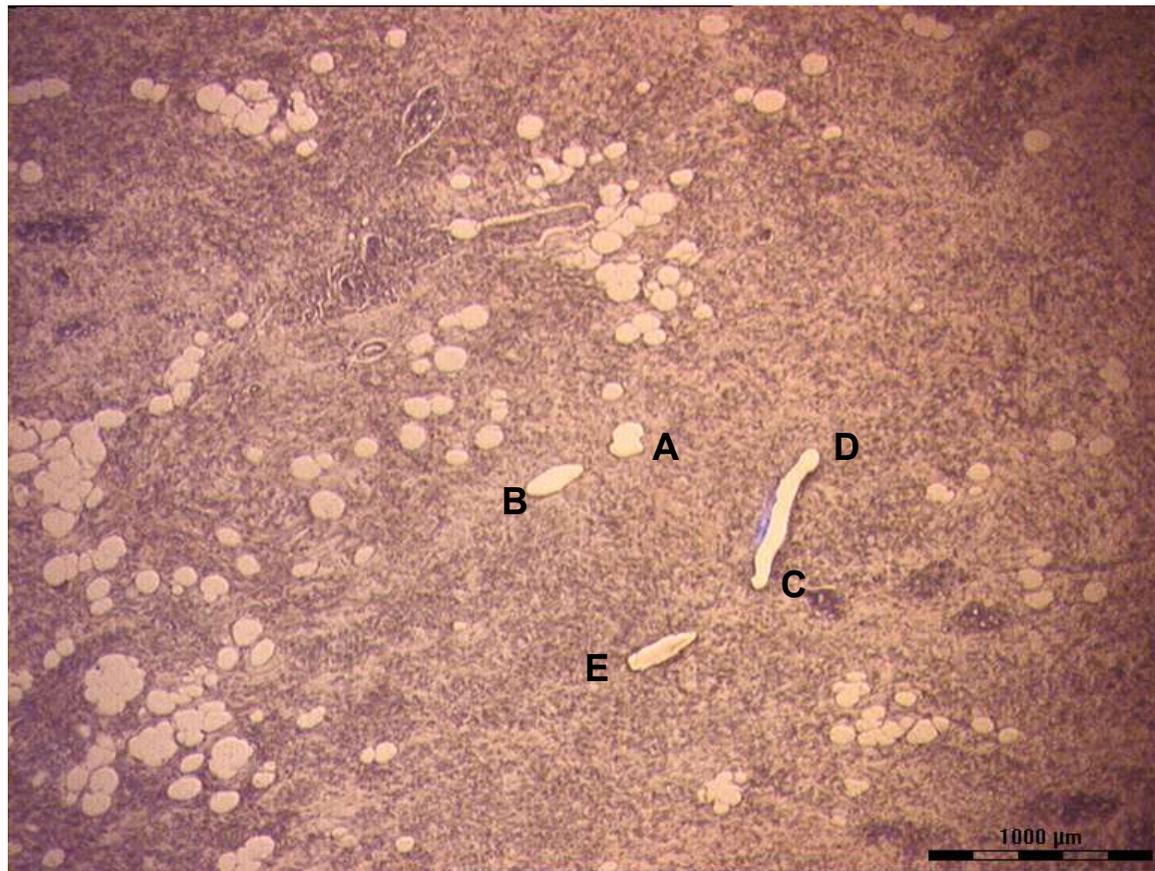


Abbildung 59: LMD Probe 31.

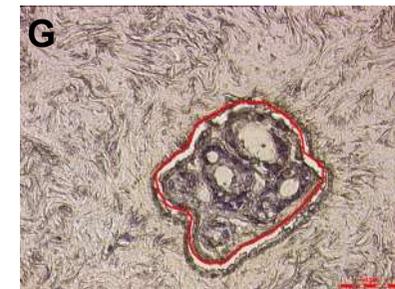
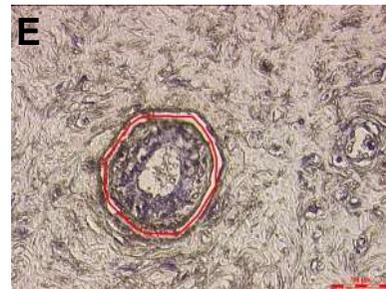
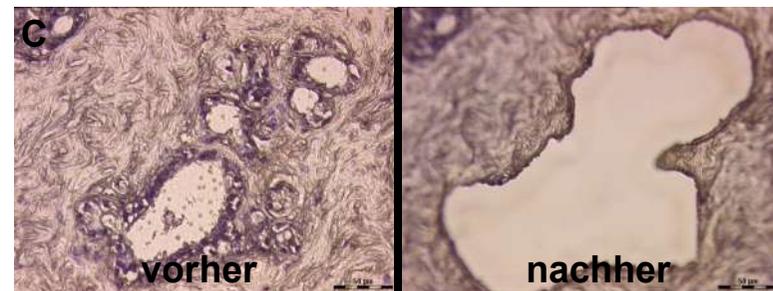
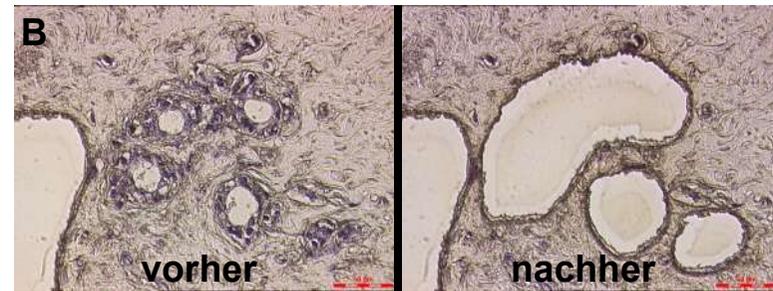
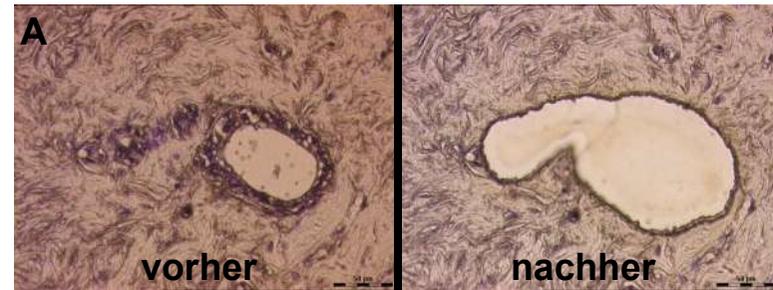
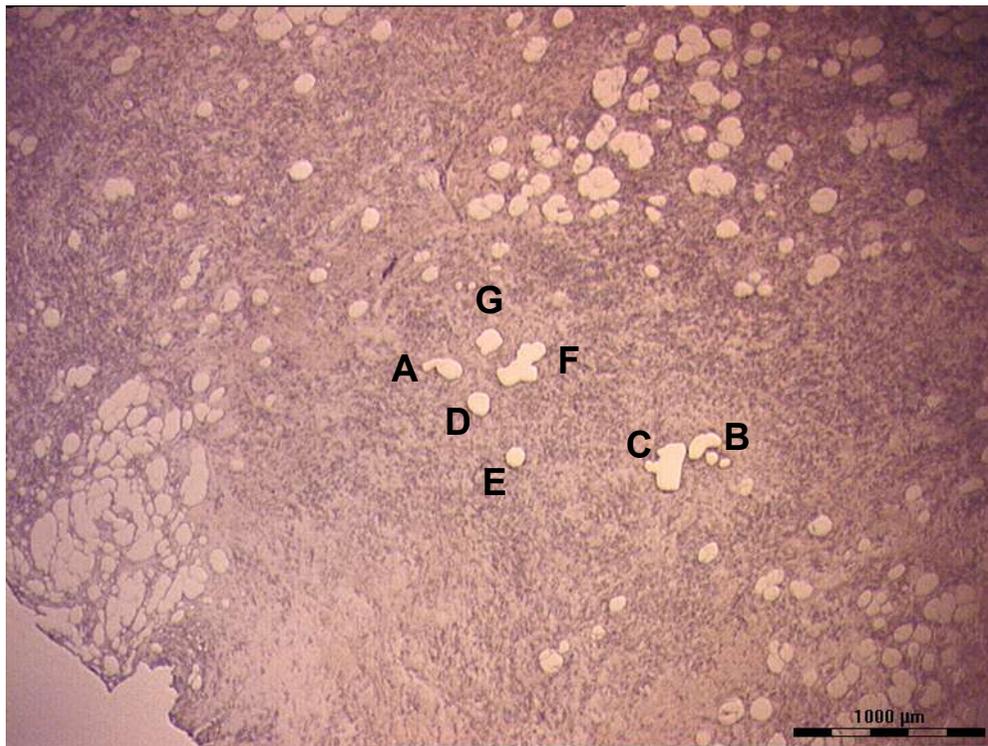
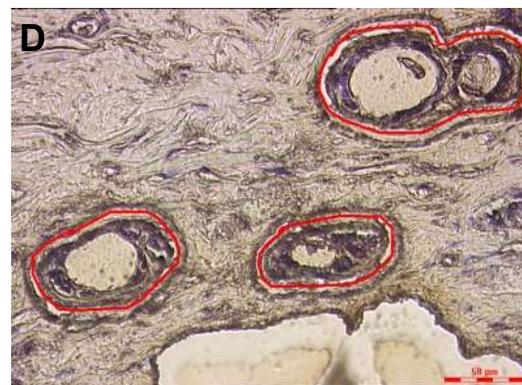
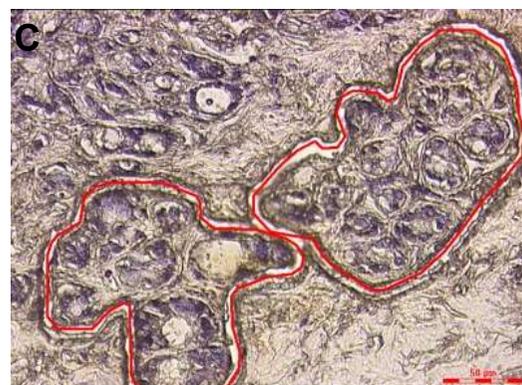
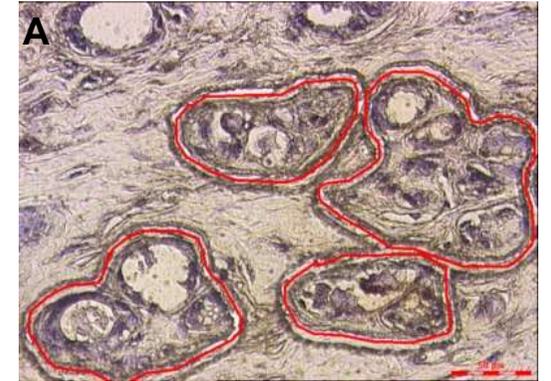
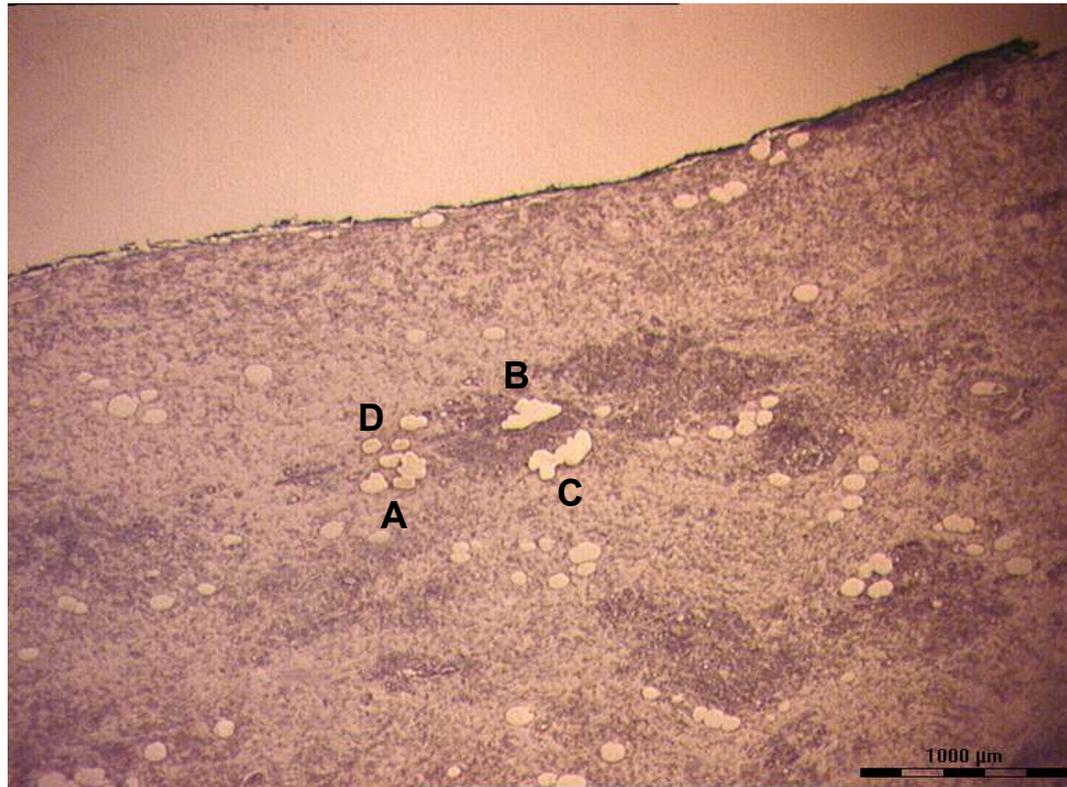


Abbildung 60: LMD Probe 32.

Abbildung 61: LMD Probe 33.



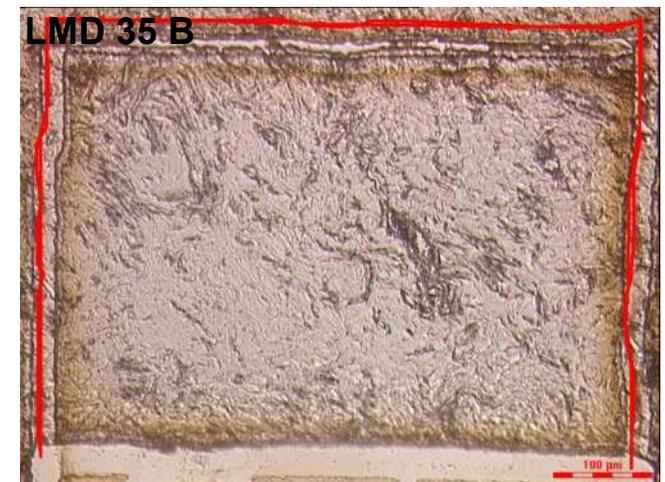
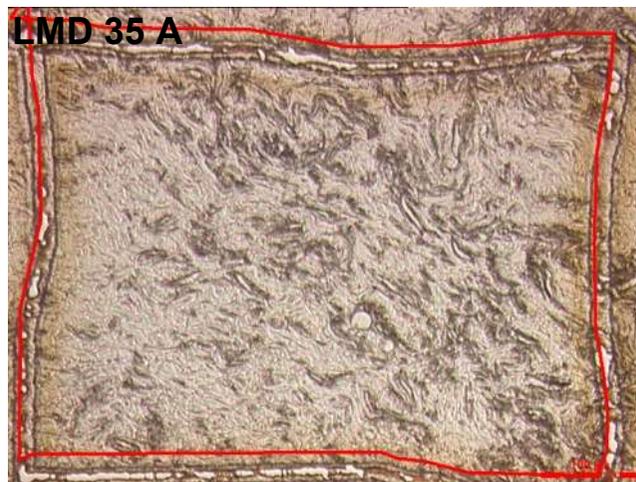
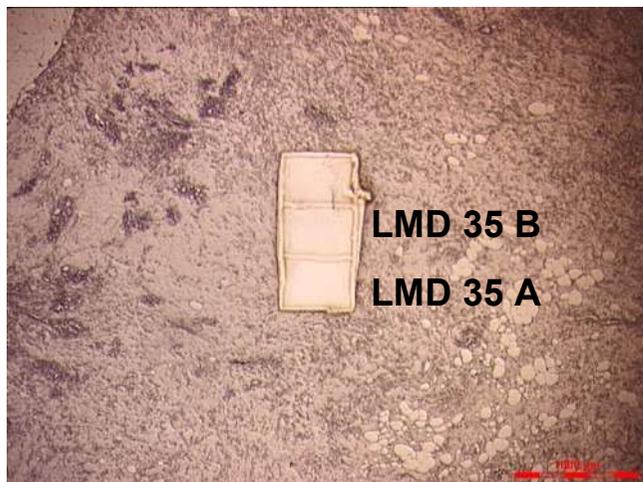
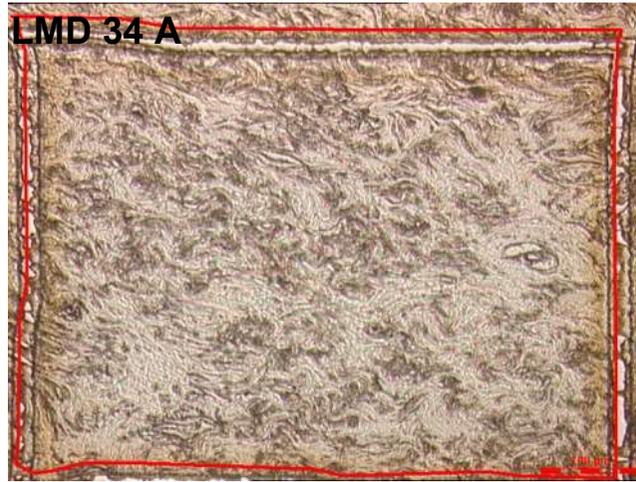
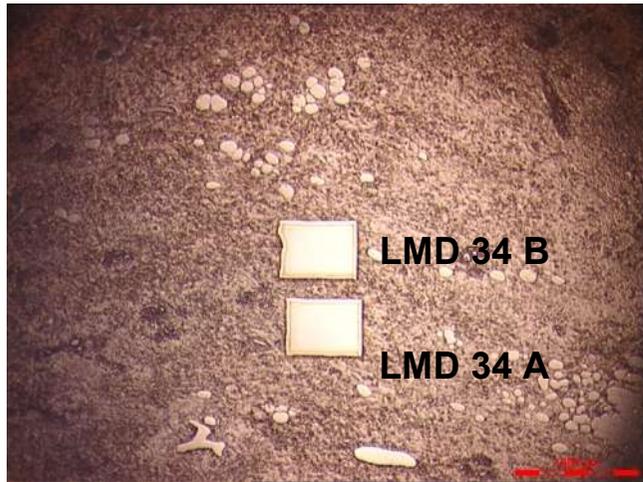


Abbildung 62: LMD Proben 34 und 35.

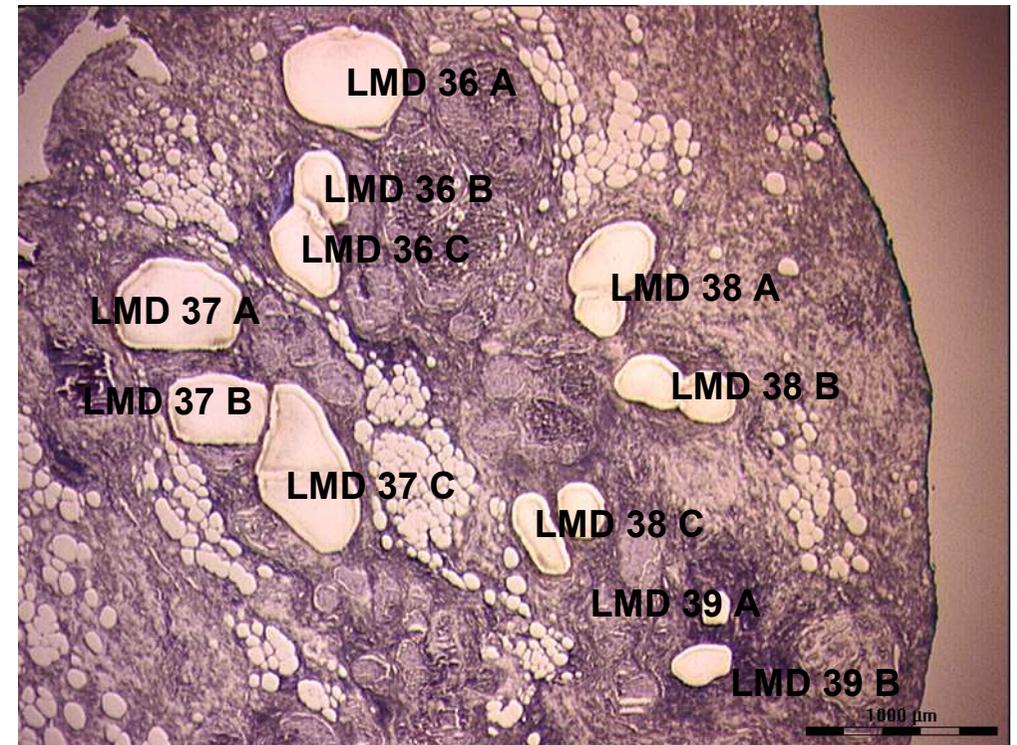
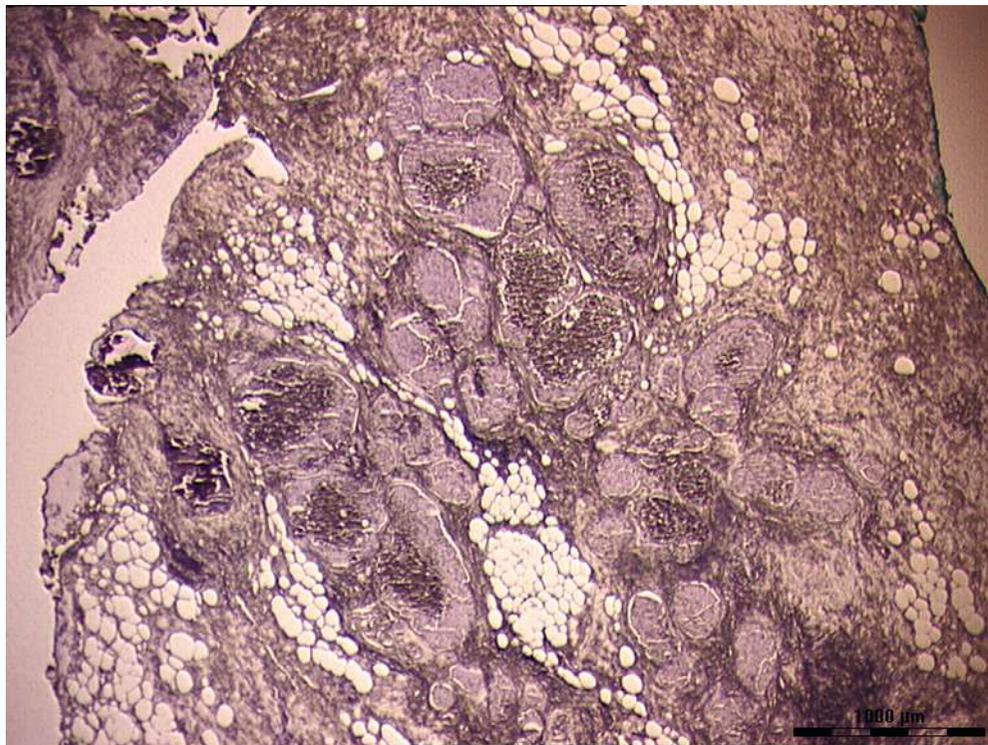


Abbildung 63: LMD Proben 36 - 39.

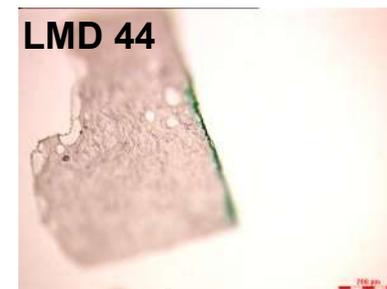
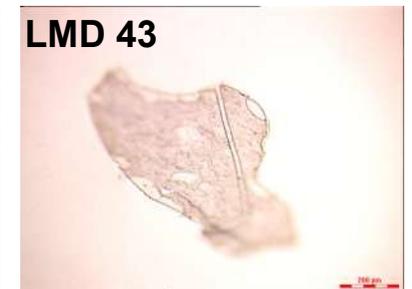
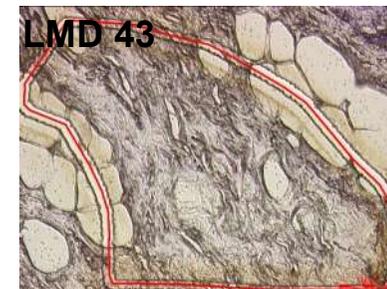
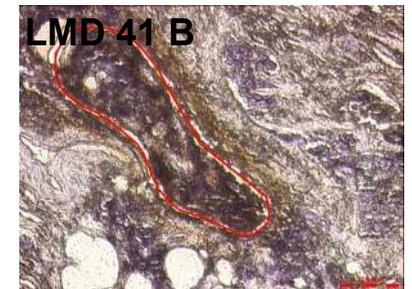
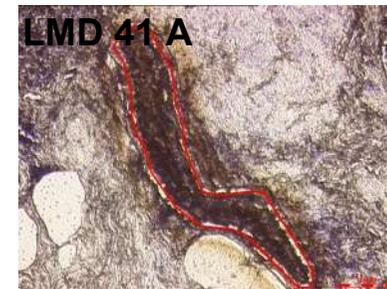
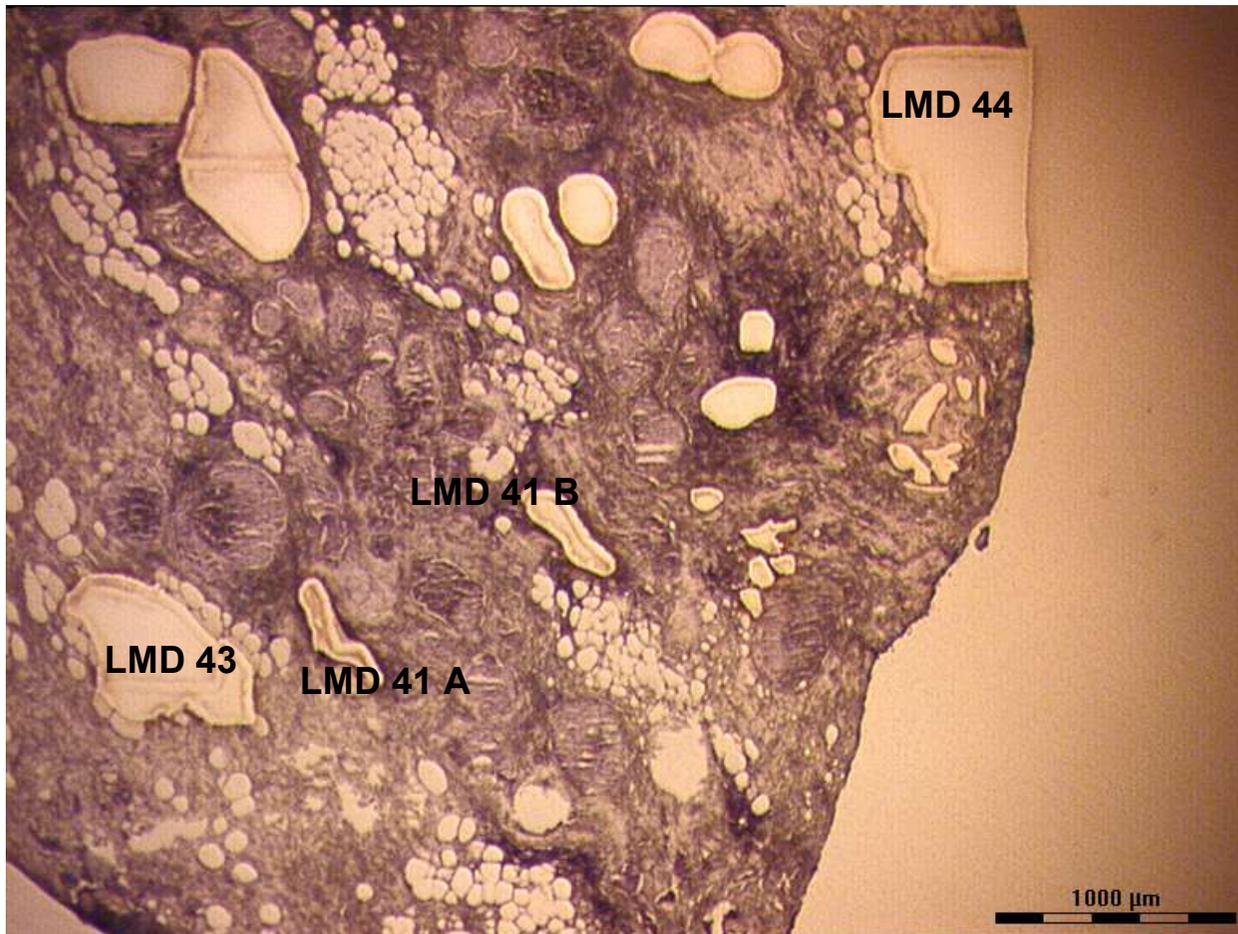


Abbildung 64: LMD Proben 41, 43 und 44.

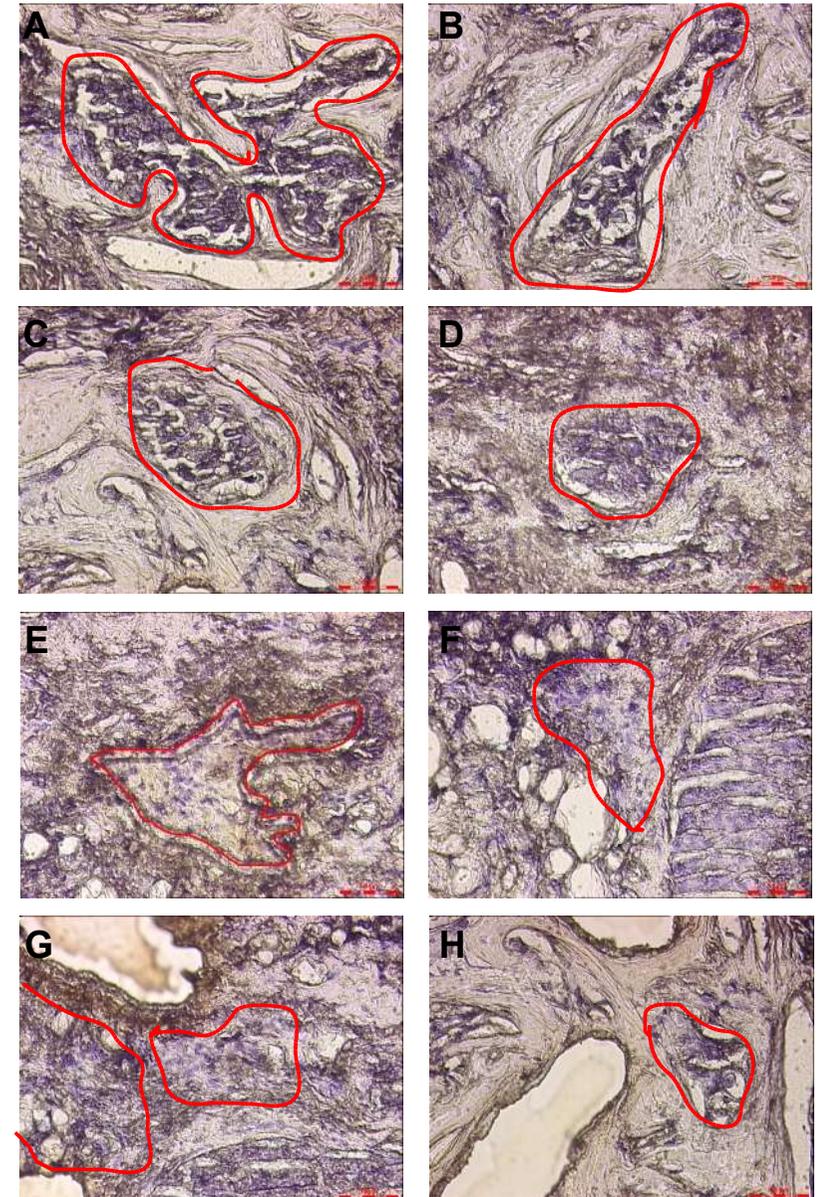
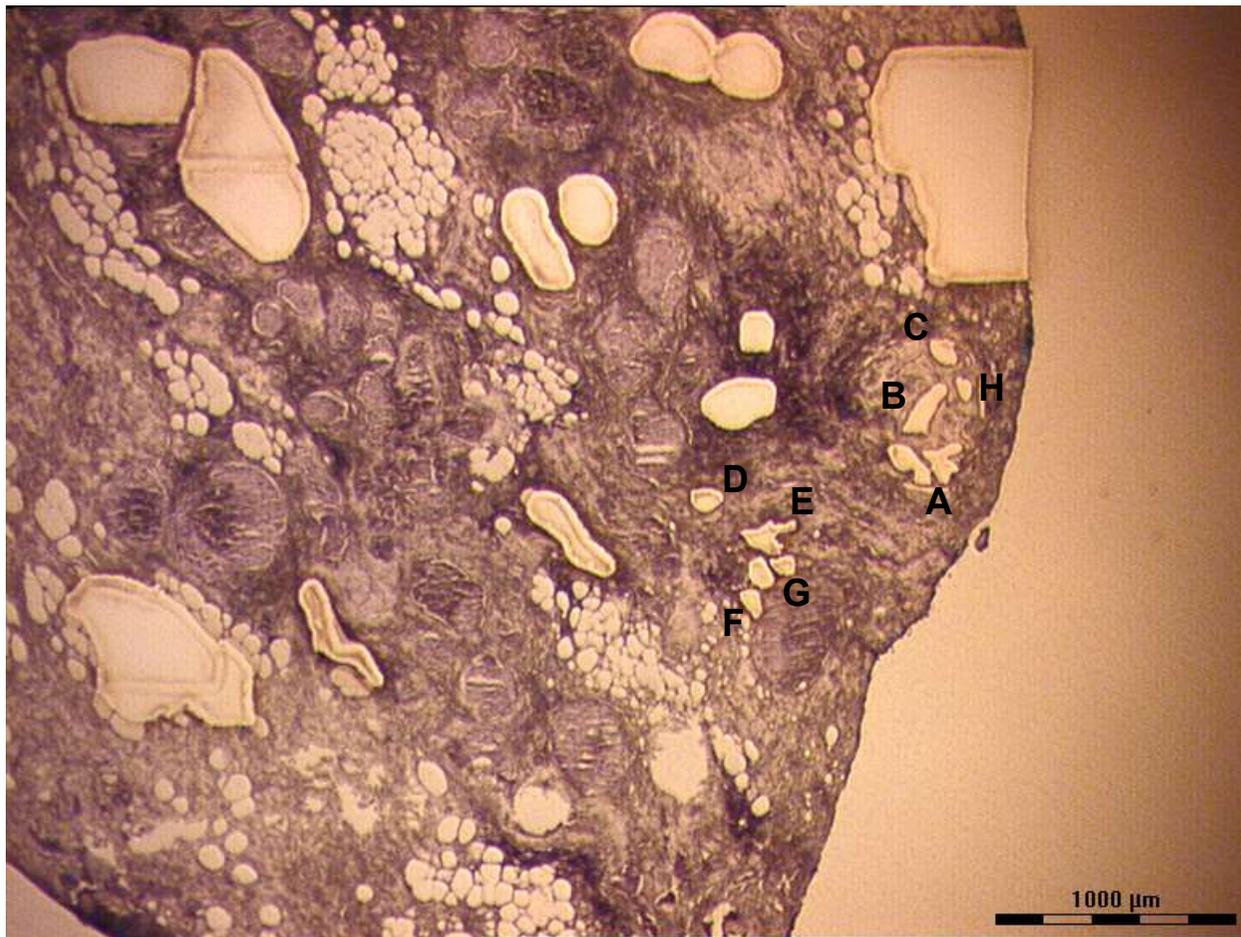


Abbildung 65: LMD Probe 42.

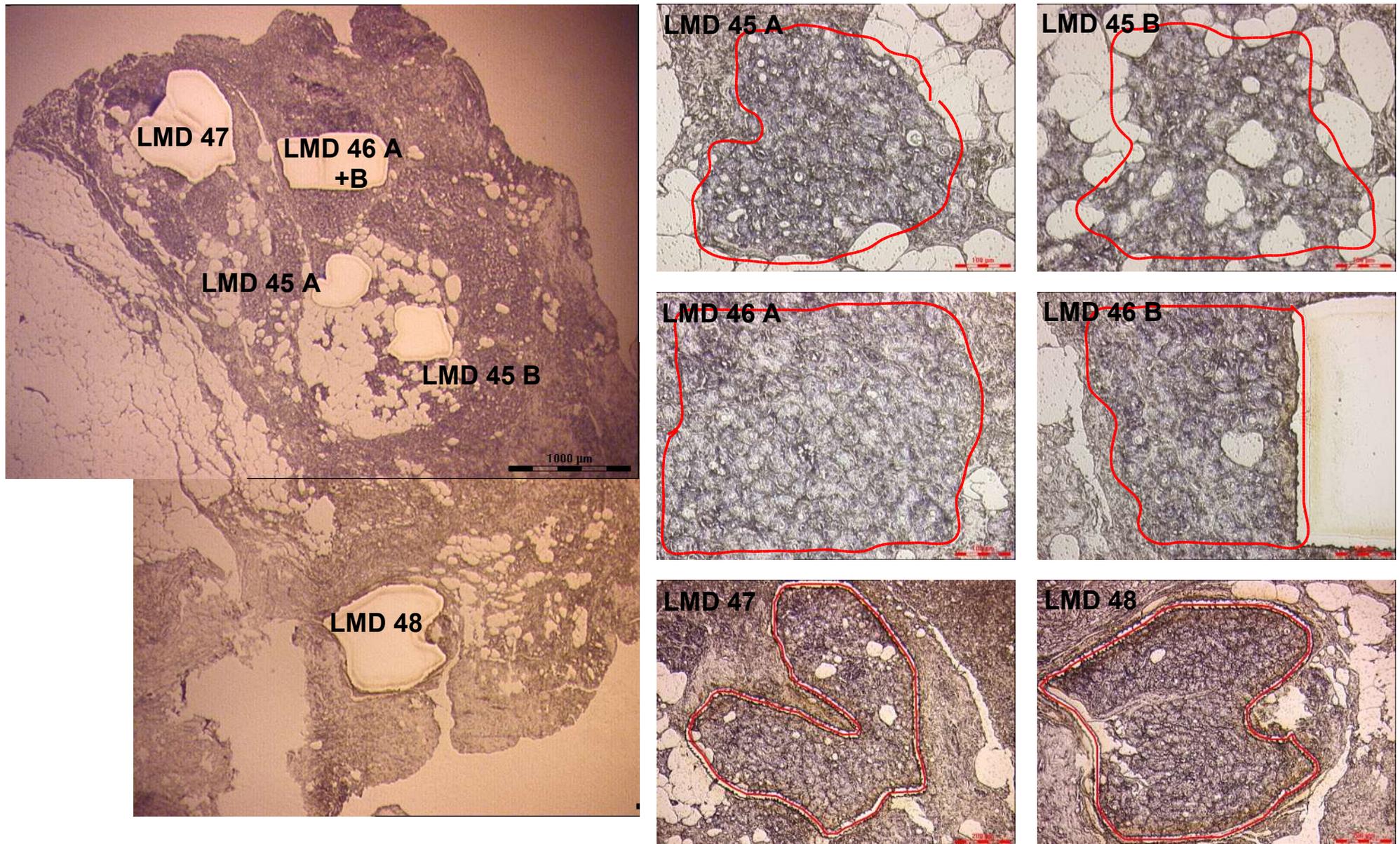


Abbildung 66: LMD Proben 45 - 48.

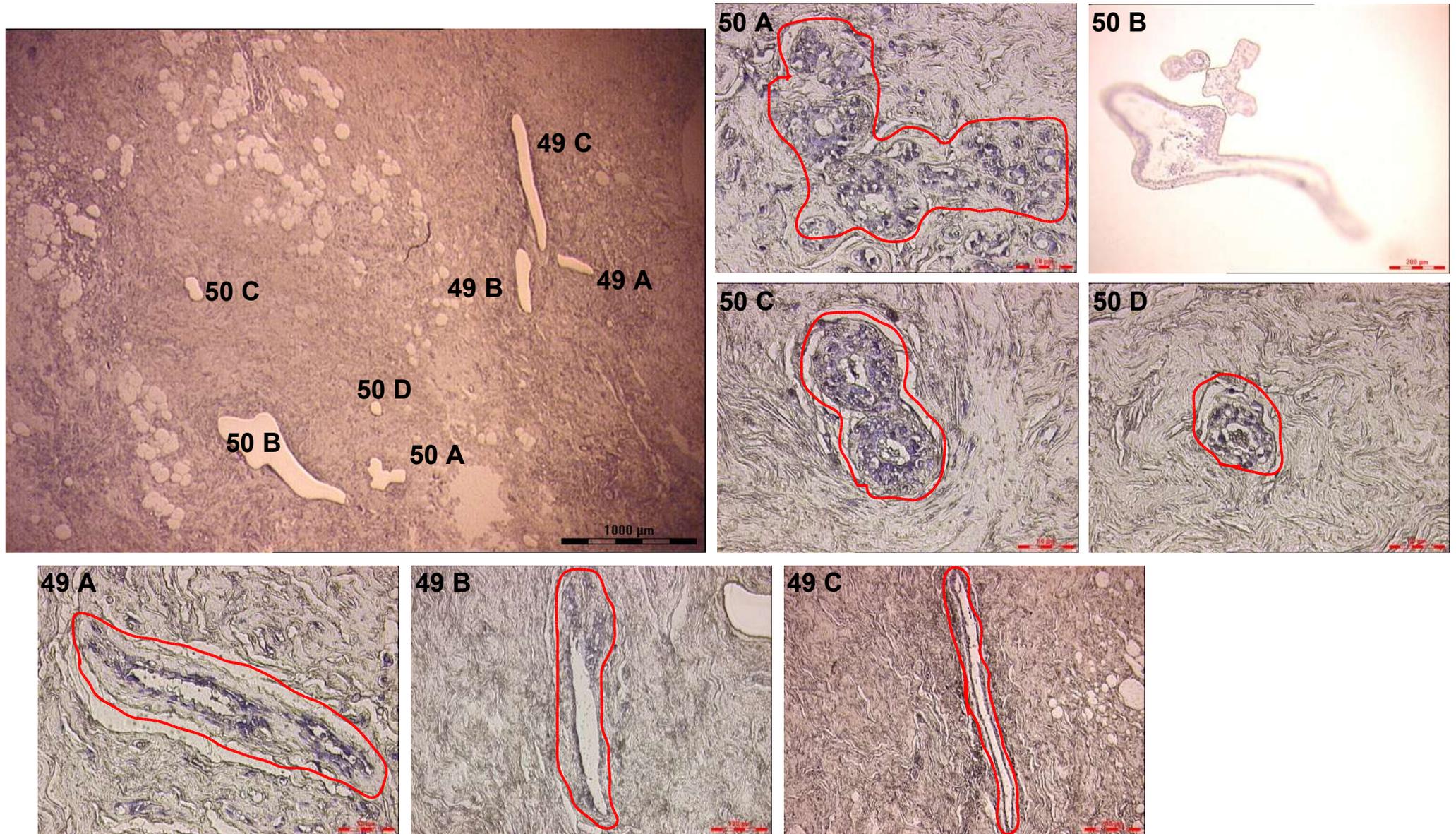


Abbildung 67: LMD Proben 49 und 50.

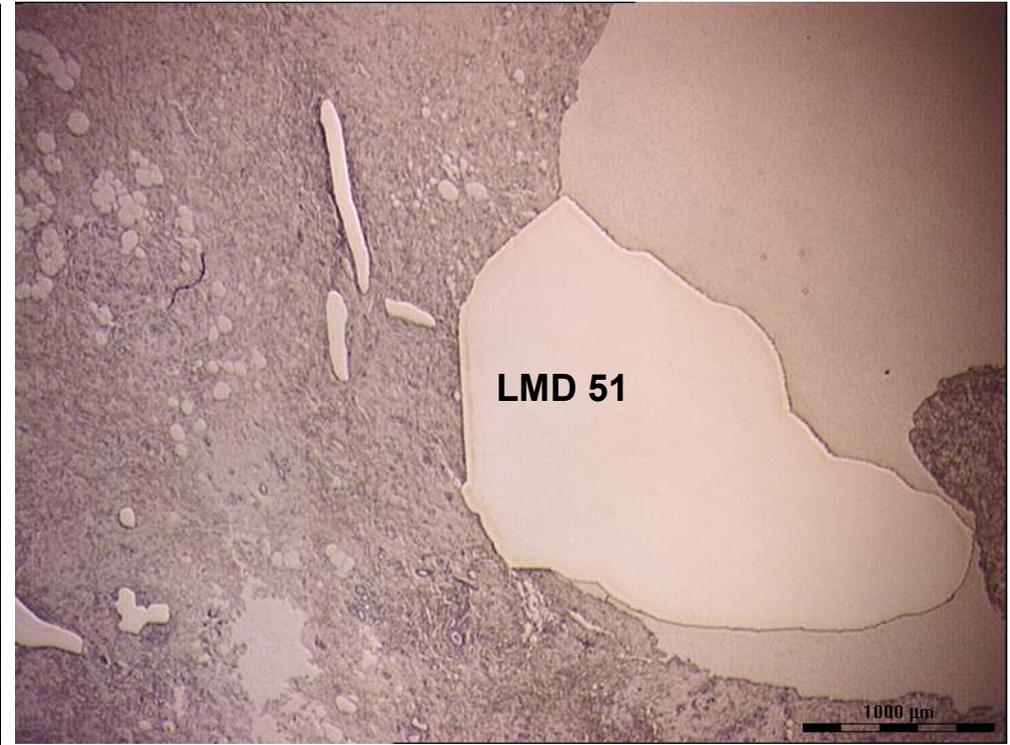
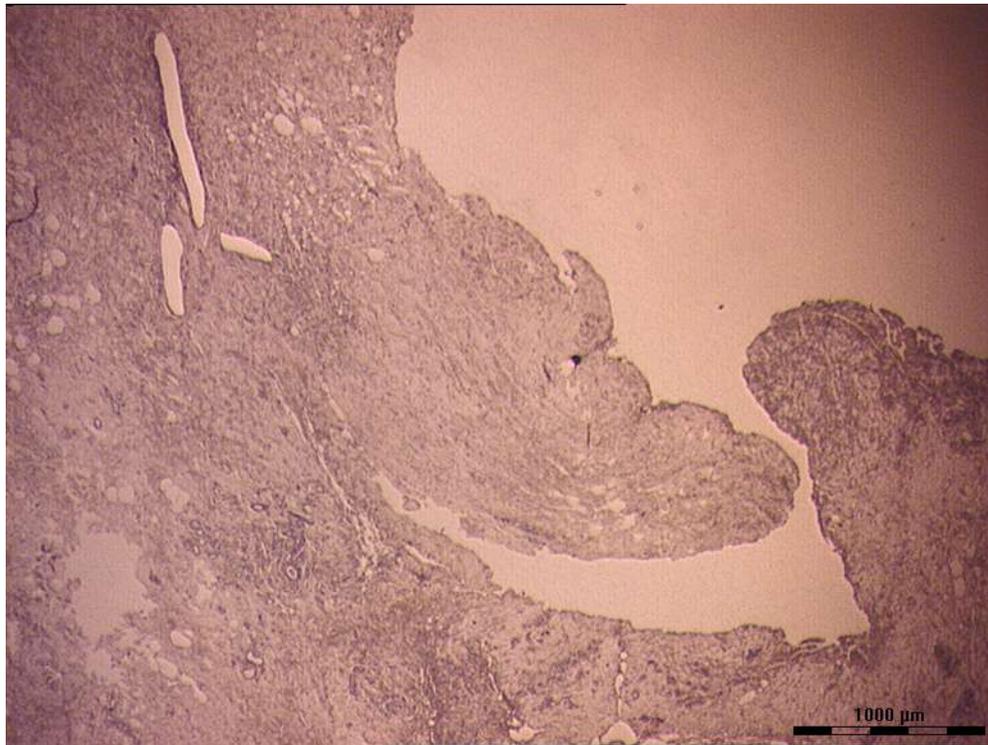


Abbildung 68: LMD Probe 51.

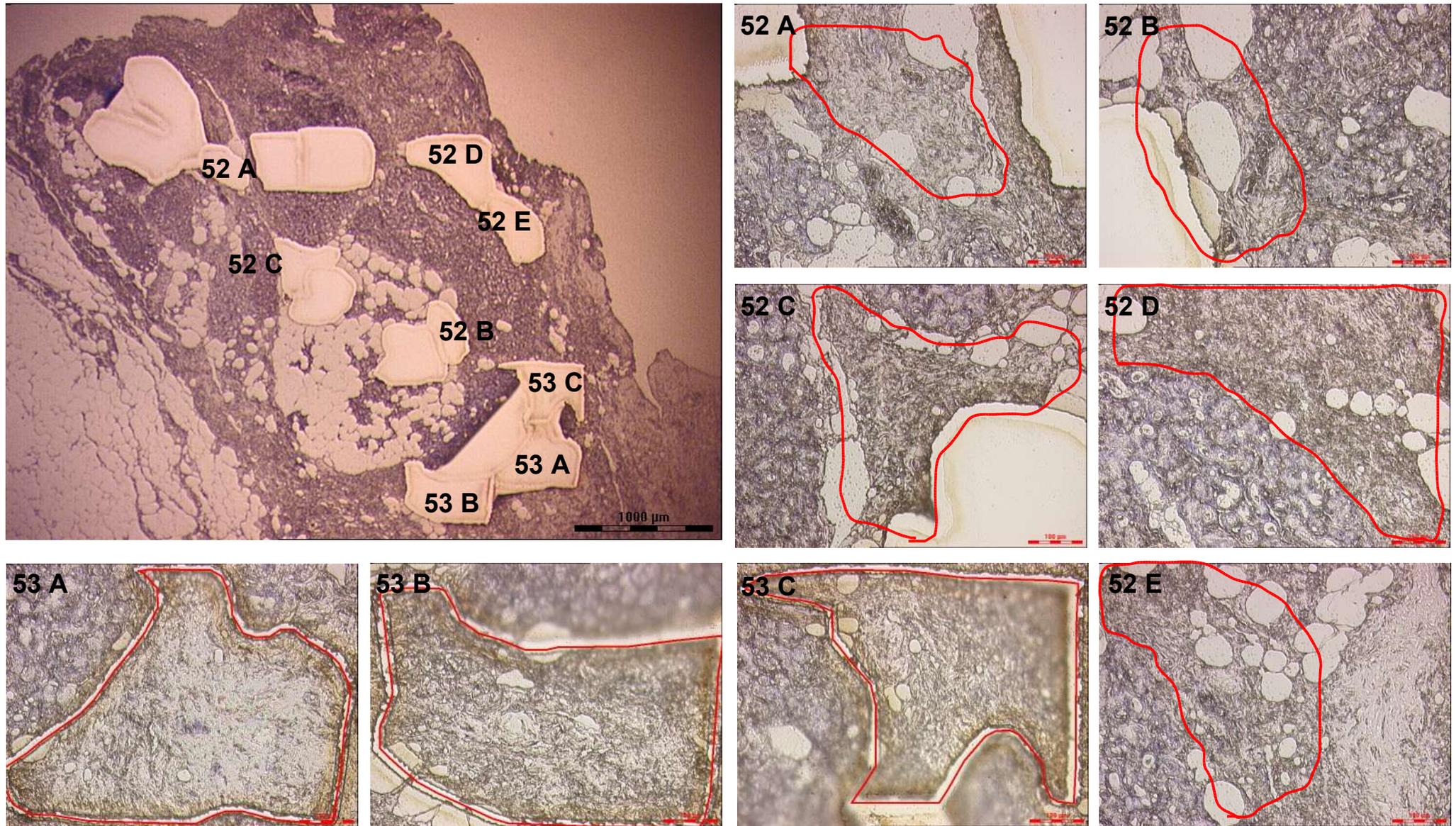


Abbildung 69: LMD Proben 52 und 53.

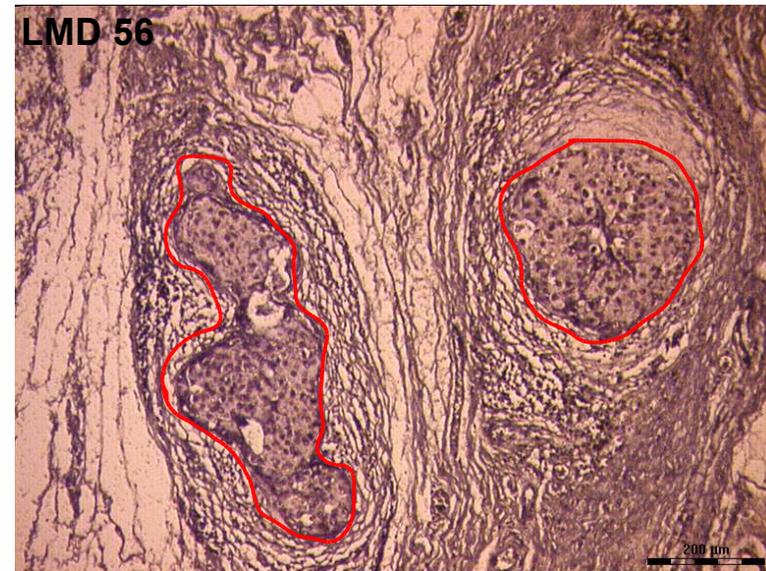
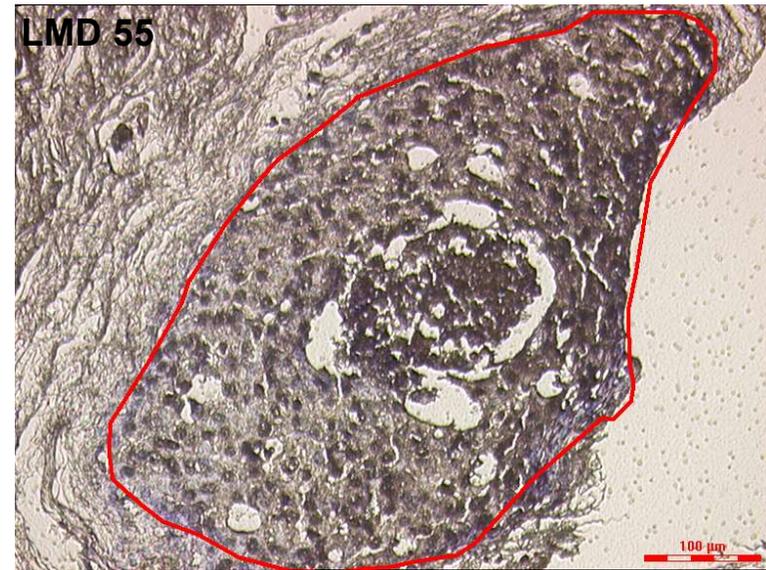
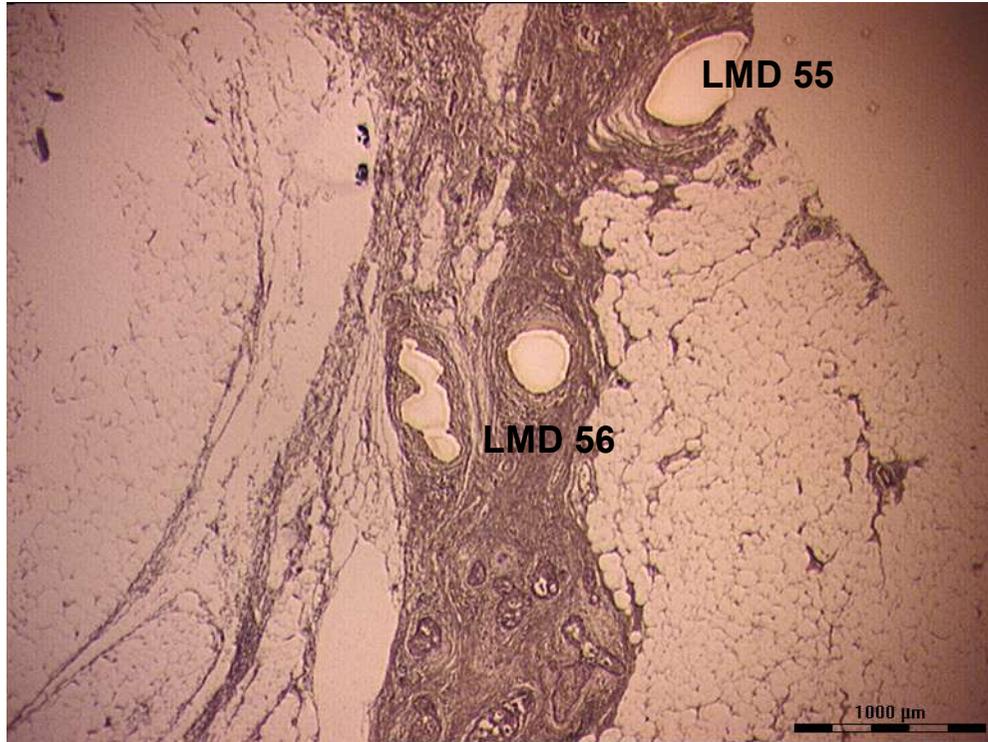


Abbildung 70: LMD Proben 55 und 56.

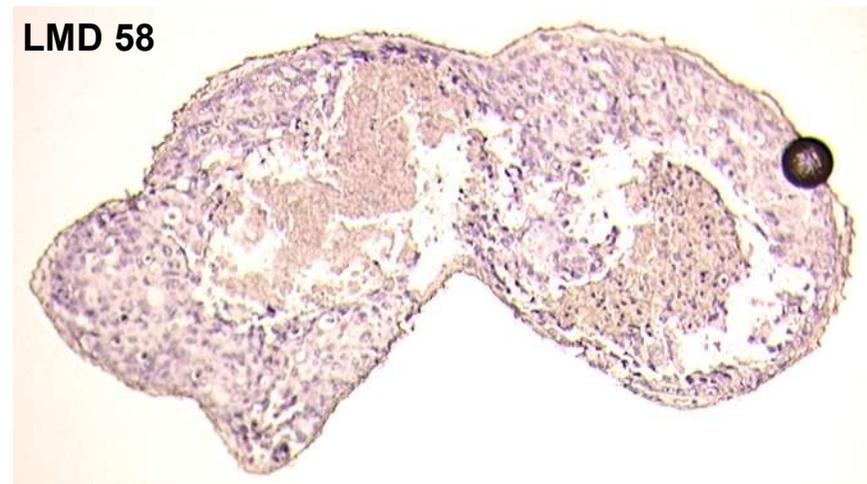
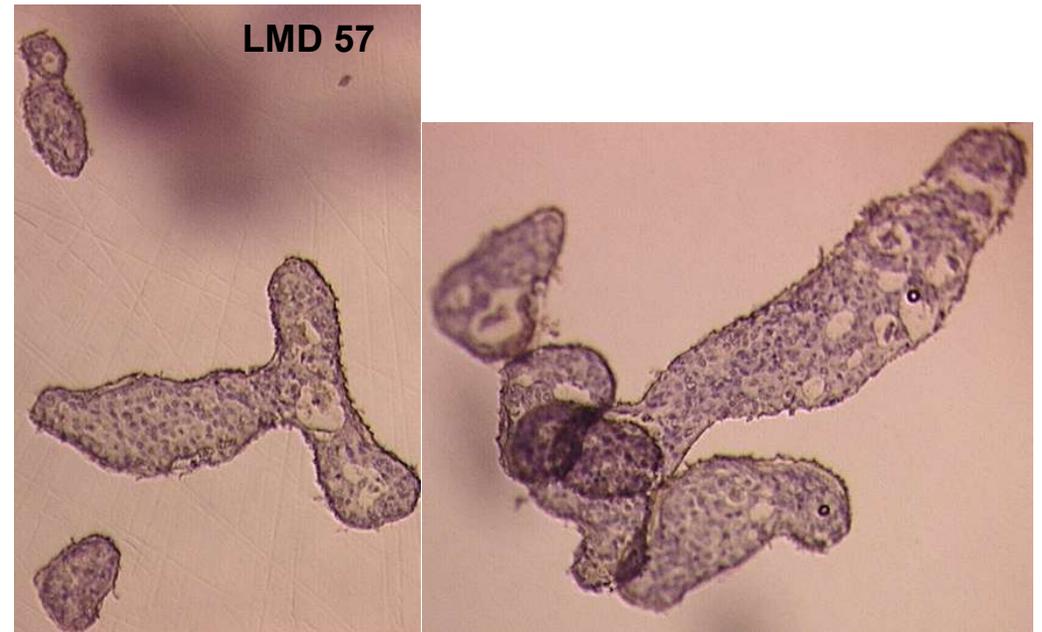
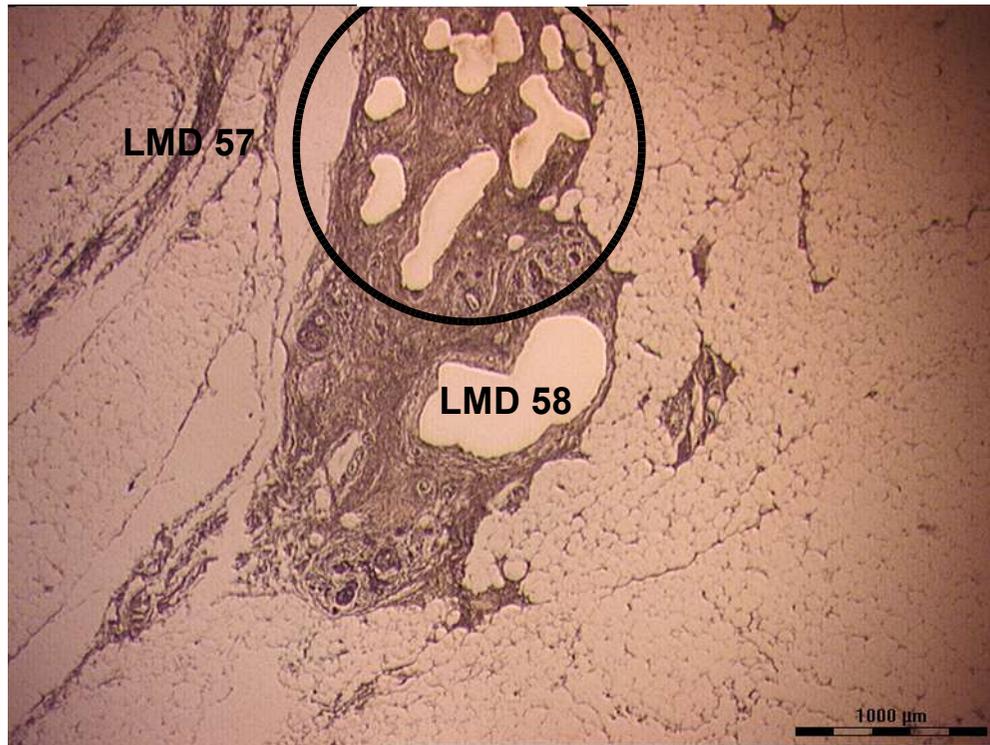


Abbildung 71: LMD Proben 57 und 58.

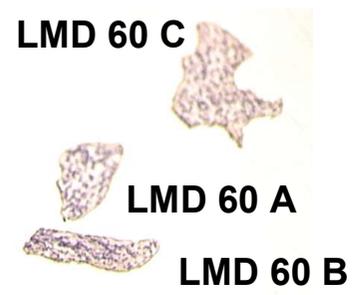
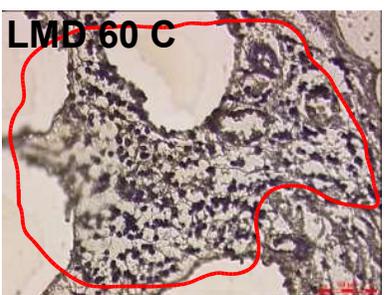
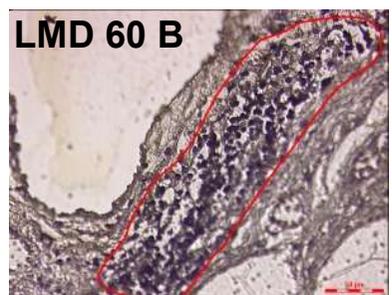
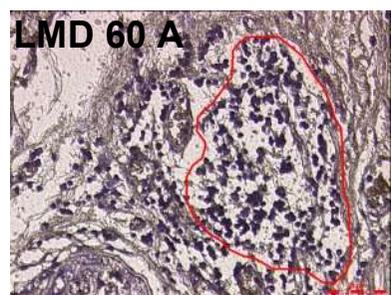
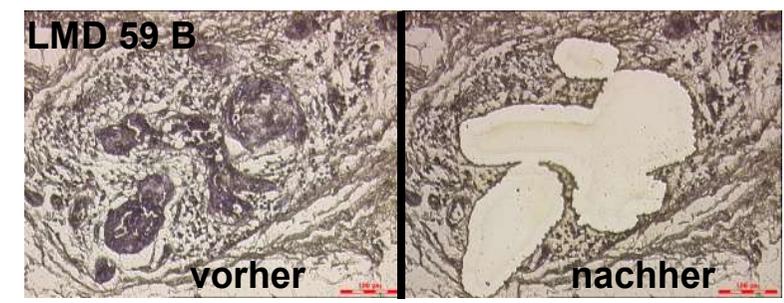
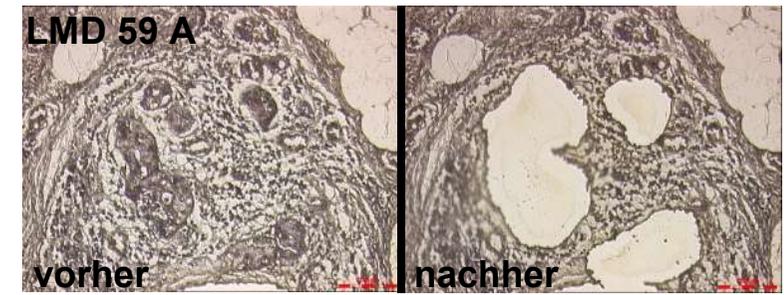
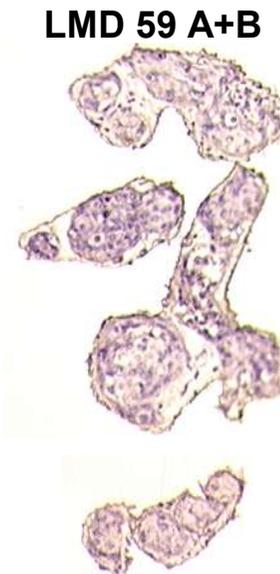
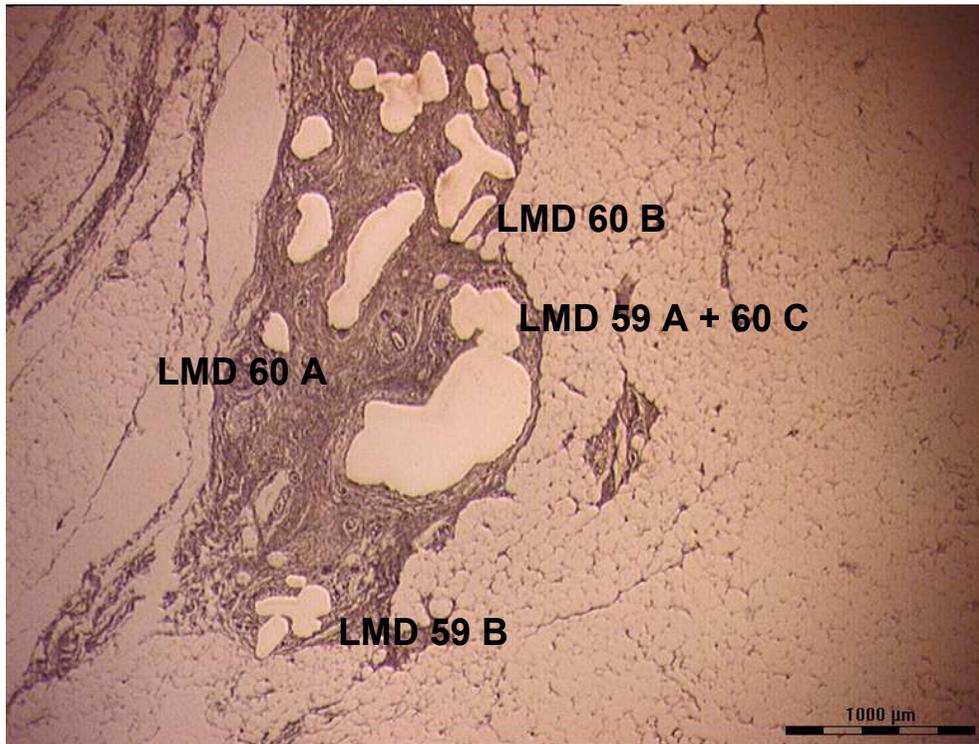


Abbildung 72: LMD Proben 59 und 60.

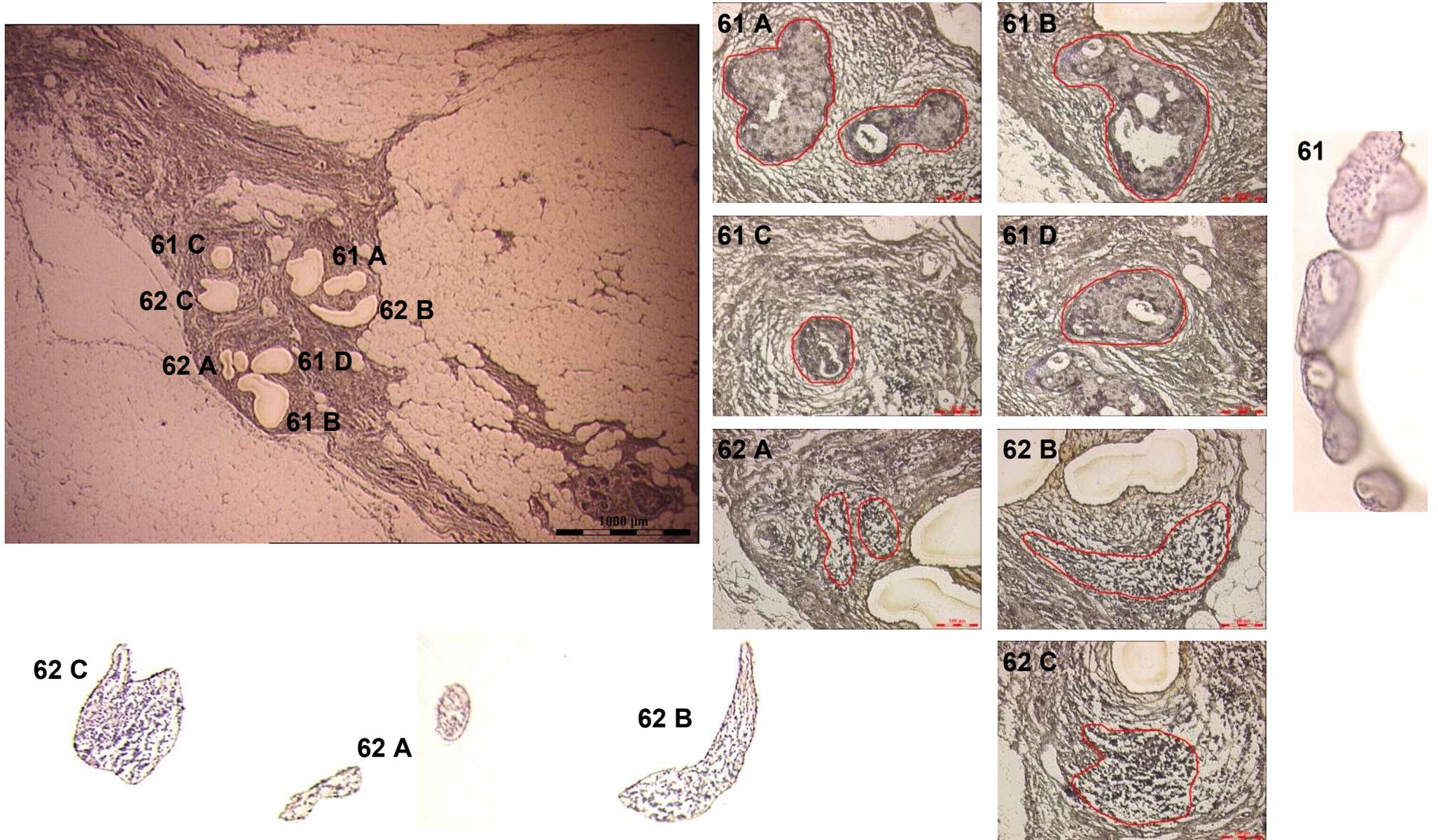
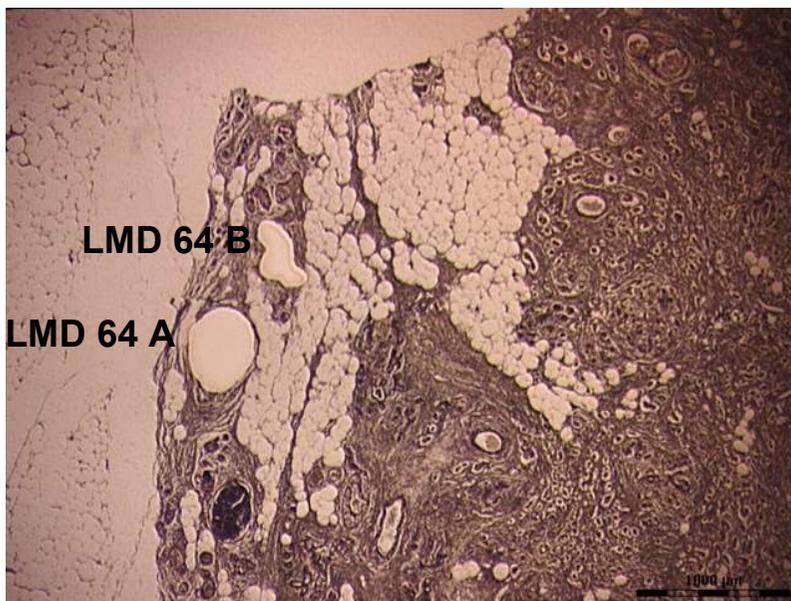
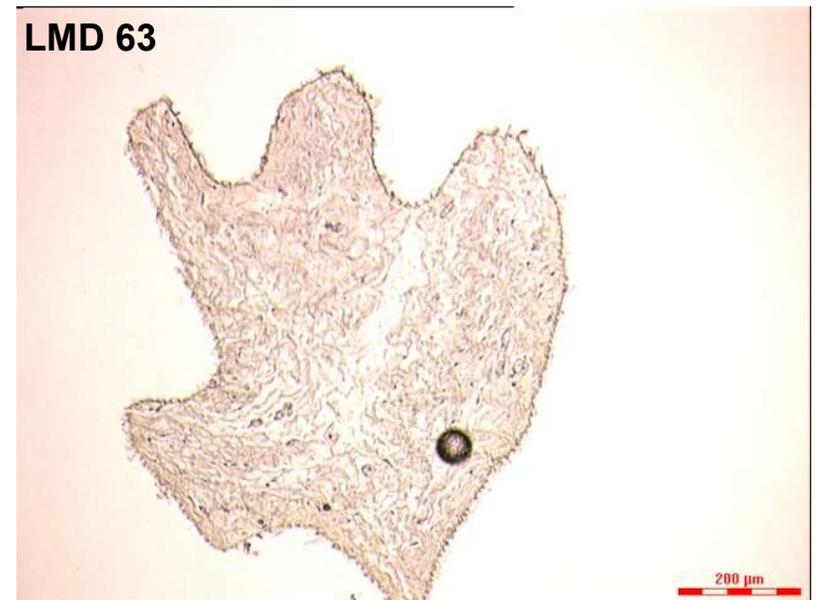
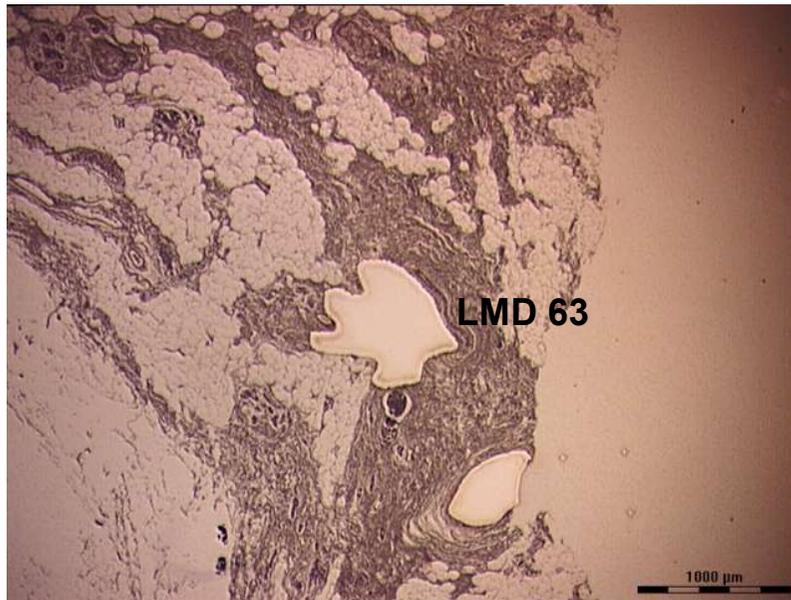


Abbildung 73: LMD Proben 61 und 62.

Abbildung 74: LMD Proben 63 und 64.



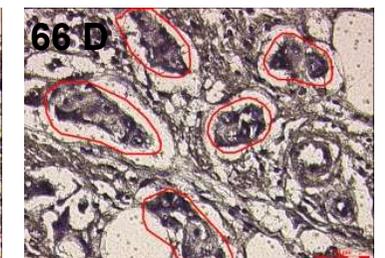
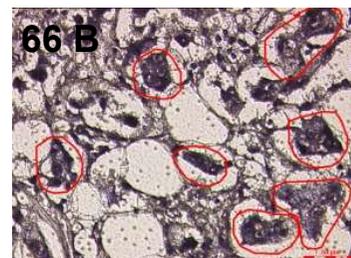
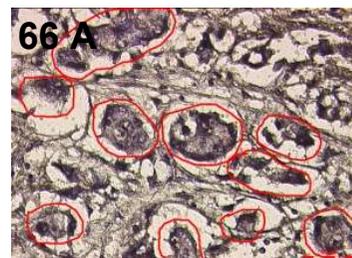
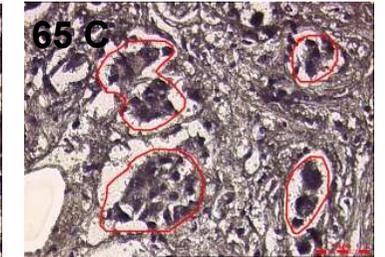
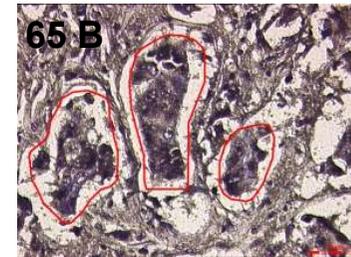
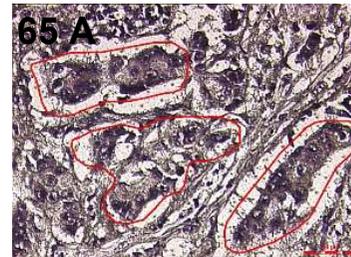
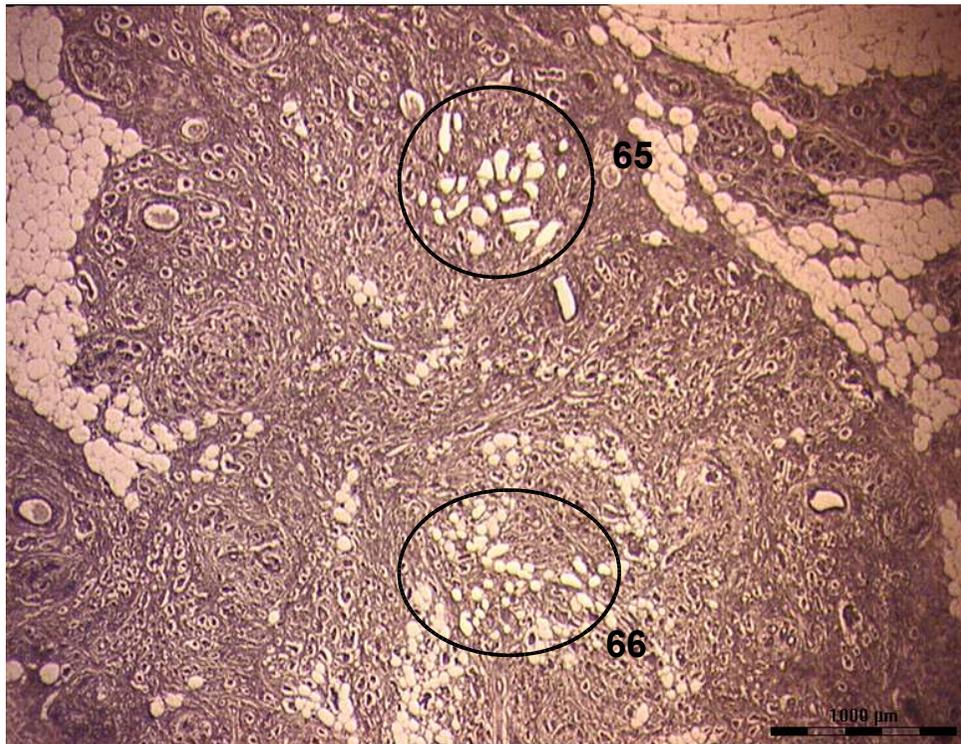


Abbildung 75: LMD Proben 65 und 66.

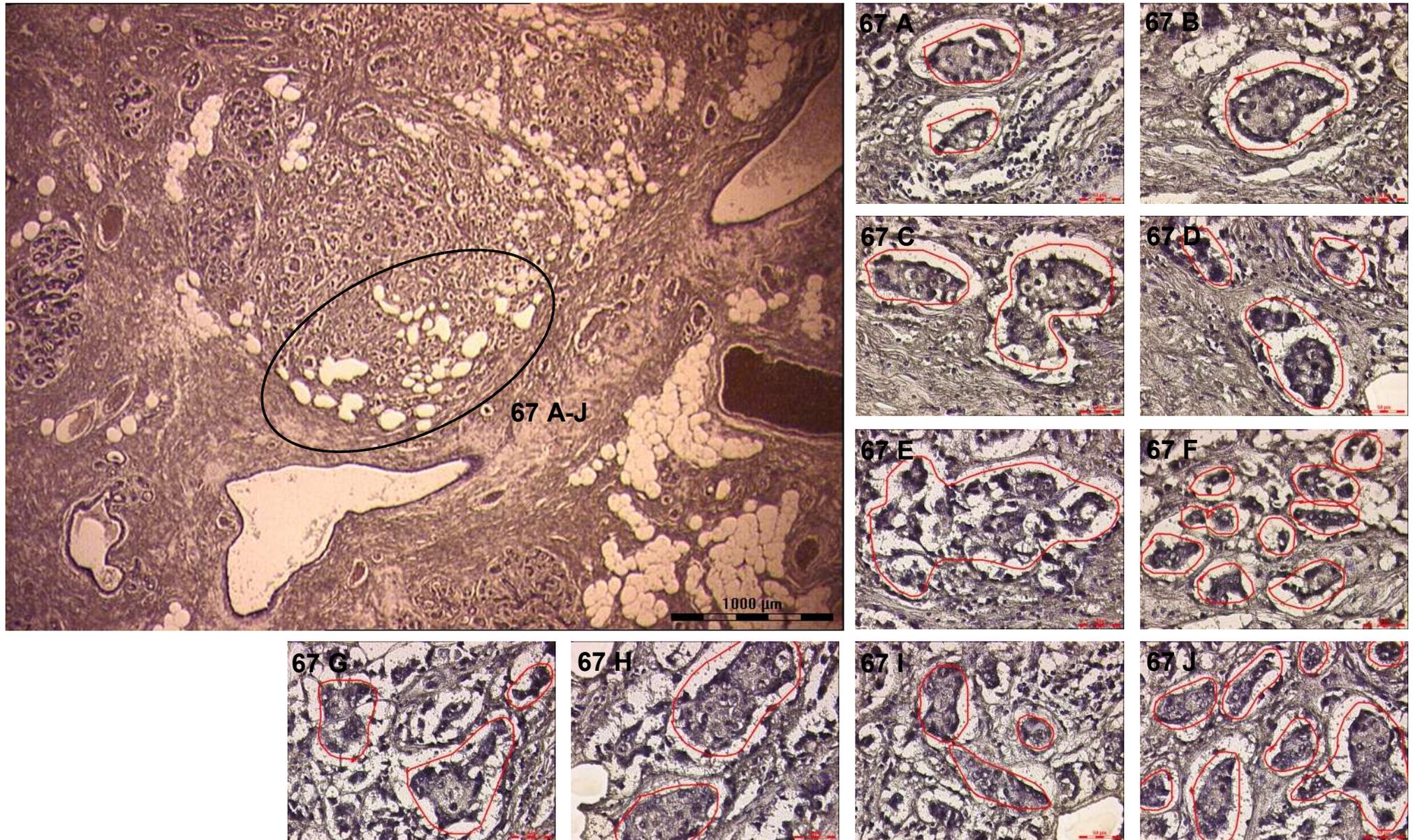


Abbildung 76: LMD Probe 67.

Abbildung 77: LMD Proben 69 und 70.

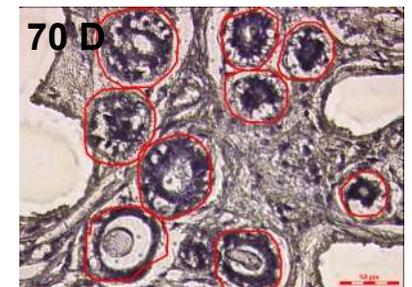
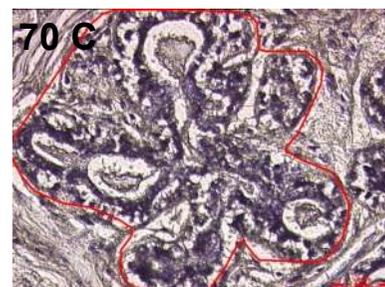
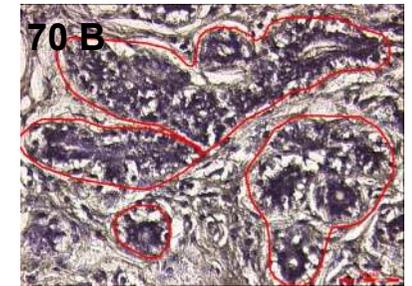
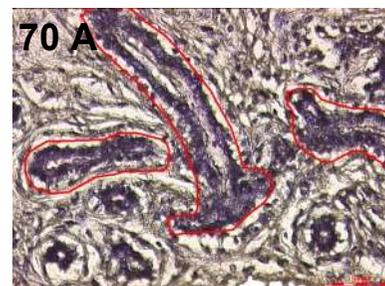
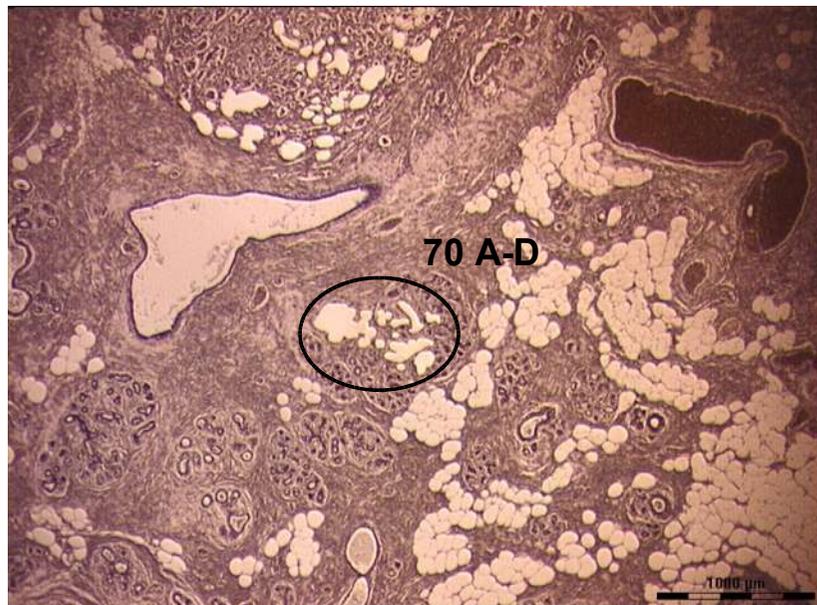
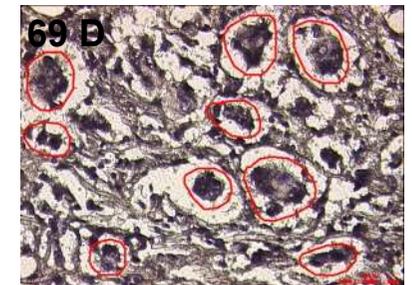
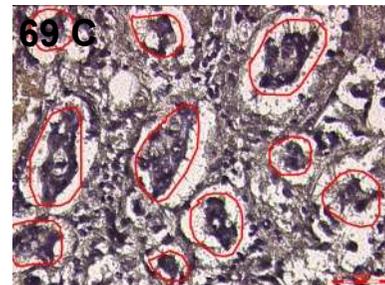
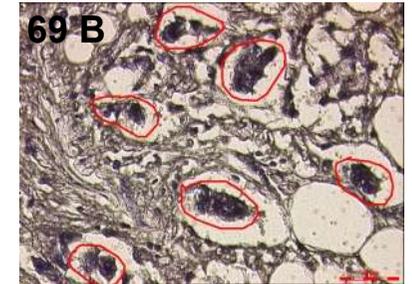
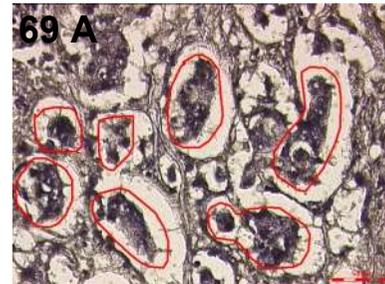
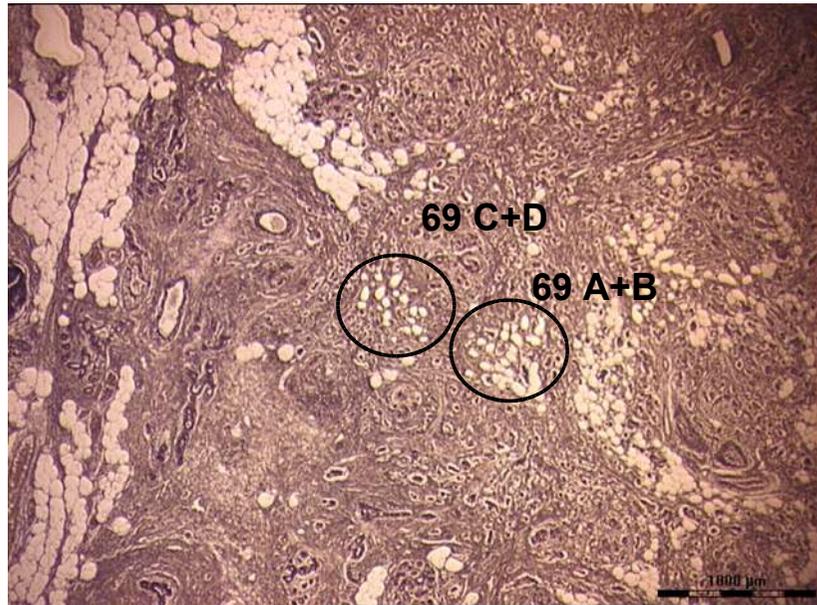
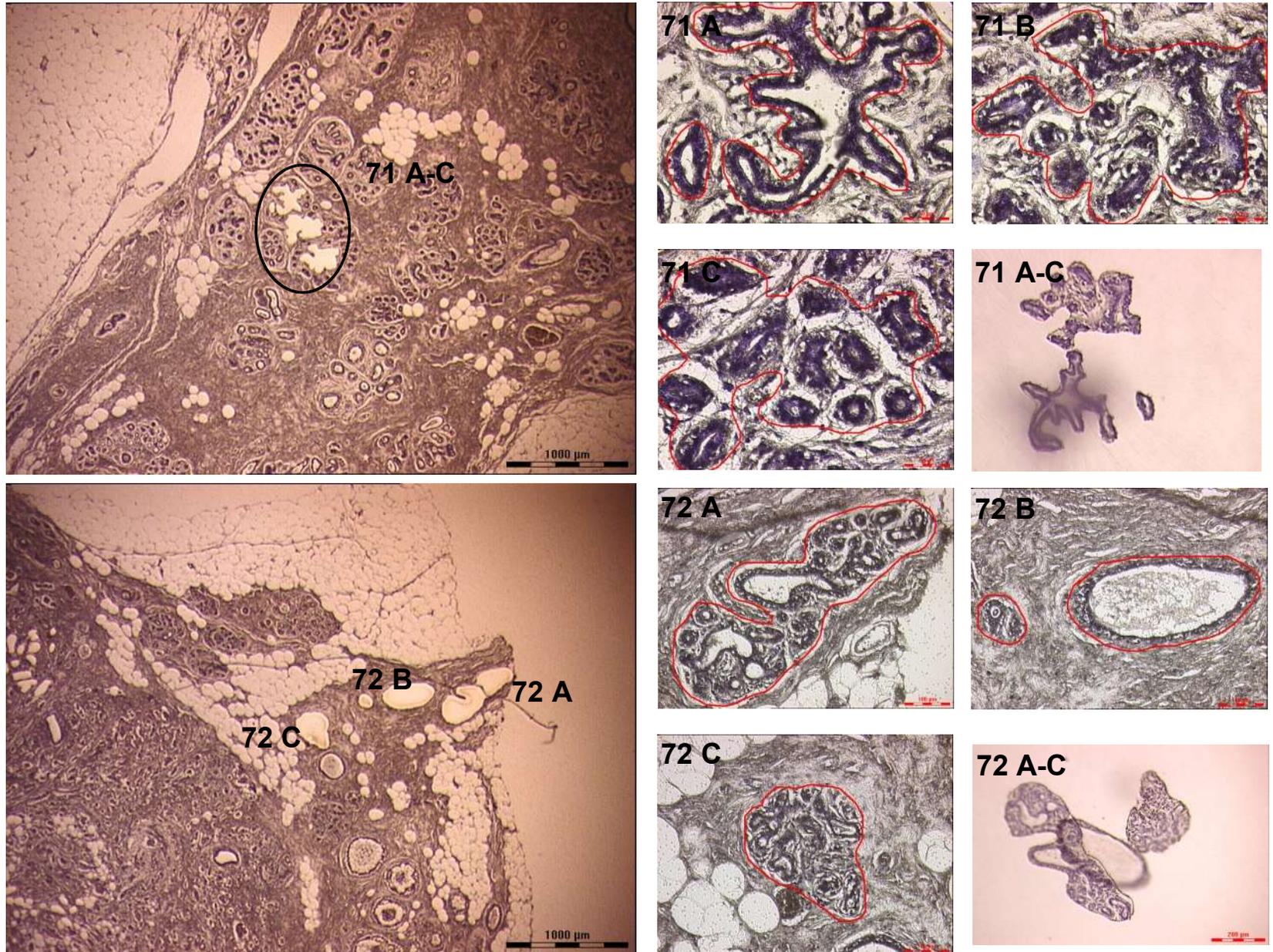


Abbildung 78: LMD Proben 71 und 72.



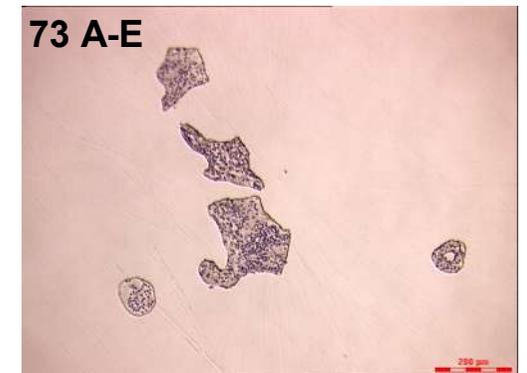
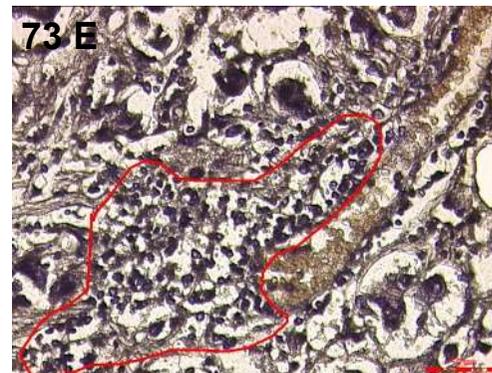
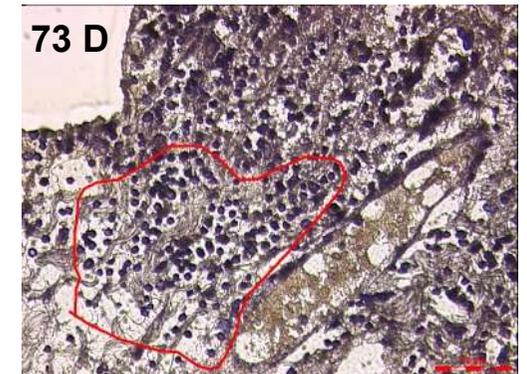
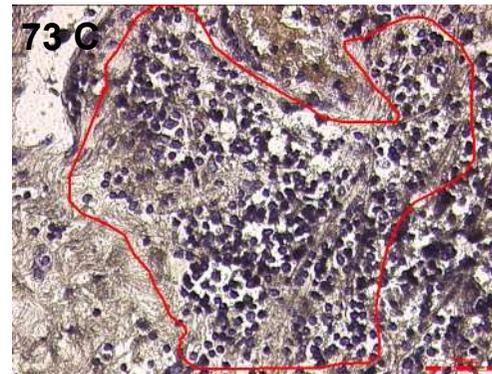
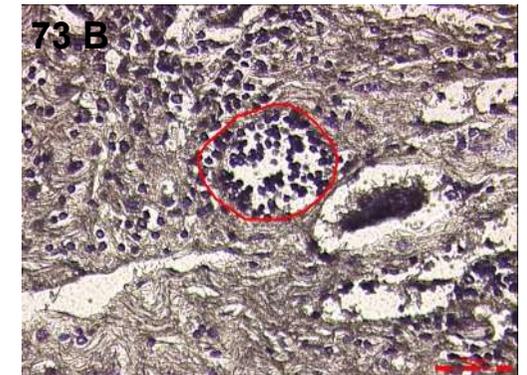
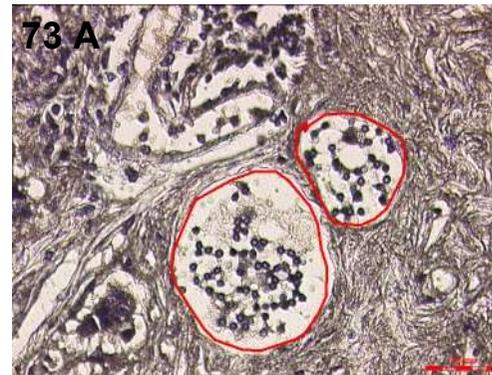
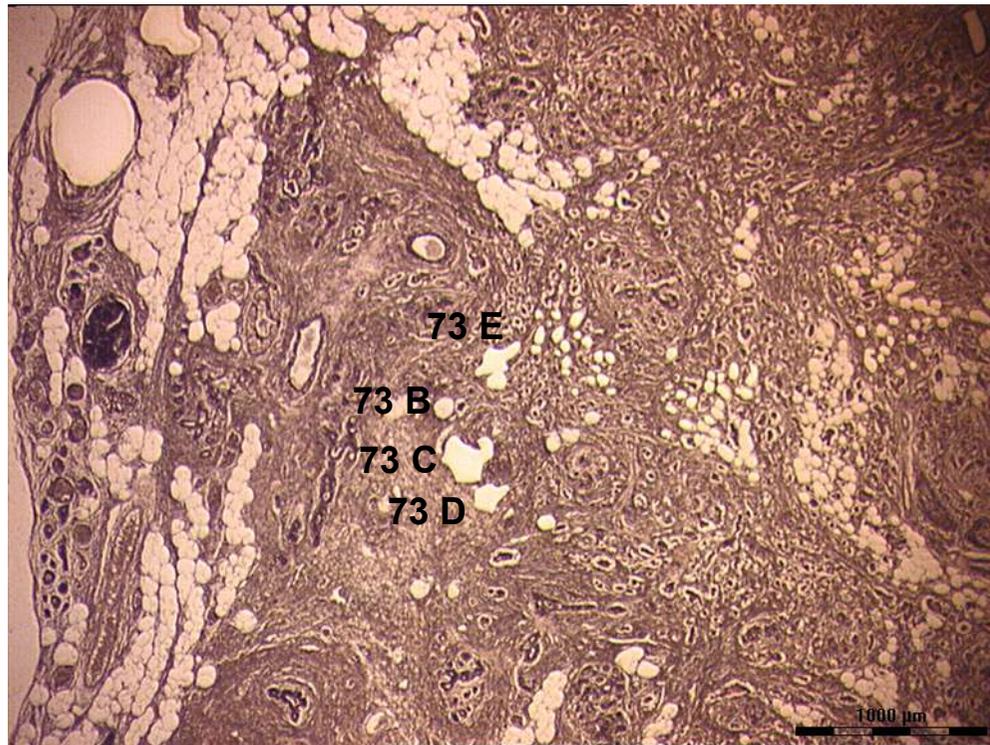
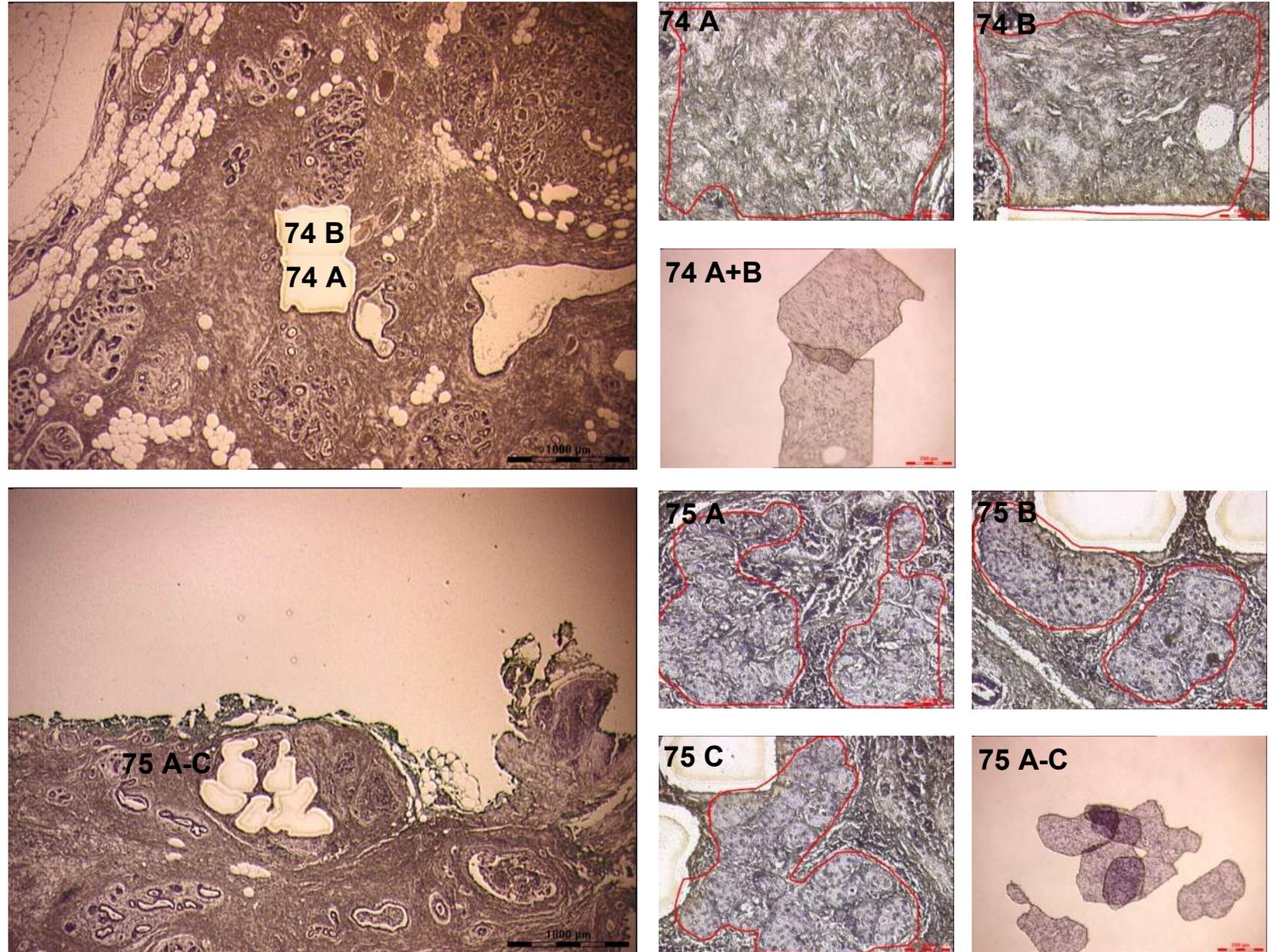


Abbildung 79: LMD Probe 73.

Abbildung 80: LMD Proben 74 und 75.



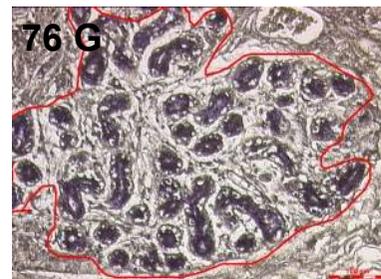
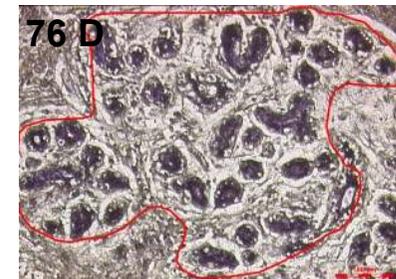
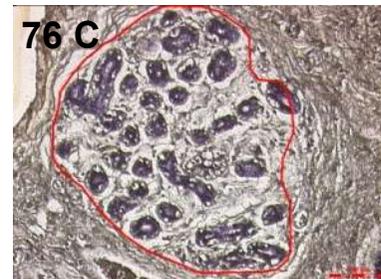
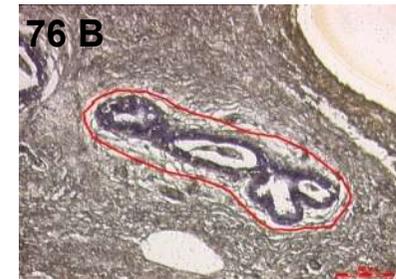
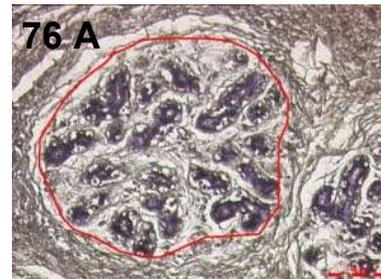
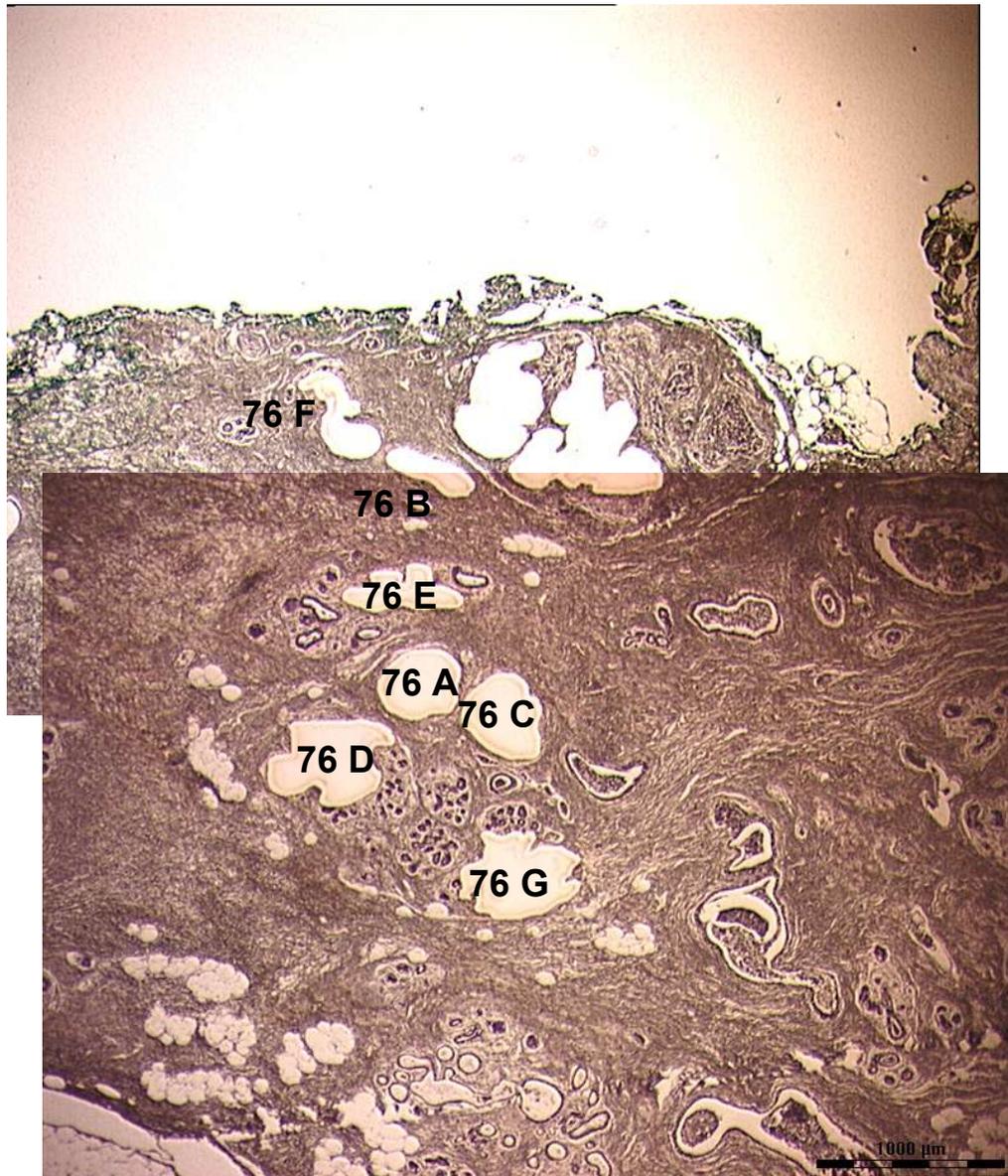


Abbildung 81: LMD Probe 76.

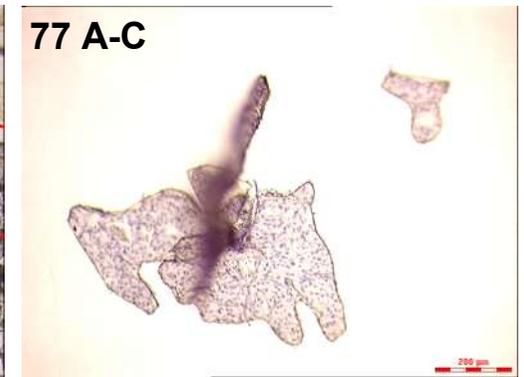
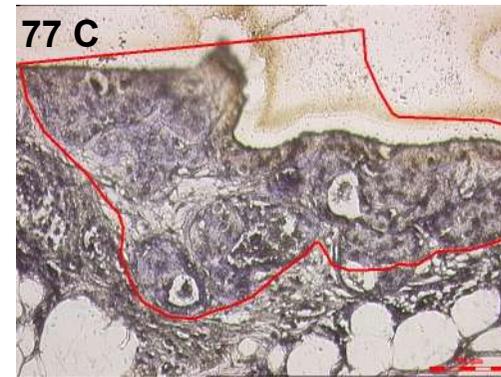
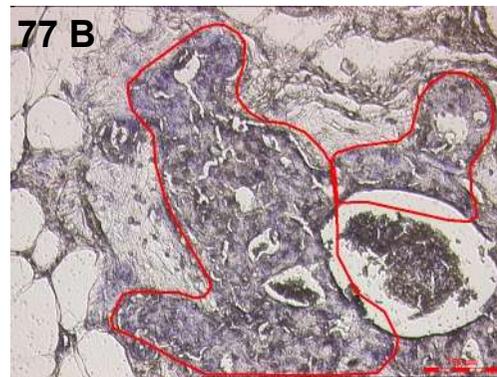
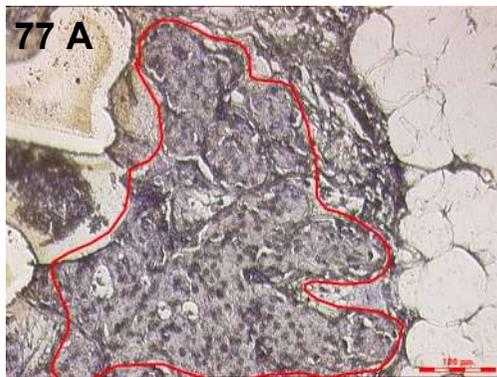
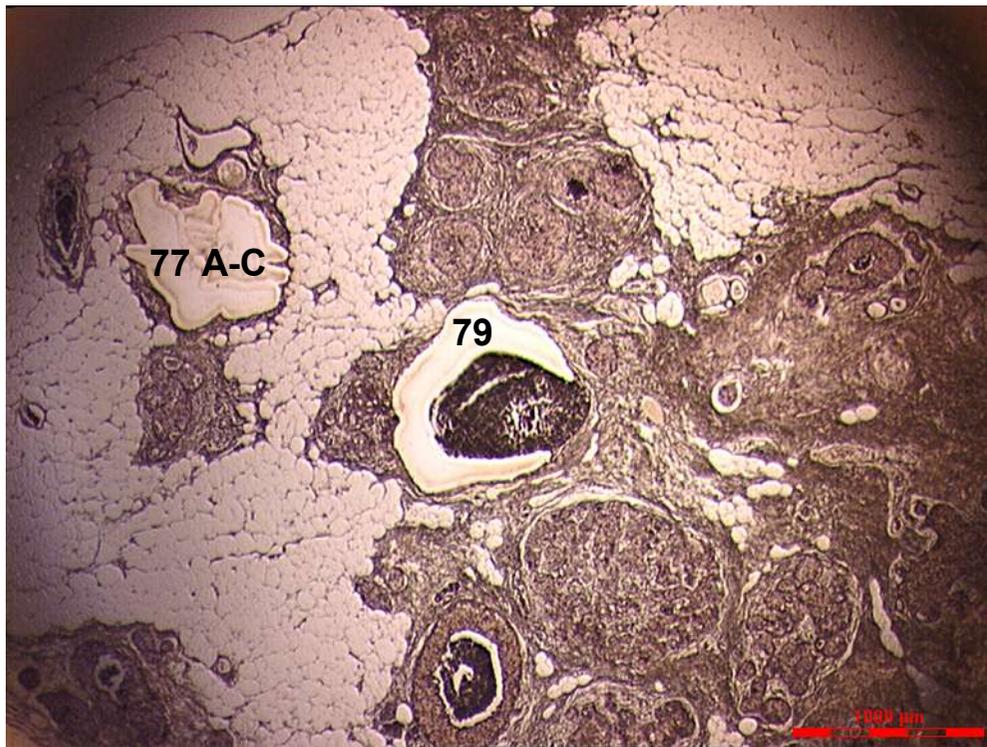


Abbildung 82: LMD Proben 77 und 79.

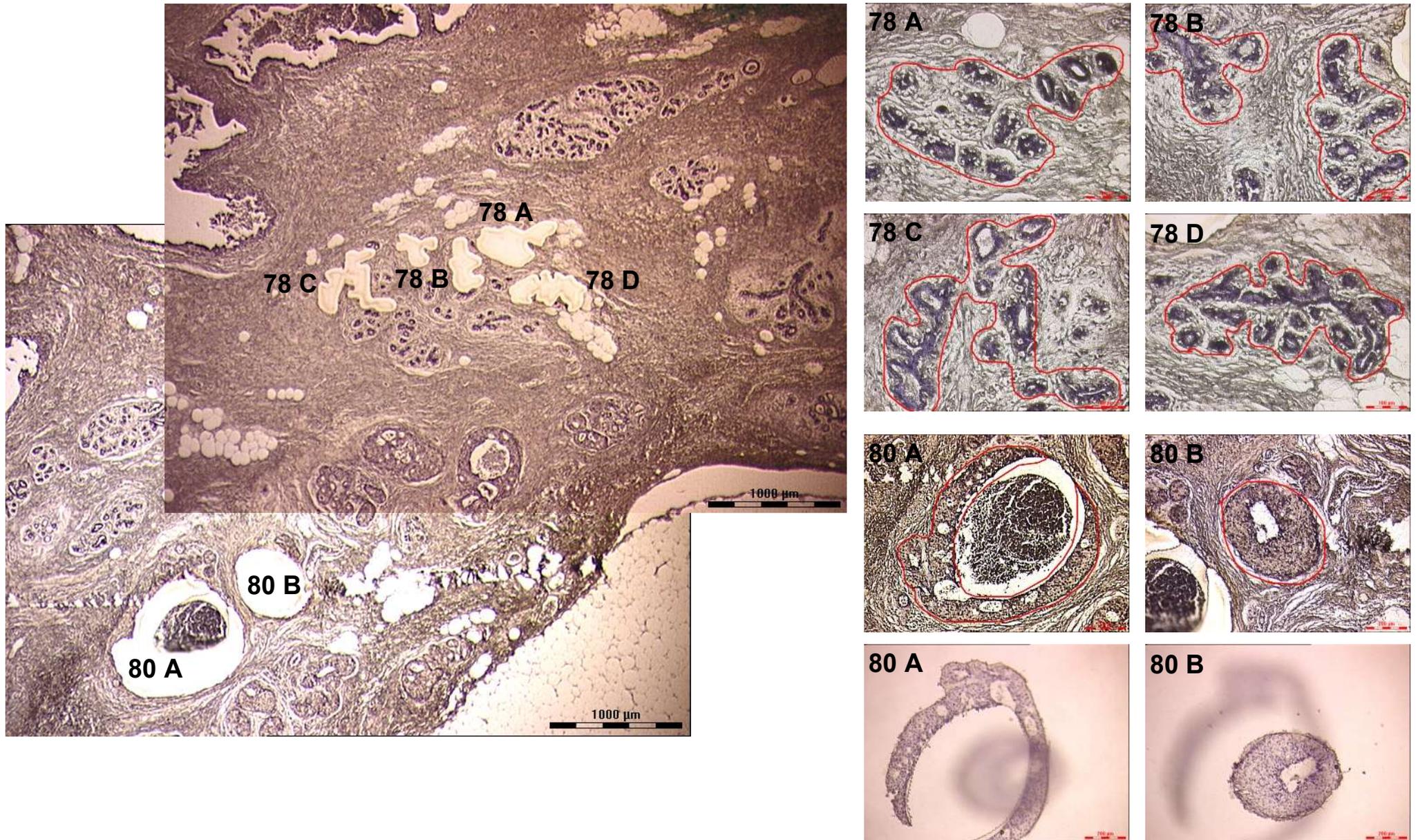


Abbildung 83: LMD Proben 78 und 80.

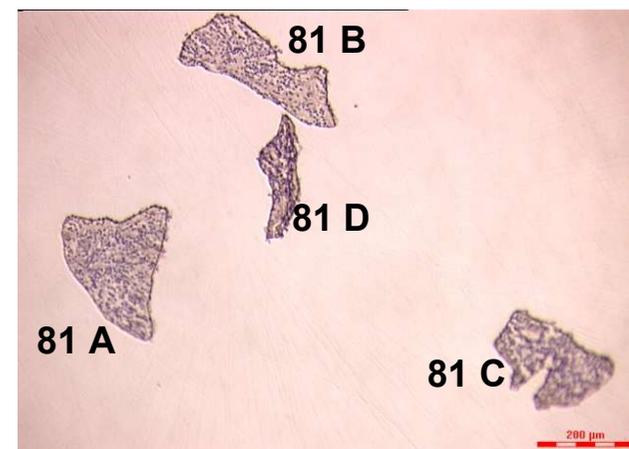
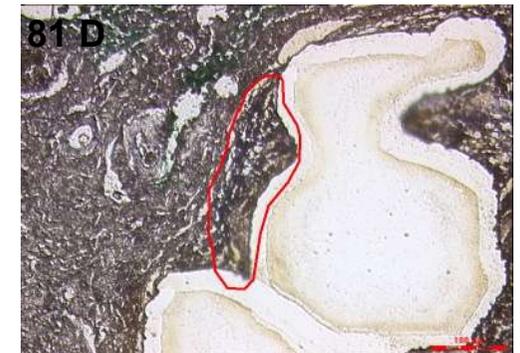
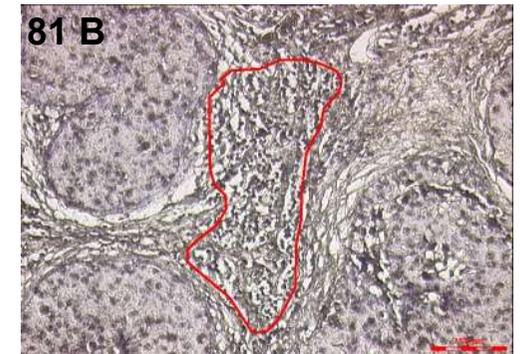
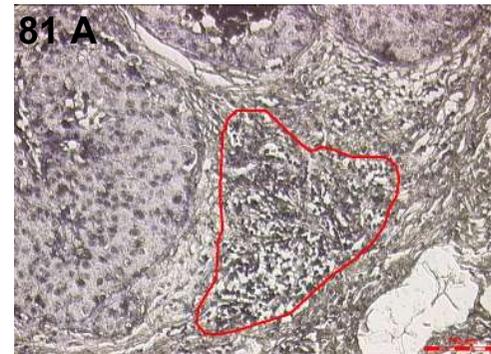


Abbildung 84: LMD Probe 81.

8.4 Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Publikationen (Erstautorenschaft und geteilte Erstautorenschaft):

Dietrich D, Schuster M, Lesche R, Haedicke W, und Kristiansen G (2007). Multiplexed Methylation Analysis – A New Technology to Analyse the Methylation Pattern of Laser Microdissected Cells of normal Breast Tissue, DCIS and Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *Verh Dtsch Ges Path* 91:197-207

Schatz P, Dietrich D, Schuster M (2004). Rapid analysis of CpG methylation patterns using RNase T1 cleavage and MALDI-TOF. *Nucleic Acids Res* 32:e167

Tetzner R, Dietrich D, Distler J (2007). Control of carry-over contamination for PCR-based DNA methylation quantification using bisulfite treated DNA. *Nucleic Acids Res* 35:e4

Wissenschaftliche Publikationen (Mitautorenschaft):

Nimmrich I, Sieuwerts AM, Meijer-van Gelder ME, Schwöpe I, Bolt-de Vries J, Harbeck N, Koenig T, Hartmann O, Kluth A, Dietrich D, Magdolen V, Portengen H, Look MP, Klijn JG, Lesche R, Schmitt M, Maier S, Foekens JA, Martens JW (2007). DNA hypermethylation of PITX2 is a marker of poor prognosis in untreated lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. im Druck

Veröffentlichte Patentanmeldungen:

Foekens JA, Harbeck N, König T, Maier S, Martens JWM, Model F, Nimmrich I, Rujan T, Schmitt M, Lesche R, Dietrich D, Müller V, Kluth A, Schwöpe I, Hartmann O, Höfler H (2005). Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. Patent EP1561821

Dietrich D, Schatz P, Schuster M, Kluth A (2005). Method for Analysis of Cytosine Methylation. Patent WO2005093095

Ballhause M, Berlin K, Dietrich D, Kluth A, Schuster M, Wagner U, Wasserkort R, Ziebarth H (2006). Methods for providing DNA fragments derived from an archived sample. Patent WO2006039563

Foekens JA, Harbeck N, König T, Maier S, Martens JWM, Model F, Nimmrich I, Schmitt M, Lesche R, Dietrich D, Müller V, Kluth A, Schwöpe I, Hartmann O, Adorjan P, Marx A, Höfler H (2006). Method and nucleic acids for the improved treatment of breast cell proliferative disorders. Patent EP1692316

Tetzner R, Dietrich D (2006). A method for the carry-over protection in DNA amplification systems targeting methylation analysis achieved by a modified pre-treatment of nucleic acid. Patent WO2006040187

Dietrich D, Lesche R, Nimmrich I, Maier S (2006). Prognostic markers for prediction of treatment response and/or survival of breast cell proliferative disorder patients. Patent WO2006133866

Ballhause M, Berlin K, de Voss T, Dietrich D, Liebenberg V, Lofton-Day C, Lograsso J, Maas J, Model F, Schuster M, Sledziewski A, Tetzner R (2006). Method for providing DNA fragments derived from a remote sample. Patent WO2006113770

Dietrich D (2007). Method and nucleic acids for the improved treatment of cancers. Patent WO2007003397

Dietrich D, Tetzner R (2007). Carry-over protection in enzyme-based DNA amplification systems targeting methylation analysis. Patent WO2007141034

Foekens J, Martens J, Eppenberger-Scastori S, Vuaroqueaux V, Spyrtos F, Harbeck N, Schmitt M, Hoefler H, Maier S, Weiss G, Lesche R, Hildmann T, Plum A, Hartmann O, Fassbender A, Dietrich D (2007). Markers for the prediction of outcome of anthracycline treatment. Patent WO2007085497

Eingereichte Patentanmeldungen (noch nicht veröffentlicht):

Dietrich D, Lewin J, Lesche R, Schuster M (voraussichtlich 2008). A method for determining the methylation rate of a nucleic acid. Patent EP061206942

Berlin K, Dietrich D, Kluth A, Schatz P, Wandell M, Tetzner T (voraussichtlich 2008). A method of identifying a biological sample for methylation analysis. Patent EP070900402

Posterpräsentation:

Lesche R, Hartmann O, Martens JWM, Dietrich D, Fassbender A, Maier S, Weiss G, Plum A, Harbeck N, Schmitt M, Eppenberger-Castori S, Spyrtos F, Foekens JA (2006). Identification of Novel DNA Methylation Markers Predicting Outcome in Node-Positive, Anthracycline-Treated Breast Cancer Patients. *The 29th San Antonio Breast Cancer Symposium*

Vortrag (ausgezeichnet mit dem Prädikat „gehört zu den besten Forschungsbeiträgen 2007“):

Dietrich D, Schuster M, Lesche R, Haedicke W, Kristiansen G (2007). Multiplexed Methylation Analysis - A New Technology to Analyse the Methylation Pattern of Laser Microdissected Cells in Different Tissue Components of Ductal Mamma Carcinomas. *91. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*

Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Dimo Dietrich
Greifenhagener Str. 39
10437 Berlin
dimo.dietrich@gmx.de

geboren am 26.03.1976 in Berlin
ledig

SCHULE

1982-88 Südgrundschule in Berlin / Zehlendorf
08/88 – 06/95 Droste-Hülshoff-Oberschule in Berlin (Gymnasium)

ZIVILDIENTST

09/95 – 10/96 Elterninitiative Kindertagesstätte Lankwitz e.V.

AUSBILDUNG

10/96 – 02/01 **Vordiplom Energie- und Verfahrenstechnik**, Technische Universität Berlin
04/99 – 02/01 **Vordiplom Biotechnologie**, Technische Universität Berlin
02/01 – 11/03 **Diplom Biotechnologie**, Technische Universität Berlin
seit 01/04 **Promotion**, Technische Universität Berlin

ARBEITS- UND FORSCHUNGSERFAHRUNGEN

02/98 – 04/98 und **Fernsteuergeräte Kurt Oelsch GmbH**, Werkstofftechnisches Praktikum
09/98 – 10/98

03/00 – 12/00 **Technische Universität Berlin**, Fachgebiet Technische Biochemie, Studienarbeit „Optimierung der Kulturbedingungen von *Dehalococcoides* Stamm CBDB1“

09/01 – 12/01 **Epigenomics AG**, Praktikum

02/02 – 09/02 **Technische Universität Berlin**, Fachgebiet Maritime Technik
Projekt: „Biofouling Prevention on optical Windows“

01/03 – 06/03 **Epigenomics AG**, Diplomarbeit (Thema „Multiplex-PCR mit Bisulfit-behandelter DNA aus und Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten Geweben“)

08/03 – 10/03 **Epigenomics AG**, studentische Hilfskraft

seit 01/04 **Epigenomics AG**, Wissenschaftler, Methodenentwicklung, Forschung im Bereich Brustkrebsprognose und Produktentwicklung diagnostischer Tests