

**Charakterisierung der DNA-Methylierung von Biomarkern  
in Brust- und Darmkrebs**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften

eingereicht an der  
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

**Dipl.-Biochem. Manuel Krispin**

Saarbrücken 2009

Tag des Kolloquiums:

Dekan:

Berichtersteller:

## Danksagung

In erster Linie möchte ich Prof. Dr. Jörn Walter für die Betreuung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, als externer Doktorand an der Universität des Saarlandes eine Doktorarbeit durchzuführen, recht herzlich danken. Bei Prof. Dr. Eckart Meese möchte ich mich für die Übernahme des Amtes als Zweitkorrektor bedanken.

Ich danke der Firma Epigenomics AG und allen Mitarbeitern für das tolle Umfeld und die freundschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Matthias Schuster, der engagiert und mit wertvollen Ratschlägen diese Arbeit betreut hat. Weiterhin danke ich Dr. Dimo Dietrich, der mich in die Geheimnisse der Bisulfidsequenzierung von mikrodisssektierten Zellen eingeweiht hat, sowie Dr. Philipp Schatz, Dr. Reimo Tetzner und Dr. Rene Cortese, mit deren wissenschaftlicher und sozialer Unterstützung ich stets rechnen konnte - und sei es nur um sich bei einem Bier über das Leben eines Doktoranden auszutauschen. Für die lehrreichen Diskussionen über biostatistische Analysen danke ich Oliver Hartmann und Thomas König.

Für die Bereitstellung der mikrodisssektierten Brusttumorproben und der Expressionsdaten für PITX2 möchte ich Dr. John Martens (Department of Medical Oncology, Erasmus MC, Rotterdam) danken. Dr. Stephan Niemann danke ich für die interessanten und aufschlussreichen Diskussionen. Dr. Béla Molnár (Semmelweis Universität, Budapest) möchte ich für die Bereitstellung der klinischen Proben für die Mikrodisssektionsstudie von Darmtumoren und der Expressionsdaten für Septin 9 danken. Sandor Spisak gilt mein Dank für die Anfertigung der Dünnschnitte und der Mikrodisssektion der Darmtumorproben.

Für das Lesen des Manuskriptes danke ich neben Dr. Matthias Schuster und Dr. Reinhold Wasserkort auch Dr. Jörn Lewin und Robert Koch. Sollten noch Fehler in dieser Arbeit zu finden sein, dann liegt es wohl eher an mir als an den fleißigen Lesern meines Manuskripts. Sehr wichtig für das Gelingen dieser Arbeit waren auch meine Familie und Freunde. Meinen Freunden sei für die kreativen und erholsamen Pausen während dieser Doktorarbeit gedankt. An dieser Stelle möchte ich insbesondere meinen Eltern und meiner Freundin Nina Jäger danken, die mich stets motiviert und unterstützt haben.

## A. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. <i>DNA-Methylierung in der Epigenetik</i>	1
1.1.1. Definition der Epigenetik	1
1.1.2. DNA-Methylierung	1
1.2. <i>Die Rolle der DNA-Methylierung bei der Tumorenstehung</i>	3
1.2.1. DNA-Methylierung in Tumorzellen	3
1.2.2. Auswirkungen der DNA-Methylierung auf Signaltransduktions-wege in frühen Phasen der Tumorentstehung	6
1.3. <i>DNA-Methylierungsmarker in Tumoren</i>	11
1.4. <i>Heterogenität von Tumoren</i>	12
1.5. <i>Brustkrebs</i>	14
1.5.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms	14
1.5.2. Arten des Mammakarzinoms	15
1.5.3. Molekulare Biomarker bei Brustkrebs	16
1.5.4. DNA-Methylierungsmarker für Brustkrebs	18
1.5.5. Therapieformen des Mammakarzinoms	20
1.6. <i>Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung</i>	21
1.6.1. Ebenen bei der Analyse von DNA-Methylierung	21
1.6.2. Globale Analyse der DNA-Methylierung	23
1.6.3. Sequenzspezifische Analyse der DNA-Methylierung	23
1.6.4. Quantitative Bisulfit-Sequenzierung	25
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1. <i>Lyse von Gewebeproben und DNA Extraktion</i>	29
2.1.1. Tumorproben zur Identifikation prognostischer Brustkrebs Biomaker	29
2.1.2. Brustumproben für die DNA-Methylierungsanalyse von mikrodisektierten Zellen	29
2.1.3. Darmtumorproben für die DNA-Methylierungsanalyse von mikrodisektierten Zellen	29
2.1.4. Lyse und DNA Extraktion von gefrorenem Frischgewebe	30
2.1.5. Herstellung von histologischen Dünnschnitten	30
2.1.6. Histologische Färbung	30
2.1.7. Mikrodisektion	30

2.1.8. Lyse von mikrodisszierten Proben	31
2.2. <i>Herstellung von DNA Standards</i>	31
2.3. <i>Bisulfitkonvertierung</i>	32
2.3.1. Bisulfitkonvertierung der Standard DNA und DNA aus gefrorenem Geweben	32
2.3.2. Bisulfitkonvertierung von geringen DNA Mengen	33
2.4. <i>DNA Quantifizierung</i>	34
2.4.1. UV Quantifizierung	34
2.4.2. Real-Time PCR Quantifizierung	34
2.5. <i>PCR Amplifikation</i>	35
2.6. <i>Gelelektrophorese</i>	36
2.7. <i>Sequenzierung</i>	36
2.8. <i>Datenanalyse der Bisulfit-Sequenzierung</i>	37
2.9. <i>Statistische Methoden</i>	39
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1. <i>DNA-Methylierungsanalyse in mikrodisszierten Proben aus Brusttumoren</i>	40
3.1.1. Methodenetablierung der DNA-Methylierungsanalyse von Epithel- und Stromazellen aus Brusttumoren	41
3.1.2. Patientinnenvorauswahl	42
3.1.3. PITX2 DNA-Methylierung im heterogenen Tumorgewebe und in Epithelzellen	44
3.1.4. Charakterisierung der DNA-Methylierung elf verschiedener Loci in Epithel- und Stromazellen aus Brustkrebsproben	46
3.1.5. PITX2 Expression in Epithel- und Stromazellen aus Brusttumoren	52
3.2. <i>DNA-Methylierungsanalyse von Stroma- und Epithelzellen aus Darmkrebstumoren</i>	55
3.2.1. Auswahl der Patientenproben für die Mikrodissektion	56
3.2.2. Charakterisierung der DNA-Methylierung von Septin 9 in Epithel- und Stromazellen aus Darmkrebsproben	57
3.2.3. Septin 9 Expression in Epithel- und Stromazellen aus Darmtumoren	62
3.2.4. Charakterisierung der DNA-Methylierung von sechs weiteren Biomarkern in mikrodisszierten Darmkrebsproben	64
3.3. <i>Quantitative Bisulfit-Sequenzierung zur Identifikation potentieller prognostischer Brustkrebs-Biomarker</i>	66

3.3.1.	Auswahl der Patientinnen	66
3.3.2.	Vorgehensweise zur Analyse potentiell prognostischer Methylierungsmarker	68
3.3.3.	Analyse der DNA-Methylierung von CDO1 als prognostischer Biomarker für Brustkrebs	71
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1.	<i>Methode zur DNA-Methylierungsanalyse mikrodisektierter Proben</i>	77
4.2.	<i>Vergleich der Methoden zur Mikrodisektionsanalyse</i>	80
4.3.	<i>Heterogenität innerhalb von mikrodisektierten Arealen gleichen Zelltyps</i>	81
4.3.1.	Mikrodisektionsstudie Brustkrebsbiomarker	81
4.3.2.	Mikrodisektionsstudie Darmkrebsbiomarker	86
4.4.	<i>DNA-Methylierungsanalyse von potentiellen prognostischen Brustkrebsmarkern</i>	89
4.4.1.	Methode zur DNA-Methylierungsanalyse potentieller prognostischer Brustkrebsmarker	89
4.4.2.	CDO1 als prognostischer DNA-Methylierungsmarker für Brustkrebs	90
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>97</b>
6.1.	<i>Primersequenzen</i>	97
6.2.	<i>Veröffentlichungen</i>	103
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>104</b>

### Zusammenfassung

Diese Arbeit umfasst die Charakterisierung der DNA-Methylierung von Biomarkern für Brust- und Darmkrebs auf mikrodisektiertem Gewebe, sowie der Identifizierung neuer prognostischer Marker für Brustkrebs. Im Rahmen der Arbeit wurden dabei Methoden für multiplexierte PCRs von sehr geringen DNA Mengen aus mikrodisektierten Zellen etabliert und optimiert. Es wird gezeigt, dass sich die DNA-Methylierung in heterogenen Tumorproben von der in Epithel- und Stromazellen unterscheidet. Die Analyse der Methylierung des für Brustkrebs prognostischen Biomarkers PITX2 auf Tumorepithelzellen könnte zu einer Verbesserung der prognostischen Aussagekraft beitragen. Die etablierte multiplexierte PCR ermöglicht die Analyse der DNA-Methylierung von PITX2 und acht weiteren Biomarkern aus einer einzigen mikrodisektierten Probe.

Eine weitere multiplexierte Mikrodisektionsstudie untersucht unter anderem die DNA-Methylierung von sieben Regionen des für Darmkrebs diagnostischen Biomarkers SEPT9 in Tumor und Tumor benachbarten Epithel- und Stromazellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Methylierung in den untersuchten Regionen nicht homogen verteilt ist: CpG Inseln im intragenischen Bereich zeigen deutlich stärkere differentielle Methylierung zwischen den Zelltypen als solche im Bereich des Transkriptionsstarts.

Eine quantitative direkte Bisulfit-Sequenzierungsstudie zur Identifizierung von prognostischen Markern in 162 Brusttumoren mit 202 potentiellen Markerkandidaten resultiert in einem DNA-Methylierungs Biomarker im Promotor des Gens CDO1. Dieser zeigte in den untersuchten Brustkrebsproben von adjuvant mit Anthrazyklin behandelten Patientinnen signifikante prognostische Eigenschaften.

## Summary

This thesis describes the characterisation of DNA methylation for known breast and colon cancer biomarkers on microdissected cells, as well as identification of a potential novel prognostic DNA methylation marker for breast cancer. In order to analyse DNA methylation in different regions of a limited number of microdissected cells, a method for multiplexing PCRs was established. The results of this microdissection study in breast tumors showed that the DNA methylation of a biomarker can differ in a heterogeneous sample compared to microdissected epithelial and stromal cells from the same tumor. Evidence is shown that the DNA methylation measurement of the known prognostic biomarker, PITX2, in tumor epithelial cells may even contribute to enhancement of the prognostic power of PITX2.

DNA methylation within seven different regions of the diagnostic biomarker for colon cancer, SEPT9, was investigated in a study of microdissected colon tumor epithelial and stromal cells along with adjacent cells. The results indicate that DNA methylation at different regions of SEPT9 is not homogenous: CpG Islands in intragenic regions of SEPT9 show significantly higher differential DNA methylation levels between the cell types compared to regions close to the transcription start site.

Lastly, a quantitative bisulfite sequencing study was conducted to analyze the DNA methylation of 202 potential biomarker candidates in a retrospective cohort of 162 breast cancer patients. The DNA methylation of CDO1 methylation was shown to be a potential strong predictor for distant metastasis in the cohort of breast cancer patients who received adjuvant anthracycline-based chemotherapy.

## 1. Einleitung

Dieses Kapitel liefert einen Überblick über die komplexe Rolle der DNA-Methylierung bei der Tumorentstehung und deren Verwendung als Biomarker. Es wird auf Methoden zur Analyse der Methylierung, mit Schwerpunkt auf der Technologie der Bisulfit-Sequenzierung, eingegangen. Die biologischen und technischen Erklärungen sollen einen Zugang zur Thematik dieser Arbeit geben und dazu beitragen, die Motivation und Zielstellung verständlich zu machen.

### 1.1. DNA-Methylierung in der Epigenetik

#### 1.1.1. Definition der Epigenetik

Die Genetik beschäftigt sich mit der DNA, ihrer Organisation in Genen und regulatorischen Sequenzen, ihrer Veränderung durch Mutationen und ihrer Vererbung an die nächste Generation. Die Epigenetik untersucht jene Vorgänge, die zur Ausprägung von Merkmalen führen, die nicht auf Veränderungen der DNA-Sequenz beruhen, sondern auf differentielle DNA-Methylierung (siehe Kapitel 1.1.2), Modifikation von Chromatin und post-transkriptionellen Mechanismen zurückzuführen sind [1]. Die X-chromosomale Inaktivierung [2, 3], das Imprinting [4], die Gen-Inaktivierung im Rahmen von Zelldifferenzierung und Entwicklung [5] und die Inaktivierung parasitärer DNA, wie z.B. Transposons und der Abwehr von Viren [6], sind einige Beispiele für Prozesse, an denen epigenetische Effekte involviert sind.

#### 1.1.2. DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine biochemische Modifikation von Nukleotiden mit einer Methylgruppe. In humanen Zellen kann das Nukleotid Cytosin, welches sich 5´ zu einem Guanosin Nukleotid befindet (CpG Kontext), an der C5-Position eine Methylgruppe besitzen. Diese seltene natürliche Base wird 5-Methylcytosin genannt und ist sowohl in Prokaryonten als auch Eukaryonten zu finden. 70% der CpGs im menschlichen Genom enthalten ein methyliertes Cytosin [7]. Insgesamt liegen etwa 2 bis 5 % aller Cytosine als Methylcytosin vor [8]. In Pflanzen hingegen kann der Anteil an methyliertem Cytosin bis zu 40 % betragen. Im Vergleich zu den anderen Dinukleotidkombinationen kommen CpG Dinukleotide im humanen Genom nur zu ca. 20 % der erwarteten Häufigkeit vor. Diese Unterrepräsentation beruht auf einer Selektion, die von der großen Mutationshäufigkeit dieser Duplettsequenz herrührt. Durch spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin

entsteht die Base Thymin, diese wird von den zellulären Reparatursystemen nicht als DNA-fremde Base erkannt und somit auch nicht repariert. Es gibt jedoch im Genom Regionen, welche die statistisch erwartete Dichte von CpGs aufweisen. Diese kurzen Regionen (0,5-4 kb) werden CpG-Inseln genannt und sind während der Evolution stark konserviert. Die Cytosine in den CpG-Inseln sind normalerweise nicht methyliert, somit ist das Produkt einer spontanen Desaminierung die Base Uracil. Diese kann als DNA-fremde Base von den zellulären Reparatursystemen erkannt und dementsprechend repariert werden. Etwa 40 % der Gene des humanen Genoms enthalten in ihren Promotorregionen CpG-Inseln, die in den meisten Fällen nicht methyliert sind [9]. Die DNA-Methylierung beeinflusst die Anlagerung verschiedener Proteine, die an der Verpackung der DNA in die Heterochromatinstruktur beteiligt sind. Dadurch können zum Beispiel methylierungsspezifische DNA-Bindungsproteine die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren verhindern und somit die Transkription der betroffenen Regionen hemmen. Ein vereinfachtes Modell, welches den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Gen Expression beschreibt, beruht darauf, dass Hypermethylierung in der Regel die Transkription „*downstream*“ gelegener Gene durch die Anbindung Methyl-CpG-bindender Proteine, wie MeCP2 [10] oder MBD [11] unterdrückt. Des Weiteren ist die Histondeacetylase mit einem methylierungsspezifischen DNA-Bindungskomplex assoziiert und reprimiert die Transkription [12]. In somatischen Zellen wird die Weitergabe des Methylierungsmusters an die Tochterzellen durch die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1), die sogenannte Erhaltungsmethylase, gewährleistet [13]. Hingegen sind für die „*de novo*“-Methylierung die Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B verantwortlich [14]. In Eukaryonten sind drei DNMT Familien (1, 2 und 3) bekannt. Die DNMT1 und DNMT3 Proteine besitzen jeweils eine N-terminale „regulatorische“ und eine C-terminale „katalytische“ Domäne. DNMT2 besitzt nur die „katalytische“ Domäne. Bis jetzt wurden vier DNMTs identifiziert: DNMT1, DNMT2, DNMT3A und DNMT3B. Zusätzlich wurde noch DNMT3L als Stimulator der DNMT3A und DNMT3B Enzyme identifiziert [15]. DNMT1 weist eine 5-10 fach höhere Präferenz zu hemimethylierter DNA auf [16].

## 1.2. Die Rolle der DNA-Methylierung bei der Tumorenstehung

### 1.2.1. DNA-Methylierung in Tumorzellen

Ursprünglich wurde Krebs als eine Krankheit verstanden, die auf rein genetischen Veränderungen, wie Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen, und auf chromosomalen Anomalitäten beruht [17-21]. Mittlerweile ist bekannt, dass auch epigenetische Veränderungen zur Entstehung von Krebs beitragen. Der reduzierte Grad an DNA-Methylierung in Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen war einer der ersten epigenetischen Unterschiede, die in humanen Tumoren gefunden wurde. Hypomethylierung, also die Reduzierung des Anteils methylierter DNA, findet sich vor allem in repetitiven oder parasitären DNA-Elementen, die in gesunden Zellen normalerweise hypermethyliert vorliegen [22]. Die genetische Instabilität in Tumorzellen, die unter anderem aus der Aktivierung von transponierbaren Elementen resultiert, nimmt in Krebszellen zu [23-25]. Die chromosomale Instabilität in Tumorzellen korreliert mit einer genomweiten Abnahme der DNA-Methylierung [26]. Gleichzeitig wird in Tumorzellen auch eine lokale Zunahme der Methylierung gefunden. Diese sogenannte Hypermethylierung ist insbesondere für den Promotorbereich zahlreicher Gene beschrieben. Die anormale *de novo* Methylierung von CpG Inseln ist charakteristisch für Krebs und findet schon während der frühen Karzinogenese statt [27]. Davon betroffen sind vor allem Tumorsuppressorgene, die im Tumor inaktiviert sind. Gezielte Untersuchungen von Krebszellen ergaben, dass eine große Anzahl von Genen in Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen differentiell methyliert sind. Es wurden bis heute mehr als 120 verschiedene Gene beschrieben, die bei Krebs epigenetische Änderungen im Vergleich zu gesunden Zellen aufweisen.

Einige dieser Veränderungen wurden nur in spezifischen Tumoren gefunden, andere scheinen dagegen in mehreren Tumorarten vorzukommen. Tabelle 1 zeigt eine Liste von einigen Genen die häufig in verschiedenen Tumoren als differentiell methyliert gefunden werden. Die Gene in dieser Tabelle sind nach funktionalen Aspekten geordnet.

Tabelle 1: Anomal methylierte Gene in Tumoren und deren wesentliche Funktionen in einer Zelle

Funktion	Gen	Genname	Chromosom
Apoptose	DAPK	<i>Death associated protein kinase</i>	9q24
	CASP8	<i>Caspase 8</i>	2q33-34
	TMS1	<i>Target of methylation induced silencing</i>	16p11.2-12.1
Angiogenese	THBS1	<i>Thrombospondin-1</i>	15q15
Zellzyklus	RB1	<i>Retinblastoma 1</i>	13q14
	CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	9p21
	CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i>	9p21
	CDKN1B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>	12p13
	TP73	<i>Tumor protein p73</i>	1p36.3
	SFN	<i>Stratifin</i>	1p36.11
	Zelldifferenzierung	MYOD1	<i>Myogenic differentiation 1</i>
PAX6		<i>Paired box 6</i>	11p13
RARB		<i>Retinoic acid receptor, beta</i>	3p24
WT1		<i>Wilms tumor 1</i>	11p13
DNA Reparatur	MLH1	<i>mutL homolog 1</i>	3p21.3
	MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>	10q26
Metastasierung/ Invasion	CDH1	<i>Cadherin 1</i>	16q22.1
	TIMP3	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>	22q12.3
	SERPINB5	<i>Serpin peptidase inhibitor</i>	18q21.3
Arzneimittelresistenz/ Entgiftung	GSTP1	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>	11q13
Transkription/ Transkriptions Faktoren	AR	<i>Androgen rezeptor</i>	X,q11-q12
	ESR1	<i>Estrogen rezeptor 1</i>	6q25.1
	RASSF1A	<i>Ras association (RalGDS/Af-6) domain family1</i> <i>Serine/threonine protein kinase 11</i>	3p21.3
	STK11		19p13.3
	VHL	<i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>	3p26-p25
andere	HIC1	<i>Hypermethylated in cancer</i>	17p13.3
	BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>	17q21
	CD44	<i>CD44 molecule</i>	11p13
	PTGS2	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	1q25.2-q25.3
	CACNA1G	<i>Calcium dependent, voltage-dependent, T type, alpha</i> <i>1G subunit</i>	17q22
	CALCA	<i>Calcitonin-related polypeptide alpha</i>	11p15.2-15.1
	FHIT	<i>Fragile histidine triad gene</i>	3p14.2
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	5p15.33	

Eine Theorie für die Erklärung der Tumorenstehung (Karzinogenese) setzt den Ausfall beider Allele von Tumorsuppressorgenen durch Mutationen, Verlust der Heterozygosität (LOH) und Methylierung, oder einer Kombination dieser Ereignisse in einer einzigen Zelle voraus [28, 29]. Diese entartete Zelle führt durch klonales Wachstum schliesslich zu einem Tumor. Abbildung 1 zeigt schematisch die verschiedenen Möglichkeiten, die zu einem Ausfall eines Tumorsuppressorgens führen können.

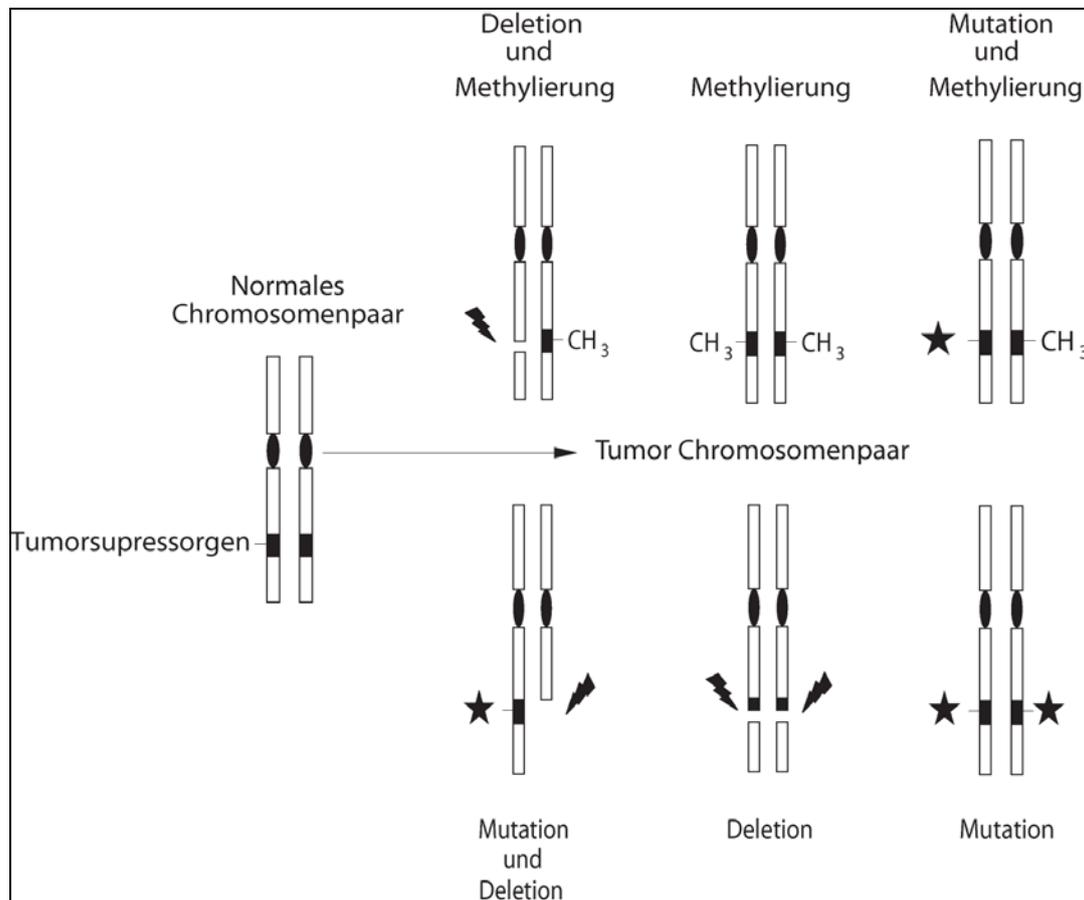


Abbildung 1: Genetische und epigenetische Mechanismen zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Die Mechanismen können zur biallelischen Inaktivierung der betreffenden Gene allein, oder in Kombination auftreten.

Bereits 1953 wurde die Theorie eines möglichen Feldeffektes entwickelt. Die Feldeffekt-Theorie soll die Entwicklung von multiplen Primärtumoren und lokalen Rückfällen nach der Operation erklären. Einige Studien wiesen darauf hin, dass es während der Krebsentstehung 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 die Transformation. Erreichen mehrere Zellen diese Anzahl an Mutationen, dann entstehen multiple Primärtumore. Felder mit einer Größe von bis zu 7 cm wurden bereits in der Literatur beschrieben. Zur Analyse dieser Felder werden vor allem Marker wie p53 Mutationen, Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity* LOH) und Mikrosatellitenveränderungen verwendet [30, 31]. Epigenetische Mechanismen könnten für die Bildung eines Feldes prädestiniert sein. Ein solches Feld könnte auch die DNA-Methylierung des Tumorassoziierten Stromas beeinflussen.

Die Identifikation von Genen, die in Tumoren spezifisch hyper- oder hypomethyliert sind, kann zur Identifikation von neuen Faktoren führen, die für die Tumorentstehung von Bedeutung sind. Gene bei denen die DNA-Methylierung der Zelle einen Überlebensvorteil gegenüber gesunden Zellen verschafft, sind dabei von besonderem Interesse. Aufgrund der längeren Überlebensdauer dieser Zellen wird eine Akkumulation von zusätzlichen genetischen oder epigenetischen Veränderungen ermöglicht, die zur Tumorentstehung beitragen kann.

### 1.2.2. Auswirkungen der DNA-Methylierung auf Signaltransduktionswege in frühen Phasen der Tumorentstehung

Das genetische Veränderungen und die Repression von Genen durch epigenetische Veränderungen zur Entstehung einer Tumorzelle führen können, zeigten Untersuchungen an der Kolon-Zelllinie HCT116. Diese Zellen besitzen verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen, welche bestimmte Tumorsuppressorgene inaktivieren und bestimmte Onkogene aktivieren. Dies führt zu einer Störung von wichtigen Signaltransduktionswegen und zellulären Prozessen (siehe Tabelle 2). Mutationen in einem Allel der Gene, die für die DNA-Fehlbasen-Reparaturproteine MLH1 und p16 kodieren, führen unter anderem zur Störung des cyclin-D-RB1 (*retinoblastoma 1*) Zell-Zyklus-Kontroll Signalweges [32, 33]. Das Gen, welches für den *transforming growth factor-βII* Rezeptor (TGFβ2R) kodiert, ist ebenfalls mutiert. Diese Mutation führt zu einem Verlust der Kontrolle des Signalweges, der die Zelldifferenzierung reguliert [34]. Des Weiteren besitzen diese Zellen eine Mutation in dem β-Catenin Gen, dies führt zu einem konstitutiv aktiven Wnt-Signalweg und zu erhöhter Zellproliferation [35]. Zusätzlich zu diesen spezifischen Mutationen gibt es in den HCT116 Zellen mindestens 14 Gene, deren Expression epigenetisch unterdrückt wird. Die Behandlung der Zellen mit DNA-demethylierenden Agenzien, oder die Störung der Gene, die für die DNA Methyltransferasen kodieren, führt zur Expression der zuvor reprimierten Gene. Die Reaktivierung der Expression dieser für die Wachstumskontrolle der Zellen wichtigen Gene führt zu phänotypischen Veränderungen, die von der Reduzierung der Proliferation bis hin zur Einleitung von Apoptose reichen [32, 36,

37]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass epigenetische Veränderungen bestimmte genetische Mutationen spezifischer Gene komplementieren und es so zu einer Veränderung des Phänotyps in diesen Zellen kommt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Mutierte und hypermethylierte Gene in der Kolonkrebs-Zelllinie HCT116

Signalweg / Funktion	Hypermethylierte Gene	Mutationen	Biologische Effekte
Wnt-Signalweg	SFRP1, SFRP2, SFRP4 und SFRP5	Aktivierende Mutation in CTNNB1	Aktivierung des Wnt-Signalweges, Stamm- und Vorläuferzellenentwicklung, Zellüberleben
Fehlbasenreparatur	Wildtyp Allel MLH1	Zweites Allel von MLH1	Defekte in der Fehlbasenreparatur
Zellzyklusregulation	Wildtyp CDKN2A Allel	Zweites Allel von CDKN2A	Blockiert den Cyclin D-RB1 Signalweg, Zellproliferation
Differenzierung der Epithelialzellen	GATA4, GATA5, TFF1, TFF2, TFF3 und INHA	TGFBR2	Verlust der normalen Zelldifferenzierung
p53-vermittelte DNA-Schadensantwort	HIC1		Verlust der Apoptoseantwort nach DNA Schäden
Zellinvasion	TIMP3		Verlust der Inhibition von Matrix-Metalloproteasen, Förderung der Invasivität

Eine weitere interessante Facette des Zusammenspiels zwischen epigenetischen und genetischen Anomalien tritt in HCT116 Zellen in den Genen MLH1 und CDKN2A auf. Bei diesen Genen besitzt jeweils ein Allel eine genetische Mutation, während DNA Hypermethylierung im Wildtyp Allel zur Repression führt. Dies ist ein Beispiel dafür, dass die Interaktion von genetischen und epigenetischen Veränderungen die Expression von bestimmten funktionalen Genprodukten in Krebszellen verhindern kann. Der Wnt- Signalweg ist ein weiteres Beispiel für die Zusammenarbeit von genetischen und epigenetischen Faktoren bei der Tumorentstehung. Die vier Mitglieder der *secreted frizzled-related* Gen Familie (SFRP1, SFRP2, SFRP4 und SFRP5) kodieren Antagonisten für das Protein Wnt. In den HCT116 Zellen ist die Expression durch DNA Hypermethylierung in diesen Genen unterdrückt. Dies führt zu einer anormalen Aktivierung des Wnt-Signalweges [37]. Zusätzlich findet eine Repression der Transkriptionsfaktoren GATA4 und GATA5, sowie Ihrer „downstream“ gelegenen aktivierenden Interaktionspartner *trefoil factor 1* (TFF1), TFF2, TFF3 und *inhibin-α* statt [38]. Die Repression von TIMP3 (*tissue inhibitor of*

*metalloproteinase 3*) führt zudem vermutlich zu einer erhöhten Invasivität der HCT116 Zellen [39]. Die Bedeutung von so vielen Genen für die Entwicklung eines einzelnen Tumortyps deutet darauf hin, dass DNA-Methylierung kein rein stochastisches Ereignis in Tumorzellen ist. Es handelt sich eher um ein ganzes Netzwerk von Genen, die simultan mehreren epigenetischen Veränderungen in einer entstehenden Tumorzelle unterliegen. Mehrere Autoren vertreten die Auffassung, dass bestimmte Tumortypen eine Art „Hypermethylierungs Phänotyp“ (CpG island methylator phenotype ; CIMP) besitzen [40]. Dieser „Hypermethylierungs Phänotyp“ besteht aus einer spezifischen Gruppe von Genen, die durch Hypermethylierung im Promotorbereich reprimiert sind. Dies führt bei den betroffenen Zellen zu einem Selektionsvorteil, welcher zur Tumorentstehung beiträgt. Die genauen mechanistischen Vorgänge, die in diesen Prozessen eine Rolle spielen, sind bis heute noch nicht vollständig geklärt.

Ein weiterer Faktor, der neben der DNA-Methylierung für die Regulation der Expression eine Rolle spielt, ist die Chromatinmodifikation. Einige Untersuchungen zeigen, dass epigenetische Veränderungen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Tumorentstehung auftreten können. Vorwiegend scheinen sie dabei in frühen Phasen der Entstehung von Neoplasien aufzutreten [41, 42]. Frühe epigenetische Veränderungen könnten somit eine Zelle für genetische Veränderungen in Neoplasien prädisponieren. Zum Beispiel zeigen Untersuchungen, dass die Repression von *MGMT*, welches für eine *O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase* kodiert, die Akkumulation von spezifischen genetischen Mutationen aufgrund des fehlenden Reparaturenzyms forciert [36, 43-47].

Letztendlich wird bei der Tumorgenese ein Punkt erreicht, an dem die Transformation zu einer Tumorzelle vollständig von der anormalen Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Signalwege abhängt [48]. Dabei sind offensichtlich sowohl genetische als auch epigenetische Mechanismen von Bedeutung.

Ein anschauliches Beispiel für dieses Konzept liefert eine Studie, in der nach hypermethylierten Genen bei der Entstehung von Darmkrebs gesucht wurde. In dieser Studie wurde ein neuer Mechanismus entdeckt, der Anomalitäten bei Tumoren im Wnt-Signalweg entstehen lässt [37]. Eine anormale Aktivierung des Wnt-Signalweges resultiert in der Ausbreitung von Stamm- und Vorläuferzellen. Mutationen in dem Gen *APC*, welches für das Tumorsuppressorgen *adenomatosis polyposis coli* kodiert, werden häufig in Kolontumorzellen gefunden. Das mutierte *APC* aktiviert den Wnt-Signalweg. Diese Mutationen wurden als maßgeblich für die Initiierung der Tumorenstehung fast aller Fälle von Kolonkrebs beschrieben. Weinstein *et al.* zeigten, dass in kultivierten Kolonkrebszellen, in denen die Funktion des Gens *APC* wiederhergestellt wurde, eine Inhibierung des Wnt-Signals und Apoptose stattfand [48, 49]. Diese Beobachtung wurde als ein Beispiel für die Entstehung von Tumorzellen durch einen einzigen Onkogen regulierten Signalweg durch Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens beschrieben. Dagegen deuten Studien an

präinvasiven Kolonläsionen, die ein Risiko zur Entstehung von Kolontumoren besitzen darauf hin, dass epigenetische Mechanismen die anormale Aktivierung des Wnt-Signalweges verursachen, bevor es überhaupt zu genetischen Mutationen in diesem Signalweg kommt (siehe Abbildung 2). Präinvasiven Kolonläsionen bestehen aus präadenomatösen und prämaligen Zellen, die aus individuellen Kolon-Epithelzellen herkommen. Die meisten Zellen aus diesen Läsionen besitzen keine Mutationen in den Genen, die den Wnt-Signalweg anormal aktivieren würden. Es wird vermutet, dass bei diesen Zellen die genetischen Mutationen erst im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung entstehen [50-52]. In den Zellen wurde allerdings anormale DNA-Methylierung in den Promotoren der Genfamilie SFRP gefunden. SFRP Proteine besitzen eine Homologie zu den *Frizzeld* Proteinen, welche Rezeptoren für das Wnt Protein sind. Bei den SFRPs handelt es sich um an der Zellmembran lokalisierte Antagonisten bei der Aktivierung des Wnt-Signalweges [53-55]. Der Verlust der Proteinexpression von SFRPs während früher Phasen der Kolon Tumorentstehung, bedingt durch epigenetische Mechanismen, resultiert in einer konstitutiven Aktivierung des Wnt-Signalweges. Ein ständig aktiver Wnt-Signalweg begünstigt Mutationen in anderen Signalwegen, zum Beispiel in denen, die hauptsächlich den APC Komplex inaktivieren und die nukleare Akkumulation von  $\beta$ -Catenin fördern. Diese Zellen würden einen Überlebens- und Proliferationsvorteil besitzen. Die Kombination aus epigenetischen und genetischen Ereignissen aktiviert vollständig den Wnt-Signalweg und fördert die Tumorentwicklung. Ohne die epigenetischen Ereignisse, die das Gen SFRP1 reprimieren und Mutationen die den APC Komplex stören, käme es vermutlich in diesen Zellen nicht zur Tumorgenese. Die Bedeutung der DNA-Methylierung für die Entstehung von Krebs ist heute unumstritten und eröffnet; neben den Möglichkeiten zur Diagnose; auch neue Therapiemöglichkeiten [56, 57].

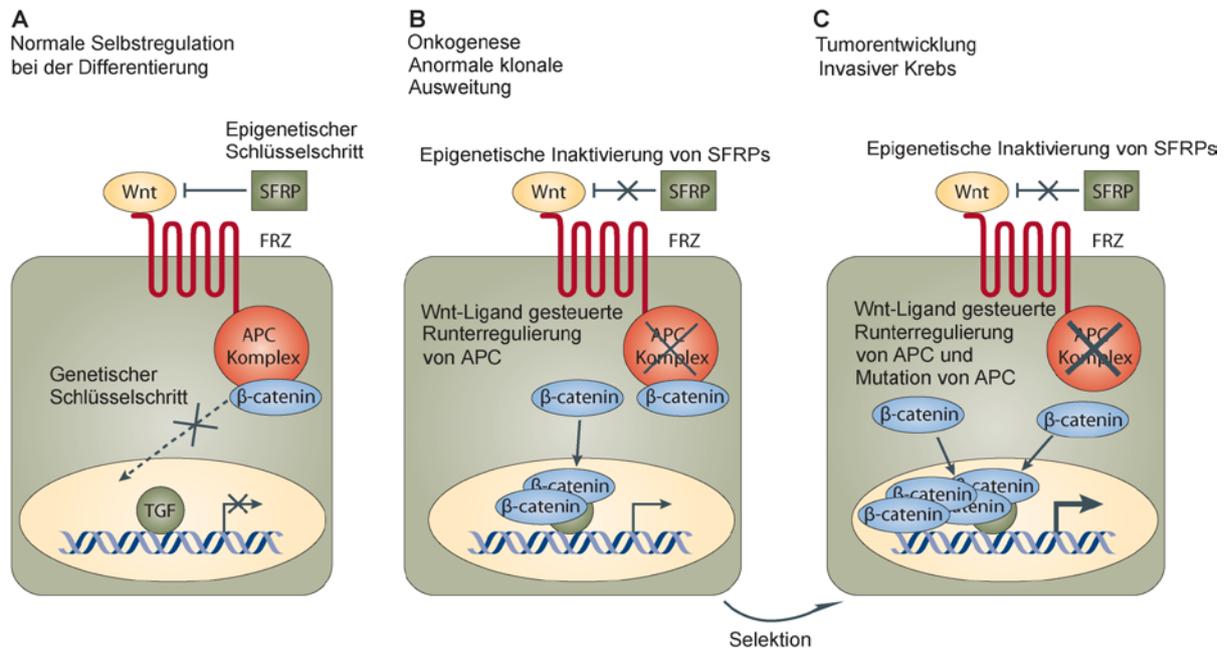


Abbildung 2: Abhängigkeit des Wnt-Signalweges von der Inaktivierung einiger Gene **A.** In normalen Epithelzellen des Kolons agieren SFRPs als Antagonisten des Wnt-Signalweges. SFRPs konkurrieren mit dem Protein Wnt um die Bindung an dem Rezeptor FRZ. Die Expression von SFRPs werden durch DNA-Methylierung reguliert (epigenetischer Schlüsselschritt). Bei einem inaktiven Wnt-Signalweg phosphoryliert der APC Komplex das Protein  $\beta$ -Catenin, dies führt zu einer Degradierung des Proteins. Die Degradierung von  $\beta$ -Catenin verhindert eine Akkumulation von nukleärem  $\beta$ -Catenin und somit auch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (TGF). **B.** Bei einer epigenetischen Repression von SFRP, wird der Wnt-Signalweg durch den Rezeptor FRZ aktiviert. Ein aktiver Wnt-Signalweg führt zu einer Inaktivierung des APC Komplexes, was zu einer Anreicherung von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma und Nucleus führt. Im Nucleus aktiviert  $\beta$ -Catenin die Transkription von MYC, Cyclin D und anderen Genen, die für das Überleben der Zellen und der Zellproliferation eine Rolle spielen. Dies führt zu einer Ausbreitung von Kolon- Epithel- Stamm- und Vorläuferzellen **C.** Ein konstitutiv aktiver Wnt-Signalweg begünstigt das Entstehen von Mutationen in weiteren Signalwegen, z.B. in denen, die den APC Komplex ausschalten und somit die nukleäre (s.o.) Akkumulation von  $\beta$ -Catenin fördern. Die Überlebens- und Proliferationsvorteile führen zu einer Selektion dieser Zellen. Die Kombination aus epigenetischen und genetischen Ereignissen führt zu einer vollständigen Aktivierung des Wnt-Signalweges und unterstützt somit die Tumorentwicklung.

## 1.3. DNA-Methylierungsmarker in Tumoren

Prinzipiell werden vier verschiedene Klassen von Biomarkern unterschieden. Prädispositionsmarker erlauben die Einschätzung des Risikos, dass eine bestimmte Person an einer bestimmten Krebsart erkranken wird. Ein prognostischer Marker verhilft den Krankheitsverlauf einzuschätzen; ohne Berücksichtigung der Art und Intensität einer angewendeten Therapie. Biomarker, die eine Aussage über die Wirkung einer bestimmten Therapie auf den Krankheitsverlauf ermöglichen, werden als prädiktive Marker bezeichnet. Von besonderem Interesse sind diagnostische DNA-Methylierungsmarker, die in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten zu einem frühen Zeitpunkt die Tumorerkrankung nachgewiesen werden können. Für die Detektion der DNA Moleküle von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten, wie zum Beispiel Urin, Sputum, bronchoalveolare Flüssigkeit oder Blut-Plasma ist eine hohe Sensitivität der Methode zur Analyse der DNA-Methylierung notwendig. Mittlerweile ist eine relativ große Anzahl von potentiellen diagnostischen DNA-Methylierungsmarkern für verschiedene Tumorarten identifiziert. In Brustdrüsenaspirat von Brustkrebspatientinnen sind die DNA-Methylierungsmarker D2, RAR $\beta$ , Twist, GSTP1, p16, p14, RASSF1A und DAPK identifiziert [58, 59]. Die DNA Hypermethylierung von TMEFF2, NGFR und Septin 9 wurde als Biomarker für die Diagnose von Darmkrebs in Plasma gefunden [60]. Des Weiteren wurden bereits einige Gene als potentielle prognostische DNA-Methylierungsmarker entdeckt. Die Hypermethylierung von E-Cadherin ermöglicht eine prognostische Aussage über ein krankheitsfreies Überleben bei Magenkrebs [61, 62], sowie bei Mundhöhlenkarzinomen [63]. Laminin-5 wurde als DNA-Methylierungsmarker für die Prognose in Prostata- [64] und Blasenkrebs [65] identifiziert. Die Methylierung von p16 [66, 67], IGFBP-3 [68], APC [69] oder RASSF1A [67] korreliert mit einer verkürzten Überlebensrate bei Lungenkrebs. Die Hypermethylierung von p16 und p15 sind Marker für eine schlechte Prognose bei akuter myeloischer Leukämie [70]. Die Hypermethylierung von Calcitonin [71] und p21 [72] ist verbunden mit einem erhöhten Rückfallrisiko bei akuter lymphatischen Leukämie. Hypermethylierung von GSTP1, APC oder Cyclin D2 konnte zur Identifizierung von Patienten mit einem erhöhten Rückfallrisiko bei Prostatakrebs verwendet werden [73]. Für die Identifikation von Chemotherapieresistenzen konnten ebenfalls einige DNA-Methylierungsmarker gefunden werden. Die DNA Hypermethylierung von MGMT und MLH1 sind als prädiktive Marker identifiziert worden [74]. Eine Veränderung der DNA-Methylierung des Gens ATM führt zu einer erhöhten Sensitivität von Darmkrebszelllinien gegenüber einer Strahlentherapie [75]. Die Hypermethylierung des Gens CHFR korreliert mit der Sensitivität von Magenkrebs gegenüber mitosehemmenden Medikamenten [76]. Für das Ansprechen von Brustkrebspatientinnen auf eine Hormontherapie (Tamoxifen) wurden die DNA-Methylierungsmarker PSAT1 [77] und ESR1 [78] als prädiktive Marker entdeckt. Desweiteren korreliert die Hypermethylierung von RASSF1A mit dem Ansprechen

von Brustkrebspatientinnen auf eine adjuvante Tamoxifen Behandlung [79]. PITX2 erlaubt neben seiner Eigenschaft als prognostischer Marker eine prädiktive Aussage über das Ansprechen von ER positiven, Lymphknoten-negativen Patientinnen auf eine Behandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen [80].

### 1.4. Heterogenität von Tumoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode verwendet, die es ermöglicht die Methylierung vieler Biomarker in geringen Mengen von mikrodisssektierten Zellen zuverlässig zu analysieren (Kapitel 3.1 und 3.2). Das Ergebnis dieser Analyse soll Hinweise 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.

Tumorzellen im Tumorgewebe sind unter anderem von Stroma-, Fett- und gesunden Zellen umgeben. Histomorphologisch betrachtet stellen Tumore somit ein heterogenes Gewebe dar. Befindet sich der zu untersuchende Tumor nahe am Muskelgewebe, so werden sich sehr wahrscheinlich bei der operativen Entfernung des Tumors auch Muskelzellen in der Probe befinden.

Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger Bestandteil der Zelldifferenzierung [81, 82], und Unterschiede in der Methylierung verschiedener Zelltypen sind in zahlreichen Experimenten mit Zelllinien beschrieben. Eckhardt et al [9] analysierten die DNA-Methylierung der Chromosomen 6,21 und 22 in zwölf verschiedenen Geweben und fanden in circa 18 % der untersuchten CpG Inseln die in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich methyliert sind. Insbesondere bei Tumoren treten häufig Unterschiede in der DNA-Methylierung in den verschiedenen Zelltypen auf. Bleibt die Gewebemorphologie während der Analyse des Biomarkers erhalten, kann der Einfluss der Heterogenität der Zellen eines Tumors auf die Quantifizierung der Methylierung vernachlässigt werden. Viele etablierte Tests für Biomarker basieren auf *in situ* Hybridisierungen (FISH) oder immunohistochemischen (IHC) Verfahren. Bei diesen Methoden findet die Detektion des Analyten im Gewebedünnschnitt, direkt in seiner natürlichen Umgebung, statt. Mit diesen Verfahren sind in der Regel jedoch nur semiquantitative Aussagen möglich. Für die Analyse der DNA-Methylierung ist ein *in situ* Verfahren zwar beschrieben [83], wurde bisher aber nicht wieder reproduziert. Bei den gängigen Methoden zur Untersuchung der Methylierung wird die DNA aus den Geweben isoliert, die Zusammensetzung der DNA aus den einzelnen Zellen in dem Extrakt spiegelt die des Gewebes wieder. Die DNA-Methylierungen, die spezifisch für bestimmte Zellen des Tumors sind, können durch einen höheren Anteil anderer Zellen „überdeckt“ werden. Dies führt zu Problemen, wenn der Anteil an methylierter DNA für die Aussagekraft eines

Biomarkers relevant ist. Des Weiteren ist die Identifikation der Zellen, die die relevante DNA-Methylierung besitzen, nicht mehr möglich. Wichtige Informationen, die wesentlich zum Verständnis der Biologie des Biomarkers beitragen könnten, gehen verloren.

Die Laser Mikrodisektion (LMD) ist eine Technologie, mit der reine Populationen von Zellen unter einem Mikroskop für nachfolgende Untersuchungen aus Gewebeschnitten mit einem eingekoppelten Laser ausgeschnitten und aufgefangen werden können [84]. Seit der Entwicklung der LMD wurden eine Vielzahl von Studien aus den Bereichen der Transkriptom-, Genom- und Proteomkrebeforschung unter Verwendung dieser Technologie publiziert [85]. Mit LMD lassen sich entartete Tumorzellen von umgebenden Zellen isolieren. Dies ermöglichte zum Beispiel eine verbesserte Analyse von LOH (*Loss of Heterozygosity*) Markern, indem entartete Epithelzellen von anderen Zelltypen eines Gewebes isoliert wurden [86-93]. Die Verwendung von LMD kann deutlich zu einer Erhöhung der Sensitivität von LOH Analysen führen [87]. Die Technologie ermöglicht Befunde für die einzelnen Zelltypen in einem Tumor. So fanden Kurose *et al.* [89] und Cavalli *et al.* [93], dass LOH nicht nur in den entarteten Tumorzellen, sondern auch im anliegenden Stroma und nicht-tumorösen Epithelgewebe vorkommt. Die LMD Technologie hat sich mittlerweile auch für CGH (*Comparative Genome Hybridization*), SNP-, Mutations- und Proteinanalysen bewährt [94-102]. Am weitesten verbreitet ist die LMD Technologie bisher jedoch 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 [103-106]. Ein großer Wert für die Identifizierung und Charakterisierung von Biomarkern steckt dabei in der Kombination aus LMD und Hochdurchsatz RNA-Chip Technologie. In Verbindung mit einer Voramplifikation der RNA [107, 108] lassen sich genaue Expressionsprofile der im Tumor enthaltenen Zell-Komponenten erstellen, und sich so wertvolle Erkenntnisse über die Biologie gewinnen [109-115]. Für die Analyse der DNA-Methylierung wurde die LMD Technologie im Vergleich relativ selten verwendet. Die bisher publizierten Methoden erlauben entweder nur eine qualitative Aussage oder benötigen in der Regel mehr als 1000 Zellen für eine akkurate Bestimmung der Methylierung eines einzigen Biomarkers.

## 1.5. Brustkrebs

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Charakterisierung und Identifizierung von DNA-Methylierungsmarkern zum überwiegenden Teil an Brusttumormproben untersucht (Mammakarzinom). Dieses Kapitel soll eine allgemeine Übersicht in die komplexe Thematik dieser Brustkrebserkrankung geben.

### 1.5.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Weltweit erkrankten nach Schätzungen der IARC (*International Association for Research on Cancer*) im Jahr 2002 zirka 1,5 Millionen Frauen an Brustkrebs, 410.000 starben daran [116]. In Deutschland erkrankten derzeit jährlich über 57.000 Frauen an Brustkrebs (ca. 27,8 % aller Krebserkrankungsfälle bei Frauen). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 63 Jahren und damit sechs Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen [117]. Für das Auftreten von Neuerkrankungen (Inzidenz) und bei der Sterblichkeit (Mortalität) treten zudem große geographische Unterschiede auf. Die Inzidenz in Deutschland liegt im europäischen Vergleich im oberen Mittelfeld, Nord- und Westeuropa besitzen eine deutlich höhere Inzidenz als 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 Europäischen Sterblichkeitsrate. Trotz höherer Inzidenz in den USA liegt dort die Mortalität geringfügig unter der von Westeuropa [116]. Die Inzidenz von Brustkrebs nimmt zu und hat sich in Deutschland zwischen 1972 und 2002 ungefähr verdoppelt [117]. 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. Während sich bei den über 75-jährigen kein Rückgang beobachten lässt, ging die Mortalität bei den unter 50 jährigen um 20 – 30 %, bei den 50- bis 74 jährigen um 10 - 15 % zurück. Die Heilungschancen von Krebserkrankungen werden mit der 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate ausgedrückt. Die relative 5-Jahres-Überlebenszeit beträgt derzeit, über alle Stadien betrachtet ca. 81%, und liegt damit im Vergleich zu anderen Krebserkrankungen relativ hoch (z.B. liegt die 5-Jahres-Überlebensrate von Magenkrebs bei 31 %, die von Lungenkrebs bei 15 %). 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.

### 1.5.2. Arten des Mammakarzinoms

Etwa drei Viertel aller Geschwülste (Tumore) der weiblichen Brust sind gutartig (benign). Benigne Tumore gehen überwiegend vom Bindegewebe (Fibroadenome), von Fettgeschwülsten (Lipome) oder von mit Flüssigkeit gefüllten Hohlräumen (Zysten) aus. Gutartige Tumore sind kein Krebs und es besteht eine sehr geringe Gefahr der Bildung von Tochtergeschwülsten (Metastasen). Als Frühformen von Brustkrebs werden die so genannten Oberflächenkarzinome (lat. "*in situ carcinoma*") bezeichnet. „*In situ*“-Karzinome wachsen nicht invasiv und bilden sich zu 95 % in den Milchgängen (*Duktales Carcinoma in situ*, DCIS) und zu 5 % in den Drüsenläppchen (*Carcinoma lobulare in situ*, LCIS). Neben diesen Hauptgruppen des Mammakarzinoms gibt es einige seltenere Varianten, die sich aufgrund ihrer Histologie von den duktalem und lobulären Karzinomen unterscheiden [118]. Innerhalb der beiden Hauptgruppen erfolgt eine weitere Unterteilung entsprechend der Entwicklungsstufe, in der sich der Tumor gerade befindet. Dabei geht man davon aus, dass es im Verlauf einer Brustkrebserkrankung zu einer linearen Progression über die Entwicklungsstadien einer atypischen Hyperplasie des Karzinoms *in situ* und letztlich des invasiven Karzinoms kommt (siehe Abbildung 3). Entsprechend erfolgt die Einteilung in 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 dadurch aus, dass die entarteten Zellen noch auf das ursprüngliche Gewebe, d.h. die Duktuli oder die Lobuli begrenzt sind und das benachbarte Gewebe noch nicht infiltrieren. Neben dieser histologischen Klassifizierung werden auch die Ausbreitung und die Differenzierung des Tumors beschrieben. Die Klassifizierung der Ausbreitung erfolgt in der Regel nach dem TNM-System [119].

„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 [120]. 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).

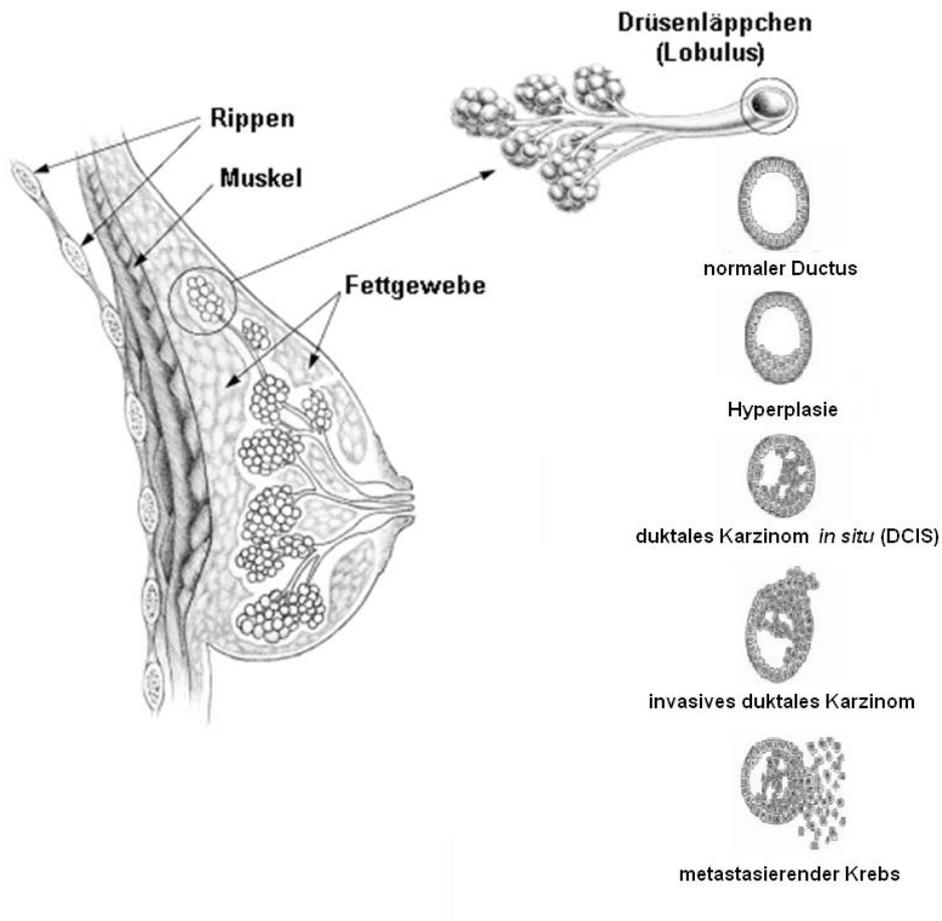


Abbildung 3: Anatomie der weiblichen Brust und schematische Darstellung der Brustkrebsentstehung am Beispiel des duktales Karzinoms.

### 1.5.3. Molekulare Biomarker bei Brustkrebs

Brustkrebs entsteht zu 95% sporadisch aus einer Vielzahl genetischer Veränderungen in den Epithelzellen des Brustgewebes. Bei 5% handelt es sich um Brustkrebskrankungen aufgrund vererbter Prädisposition (weshalb sie auch familiär bedingter Brustkrebs genannt wird). Die bekanntesten Veränderungen betreffen die Genloci BRCA1 und BRCA2 (*Breast Cancer 1* und *2*). Es handelt sich um Tumorsuppressorgene, die Wachstum und Differenzierung im Brustepithel regulieren. Frauen, bei denen in diesen Genen Mutationen nachweisbar sind, haben eine 30 - 80 prozentige Wahrscheinlichkeit in ihrem Leben Brustkrebs zu entwickeln, wobei dieser häufig schon vor dem 50. Lebensjahr auftritt [121-124]. Für die Brustkrebsfrüherkennung (Diagnose) ist die Mammographie die Methode der Wahl. Diese Methode führt zu einer Senkung der Mortalität. Von 2000 Frauen werden jedoch im Durchschnitt 10 gesunde Frauen falsch als Brustkrebspatientinnen diagnostiziert, was zu einer unnötigen Behandlung dieser Frauen führt [125]. Von großem klinischem Interesse sind daher Biomarker, welche die Anzahl der falsch positiv getesteten Frauen reduzieren

und/oder durch ein früheres Erkennen der Krankheit die Mortalität weiter reduzieren können. Bislang sind solche diagnostischen Biomarker jedoch noch nicht in der klinischen Routine etabliert. An entsprechenden Markern wird zurzeit geforscht. Desweiteren sind prognostische und prädiktive Biomarker (siehe Kapitel 1.3) von hohem klinischem Interesse, die genauere oder zusätzliche Informationen des Krankheitsverlaufs neben einer Prognostizierung anhand der TNM-Klassifizierung (siehe Kapitel 1.5.2), des Alters der Patientin und des *Gradings* liefern. Dabei ist häufig eine klare Abgrenzung von prädiktiven und prognostischen Biomarkern nicht möglich, da einige dieser Marker bei unbehandelten Patientinnen sowohl einen guten Krankheitsverlauf prognostizieren als auch zusätzlich das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen.

Die Hormonrezeptoren Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PgR) sind bekannte prognostisch-prädiktive Biomarker, die bereits seit vielen Jahren standardisiert in der klinischen Routine eingesetzt werden [126]. Mehr als 70 % aller Brustkrebstumore sind ER positiv [127]. 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 [126, 128, 129]. Der ER- und PgR-Status wird zum Prognostizieren eines progressiven Krankheitsverlaufs und für die Wahl einer adjuvanten Hormontherapie verwendet [128]. Eine Prognose anhand des ER-Status lässt sich jedoch nur für die erste Zeit nach der Operation stellen. Bereits für das rückfallfreie Überleben nach zirka sieben Jahren ist der ER-Status kein prognostischer Biomarker mehr [130]. Entsprechend der biologischen Funktion des Östrogenrezeptors sprechen ER $\alpha$  und PgR positive Patientinnen in der Regel gut auf adjuvante Hormontherapien an [129]. Ungefähr 20 – 30 % aller invasiven Brustkrebstumore besitzen eine Amplifikation des HER-2/neu Locus und eine Überexpression des entsprechenden Proteins [131]. Heutzutage ist die Bestimmung der HER-2/neu Expression zusammen mit der ER und PgR Bestimmung eine Standarduntersuchung in der klinischen Routine [132]. Die Amplifikation und Überexpression von HER-2/neu geht einher mit einer schlechten Prognose, sowohl in Lymphknoten-negativen, als auch Lymphknoten-positiven Patientinnen [133]. Zusätzlich geben diese Daten Aufschluss über das Ansprechen auf die Antikörpertherapie mit dem entsprechenden HER-2/neu Antikörper (Trastuzumab, Herceptin).

Die Tests auf ER-, PgR- und HER-2/neu Status, sind von der *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen und werden von der *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) und dem *College of American Pathologists* (CAP) empfohlen. Zwei weitere Tests mit FDA Zulassung sind der CellSearch Test (Veridex, USA) und MammaPrint (Agendia, NL). Der CellSearch Test basiert auf der prognostischen Detektion von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Brustkrebspatientinnen [134-136]. Bei dem MammaPrint Test handelt es sich um

einen RNA Chip-basierten Test, der eine Prognose aufgrund des Expressionsmusters von 70 Genen erlaubt [137, 138].

ER- und PgR-negative Tumoren werden meist mit Biomarkern assoziiert, die eine schlechte Prognose indizieren, wie zum Beispiel die Amplifikation der Onkogene HER-2/neu, c-myc und int-2 mit Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und Überexpression von Invasions- und Metastasen-assoziierten Wachstumsfaktoren, sowie deren Rezeptoren und einigen Proteasen [126, 128].

### 1.5.4. DNA-Methylierungsmarker für Brustkrebs

Im Aspirat der Brust von Brustkrebspatientinnen sind D2, RAR $\beta$ , Twist, GSTP1, p16, p14, RASSF1A und DAPK als potentielle diagnostische DNA-Methylierungsmarker identifiziert worden [58, 59]. RASSF1A gehört zu den am häufigsten untersuchten Genen, sowohl bei Brustkrebs als auch bei anderen Tumorerkrankungen. Die meisten Studien zeigen übereinstimmend, dass dieses Gen in einem hohen Anteil der Tumoren methyliert ist und somit einen guten diagnostischen Marker darstellt [139]. RASSF1A ist zu 81 - 85 % der Brusttumore methyliert [140]. Die Verwendung der DNA-Methylierung für die Prognose einer Tumorerkrankung wurde in mehreren Studien beschrieben. Der Plasminogenaktivator vom Typ Urokinase (uPA) ist einer der bekannten prognostischen DNA-Methylierungsmarker [141]. Die Korrelation der DNA-Methylierung mit der Expression von uPA wurde in klinischen Brustkrebsproben gefunden [142, 143]. Die DNA-Methylierung des Promotors von uPA korrelierte dabei invers mit dem *Grade* und wurde vor allem in ER positiven Tumoren nachgewiesen. Eine Studie von Chen *et al.* [144] zeigte, dass 23 % von 93 Brustkrebstumoren eine Methylierung des uPA Locus enthielten und vorwiegend die ER positiven Tumoren methyliert waren. Andere Studien identifizierten weitere prognostische DNA-Methylierungsmarker-kandidaten. Chow *et al.* [145] fanden bei 110 Tumoren, dass die Methylierung von COX-2 mit prognostischen Faktoren wie Tumogröße 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 [146].

Die DNA-Methylierung der Promotorregion von PITX2 (*paired-like homeodomain transcription factor 2*) besitzt neben der prognostischen Eigenschaft als Marker auch eine prädiktive Aussagekraft über das Ansprechen von ER positiven, Lymphknoten-negativen Patientinnen auf eine Behandlung mit dem Antiöstrogen Tamoxifen [147].

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 innerhalb des Gens PITX2 führen zu

dem Axenfeld-Rieger Syndrom, welches zum Beispiel durch Fehlentwicklungen der Augen und Zähne, des Herzens und der Hypophyse gekennzeichnet ist [148, 149]. Für das PITX2 Gen sind drei verschiedene Transkripte bekannt, die zu den Proteinen PITX2A, B und C führen [150, 151]. Das Gen besitzt zwei alternative Promotoren P1 und P2 [152, 153]. Der Promotor P2 reguliert die Transkription zweier mRNA Varianten, die zu den Proteinen A und B führen. PITX2A und B unterscheiden sich durch alternatives Spleißen in der Aminosäuresequenz in Exon 3 [150]. Der Promotor P1 reguliert die dritte Transkriptvariante PITX2C [153]. Der P2 Promotor steht unter der Kontrolle des Wnt-Signalweges [152]. Mitglieder der TGF $\beta$  Familie scheinen den P1 Promotor zu regulieren [153, 154]. Toyota *et al.* [155] fanden erstmals anormale DNA-Methylierung des PITX2 Gens bei Patienten mit akuter myeloider Leukämie. Dabei korrelierte die DNA-Methylierung von PITX2 mit der DNA-Methylierung des Östrogenrezeptors, welche bereits als prognostischer Biomarker für Leukämie bekannt war [156]. Das PITX2 Gen beinhaltet Östrogen-empfindliche Bereiche (*estrogen response elements*). Leu *et al.* [157] vermuten eine direkte Rolle des Östrogenrezeptors in der Regulation der PITX2 DNA-Methylierung. Sie zeigten, dass die Repremierung des Östrogenrezeptors durch RNA-Interferenz zu DNA-Methylierung von PITX2 führt. Dieses auf invitro Experimenten basierende Ergebnis erklärt allerdings nicht die Tatsache, dass Östrogenrezeptor-positive Brusttumore ebenfalls eindeutige Hypermethylierung von PITX2 aufweisen

Weitere Gene, deren Eignung als prädiktive Marker bereits für die Ebene der mRNA oder des Proteins beschrieben waren, wurden in Studien auf deren DNA-Methylierung untersucht. Dabei wurden unter anderem mehrere Gene des Östrogensignalweges identifiziert, die durch DNA-Methylierung reguliert werden. Chang *et al.* [158] untersuchten 34 Proben von Tamoxifen-resistenten Tumoren und 68 Kontrollproben, um den Zusammenhang der Resistenz mit der Methylierung der Hormonrezeptoren zu untersuchen. Östrogenrezeptor $\beta$  (ER $\beta$ ) war signifikant unterschiedlich methyliert zwischen diesen beiden Gruppen. TFF1 ist ein Östrogen-reguliertes Gen, für das Promotor Methylierung beschrieben ist. Es enthält in seiner Promotorregion eine Bindestelle für den Östrogenrezeptor [159], und seine Expression wird deswegen als Indikator für eine funktionierende Östrogensignalkaskade in Tumoren angesehen. In Hormonrezeptor-positiven Tumoren ist fehlende TFF1 Expression mit einer erhöhten Unabhängigkeit von Hormonen und einer erhöhten Proliferation der Tumoren verbunden [160]. Expression von TFF1 scheint sowohl ein prognostischer als auch ein prädiktiver Marker bei Brustkrebs zu sein. Foekens *et al.* [161, 162] beschrieben eine signifikant höhere Expression bei Brustkrebspatientinnen mit guter Prognose und Schwartz *et al.* [163] 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 [164, 165].

### 1.5.5. Therapieformen des Mammakarzinoms

In den häufigsten Fällen ist bei malignen Tumoren der erste Schritt der Therapie eine operative Entfernung. Dabei ist es von großer Wichtigkeit, möglichst das gesamte Tumormaterial zu entfernen. Desweiteren werden die anliegenden Lymphknoten entfernt und auf Tumorzellen untersucht. Sind in den Lymphknoten Krebszellen zu finden (Lymphknoten-positive Tumoren), muss davon ausgegangen werden, dass der Tumor bereits metastasiert ist. Nach der operativen Entfernung des Tumors erhält die betreffende Patientin im Allgemeinen eine Strahlentherapie und/oder eine medikamentöse Behandlung. Bei der medikamentösen Behandlung unterscheidet man grob zwischen drei verschiedenen Klassen. Bei der postoperativen medikamentösen Behandlung einer Brustkrebserkrankung, bei der keine detektierbaren Metastasen vorliegen, spricht man von einer adjuvanten Therapie. Ist der Tumor zu groß für eine operative Entfernung wird eine medikamentöse Behandlung bereits vor der Operation durchgeführt, die sogenannte neoadjuvante Behandlung. Ziel der neoadjuvanten Therapie ist es, den Tumor auf eine operable Größe zu „schrumpfen“. Bei bereits vorhandener Metastasierung des Tumors ist in der Regel keine kurative Therapie mehr möglich. In diesem Fall wird eine palliative Therapie angewendet, welche das Ziel verfolgt der Patientin eine Lebenszeitverlängerung bei möglichst hoher Lebensqualität zu ermöglichen. Des Weiteren werden die medikamentösen Therapien nach dem Wirkmechanismus des jeweiligen Medikaments unterteilt. Bei der Chemotherapie kommen Zellgifte (Zytostatika) zum Einsatz. Zytostatika hemmen das Zellwachstum bzw. die Zellteilung, und können daher das Wachstum des Tumors vermindern. Mittlerweile sind eine große Anzahl verschiedener Chemotherapeutika verfügbar, die sich teilweise in ihrer Wirkungsweise grundsätzlich unterscheiden. Bei der Behandlung von Brustkrebs werden meist Polychemotherapien durchgeführt, bei denen Zytostatika aus verschiedenen Wirkungsgruppen in Intervallen verabreicht werden. Die Intervallbehandlung setzt sich aus Behandlungsphasen und Behandlungspausen zusammen. Ziel der Behandlungspausen ist die Regeneration der Patientin. Die Intervallgabe ist nötig da nur Zellen, die sich in der Teilungsphase befinden, durch Zytostatika abgetötet werden können. Zellen, die sich in anderen Stadien des Zellzyklus befinden, werden nicht angegriffen. Grund für die Anwendung verschiedener Zytostatika ist die dadurch erhöhte Wirksamkeit bzw. die verringerte Wahrscheinlichkeit für eine Resistenz des Tumors gegen jeden der verschiedenen Wirkungsmechanismen. Eine andere Art der Therapie von Brustkrebs ist die Anti-Hormon-Therapie. Häufig besitzen Brustkrebszellen, wie normale Zellen, Östrogen- und Progesteronrezeptoren. Diese Hormone spielen bei der Regulation des Wachstums einer Zelle eine wichtige Rolle. Durch Entzug der Hormone lässt sich das Wachstum eventuell nicht entfernter oder gewanderter Tumorzellen, welche Metastasen bilden könnten, stark verlangsamen oder sogar stoppen. Es sind verschiedene Wege möglich, um die wachstumsfördernde Wirkung der Hormone auszuschalten. Das Anti-Östrogen Tamoxifen

wird dabei sehr häufig eingesetzt. Das Ausschalten der Östrogen-Bildung ist eine weitere Möglichkeit. Dies wird bei Frauen vor der Menopause durch die Gabe von GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon)-Analoga erreicht, wodurch die Eierstöcke die Östrogenproduktion einstellen. Bei Frauen nach der Menopause wird Östrogen durch die Umwandlung von Androgen in anderen Geweben gebildet. Für diese Umwandlung ist das Enzym Aromatase wichtig. Aus diesem Grund werden bei Frauen nach der Menopause Aromatasehemmer eingesetzt. Bei der Antihormontherapie handelt es sich um eine relativ milde Therapieform, die im Vergleich zu einer Chemotherapie wesentlich geringere Nebenwirkungen aufweist. Diese Art der Therapie besitzt eine sehr hohe Wirksamkeit und ist in vielen Fällen als adjuvante Therapie ausreichend. Sie wird des Weiteren auch als Teil der palliativen Therapien eingesetzt.

### **1.6. Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung**

#### **1.6.1. Ebenen bei der Analyse von DNA-Methylierung**

Betrachtet man eine einzelne CpG-Position, dann handelt sich bei der DNA-Methylierung um einen binären Zustand. Ein bestimmtes Cytosin im CpG Kontext kann entweder methyliert oder unmethyliert sein. Die DNA ist in Bezug auf die DNA-Methylierung eine heterogene Probe. Einerseits können bei einer doppelsträngigen DNA die Cytosine des einen Stranges 5-Methylcytosin beinhalten, die des komplementären Stranges jedoch unmethyliert sein. In diesem Fall spricht man von einer hemimethylierten DNA. Andererseits besteht eine zu untersuchende Probe meist aus verschiedenen Zelltypen, somit beinhaltet sie eine Mischung aus unterschiedlichen DNA Molekülen. Die Analyse der DNA-Methylierung ist auf verschiedenen Ebenen möglich. Abbildung4 gibt einen schematischen Überblick über einige mögliche Ebenen, auf der DNA-Methylierung gemessen werden kann. Die Messung des Gesamtanteils an methylierter DNA gibt darüber Aufschluss, wie viel an methyliertem Cytosin sich in einer untersuchten Probe befindet. Ergebnisse in Bezug auf die DNA-Methylierung auf dieser Ebene geben unter anderem Aufschluss über die globale Hypermethylierung in Krebs- und Stammzellen, und ermöglichen einen generellen Vergleich des Gesamtanteils an methylierter DNA zwischen verschiedenen Spezies. Diese Art der Analyse gibt jedoch keine direkte Information über die DNA-Methylierung an bestimmten Loci. Für die Untersuchung der DNA-Methylierung in Bezug auf die biologische Funktion in einer Zelle oder deren mögliche diagnostische Relevanz, ist eine Analyse des Grades der DNA-Methylierung an bestimmten Loci von Interesse. Auf dieser Ebene weist der Methylierungsgrad auf die Häufigkeit von 5-Methylcytosin an individuellen CpG Positionen im Genom hin. Dies ermöglicht zum Beispiel die Quantifizierung von Unterschieden der DNA-Methylierung in regulatorischen Sequenzen. Die Analyse eines Methylierungsmusters gibt

detailliert Aufschluss über die Methylierung von mehreren CpGs innerhalb eines DNA Stranges von mehreren hundert Basenpaaren. Sowohl der Grad an DNA-Methylierung als auch das Methylierungsmuster können als sogenanntes DNA-Methylierungsprofil generiert werden, wobei der Grad an Methylierung entweder an einzelnen CpGs, oder an CpGs innerhalb bestimmter Sequenzbereiche bestimmt werden kann. Dies ist zum Beispiel bei der Analyse von mehreren spezifischen Markern für die Klassifizierung von Tumorsubklassen von Vorteil. Im Rahmen dieser Arbeit basieren die DNA-Methylierungsanalysen auf dem Methylierungsgrad von verschiedenen Kandidatengen. Hierfür wurde die Methode der direkten Bisulfit-Sequenzierung verwendet. Diese Methode erlaubt parallel die Bestimmung des Gehalts an 5-Methylcytosin von mehreren CpGs innerhalb einer Sequenz, die durch ein bestimmtes PCR Fragment abgedeckt wird. Dabei wird innerhalb dieser Sequenz jedes Cytosin im CpG Kontext unabhängig voneinander analysiert.

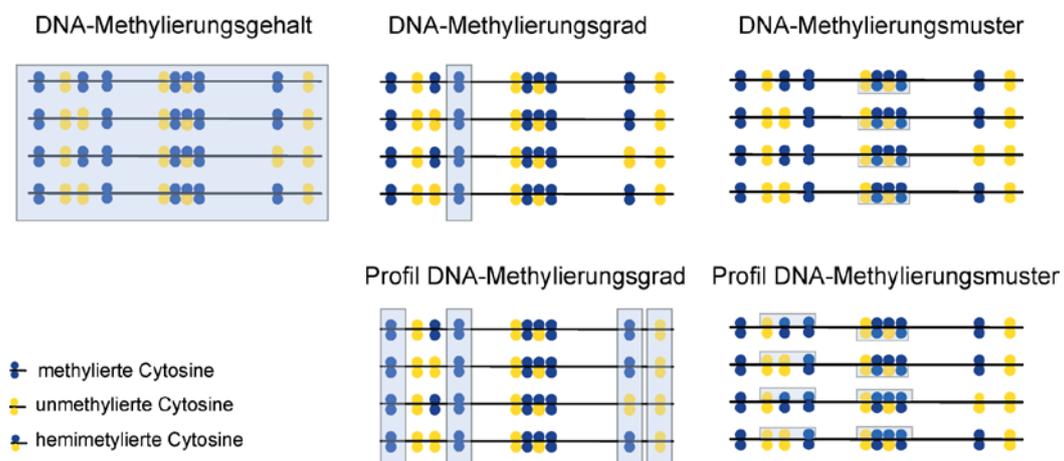


Abbildung4: Möglichkeiten der DNA-Methylierungsanalyse. Horizontale Linien repräsentieren die doppelsträngige DNA. Blaue Punkte stellen methylierte Cytosine und gelbe Punkte unmethylierte Cytosine dar. Die grauen Boxen markieren die CpGs, die in der jeweiligen DNA-Methylierungsanalyse repräsentiert sind. DNA-Methylierungsgehalt repräsentiert den Gesamtanteil an methylierter DNA in der untersuchten Region; DNA-Methylierungsgrad ist der Durchschnitt der DNA-Methylierung eines bestimmten CpGs; DNA-Methylierungsmuster besteht aus dem Durchschnitt der DNA-Methylierung von mehreren aufeinanderfolgenden CpGs.

## 1.6.2. Globale Analyse der DNA-Methylierung

Der globale Anteil an DNA-Methylierung kann durch chromatografische Methoden, wie Dünnschichtchromatografie [166], Hochleistungs-Flüssigchromatografie (HPLC) [167], Kapillarelektrophorese [168] oder durch immunologische Methoden, wie zum Beispiel durch Verwendung von 5-Methylcytosin spezifischen Antikörpern [169], analysiert werden.

## 1.6.3. Sequenzspezifische Analyse der DNA-Methylierung

Die heutigen Methoden zur sequenzspezifischen Analyse der DNA-Methylierung lassen sich grob in zwei Klassen unterteilen. Einige Methoden basieren auf der Verwendung von Restriktionsenzymen und genomischer DNA. Die meisten bekannten methylierungssensitiven Restriktionsenzyme hydrolisieren deren Erkennungssequenz ausschließlich bei unmethylierter DNA. Erkennungssequenzen, die methyliertes Cytosin beinhalten, werden von diesen Enzymen nicht hydrolisiert. Die Identifizierung von differenziell methylierten Regionen, basierend auf der Generierung von spezifischen Fragmenten durch Restriktionsenzyme, lässt sich in einem genomweiten Maßstab anwenden. Die entstehenden Fragmente lassen sich entweder durch eine zufällige Amplifikation der Fragmente (*methylation specific arbitrarily primed PCR*, MS-APCR) oder durch Ligation von DNA *Linker* und anschließender Amplifikation vervielfältigen. Die vergleichende Analyse zwischen verschiedenen Proben in Bezug auf die DNA-Methylierung ist unter anderem durch Methoden wie 2D-Gelelektrophorese (*restriction landmark genomic screening*, RLGS) oder Hybridisierung auf einem *Microarray* (*differential methylation hybridization*, DMH) möglich [170-174].

Eine andere Gruppe von Methoden verwendet Bisulfit-konvertierte DNA in Verbindung mit der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) zur Analyse von sequenzspezifischer DNA-Methylierung in einer Probe [175].

Diese chemische Behandlung der DNA mit Bisulfitsalzen wandelt nicht methyliertes Cytosin in Uracil um, wohingegen methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Im ersten Schritt wird Cytosin durch Natriumbisulfit an der C5-Position oxidativ deaminiert. Dabei wird eine Sulfon-Gruppe an die C6-Position angelagert. Im nächsten Schritt erfolgt eine alkalische Desulfonierung zu Uracil (Abbildung 5). Die Methylgruppe an der C5-Position schützt das 5-Methylcytosin vor der Deaminierung und unterliegt daher keiner chemischen Umwandlung. Eine Umwandlung des Cytosin erfolgt nur in Einzelstrang-DNA, demzufolge muss der DNA-Doppelstrang vor der Bisulfitkonvertierung vollständig denaturiert werden. Durch die selektive Umwandlung der nicht methylierten Cytosine in Uracil wird die Methylierungsinformation in eine Sequenzinformation transformiert. Gleichzeitig entstehen zwei nicht komplementäre DNA-Stränge, der Bisulfit1- und der Bisulfit2-Strang. Beide tragen

die Information der DNA-Methylierung in Form eines Sequenzunterschiedes: Cytosine bleiben unverändert, wenn Methylierung am Cytosin vorlag. Nicht methylierte Cytosin liegen als Uracil vor. Beide Bisulfit-Stränge sind nach der Umwandlung arm an Cytosin, man spricht vom C-armen Strang. In der anschließenden PCR verhält sich Uracil wie Thymin. Der entstehende komplementäre Strang ist folglich G-arm.

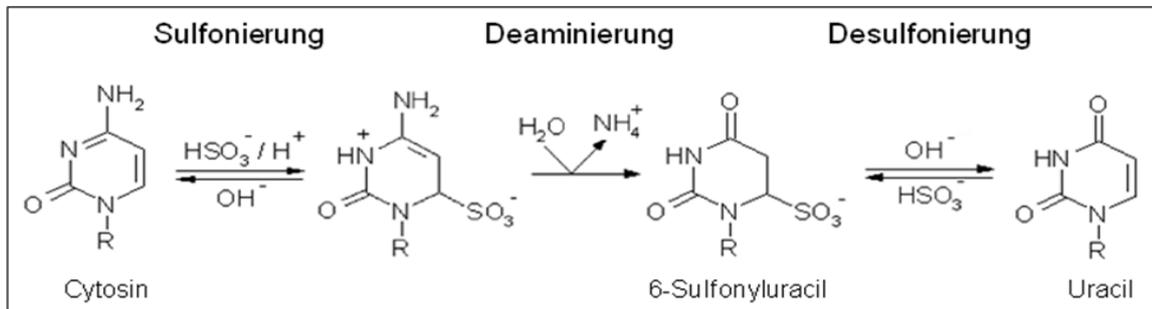


Abbildung 5: Chemische Umwandlung von Cytosin in 6-Sulfonyluracil durch die Behandlung mit Natriumbisulfit und anschließende alkalische Desulfonierung.

Aufgrund der Konvertierung genomischer DNA in Bisulfit-DNA lassen sich der Grad der DNA-Methylierung sowie das Methylierungsmuster mit Hilfe verschiedener Methoden bestimmen. Unter anderem werden auch Restriktionsenzym-basierte Experimente verwendet, um spezifische Sequenzen der Bisulfit-konvertierten DNA zu schneiden und anschließend durch gelbasierte oder kapillarelektrophoretische Fragmentanalyse zu untersuchen (*combined bisulfite restriction analysis*, COBRA). Mittlerweile stehen verschiedene Echtzeit-Polymerasekettenreaktionsmethoden (*real-time PCR*) für die sequenzspezifische quantitative Analyse der DNA-Methylierung zur Verfügung. Eine gute Übersicht über die momentan vorhandenen Methoden zur Analyse von DNA-Methylierung ist in einer Veröffentlichung von Laird et al zu finden [176].

### 1.6.4. Quantitative Bisulfit-Sequenzierung

Die direkte Bisulfit-Sequenzierung ist eine effiziente Methode um simultan im Hochdurchsatz den Grad an DNA-Methylierung von verschiedenen Cytosinen im CpG Kontext zu analysieren. Diese Methode zur Analyse von DNA-Methylierung beinhaltet die sequenzspezifische Amplifikation der Bisulfit-konvertierten DNA und das anschließende Sequenzieren der generierten PCR Produkte, ohne dabei Subklonierungsprozeduren zu verwenden. Für die quantitative Analyse wird in dieser Arbeit die spezielle Software ESME verwendet [177], welche die gemischten DNA-Methylierungsintensitäten, die durch Heterogenität der methylierten DNA in einer Probe entstehen, analysiert (siehe Abbildung 6). Die direkte quantitative Bisulfit-Sequenzierung beinhaltet einige wichtige, aufeinander folgende Schritte. Der Grad an DNA-Methylierung an einer bestimmten CpG Position in einer individuellen genomischen Probe wird in ein kumulatives Signal umgewandelt, wobei die methylierten Cytosine als Cytosine und unmethylierte Cytosine als Thymin detektiert werden (siehe Kapitel 1.6.3). Anschließend werden Bisulfit-spezifische *Primer* für die Amplifikation der gewünschten Regionen verwendet. Bei den *Primern* handelt es sich um methylierungs-unspezifische *Primer*. Das bedeutet, sie enthalten keine CpG Sequenzen. Dadurch soll verhindert werden, dass die untersuchte Sequenz, je nach Methylierungsstatus dieser CpGs, unterschiedlich effizient amplifiziert wird.

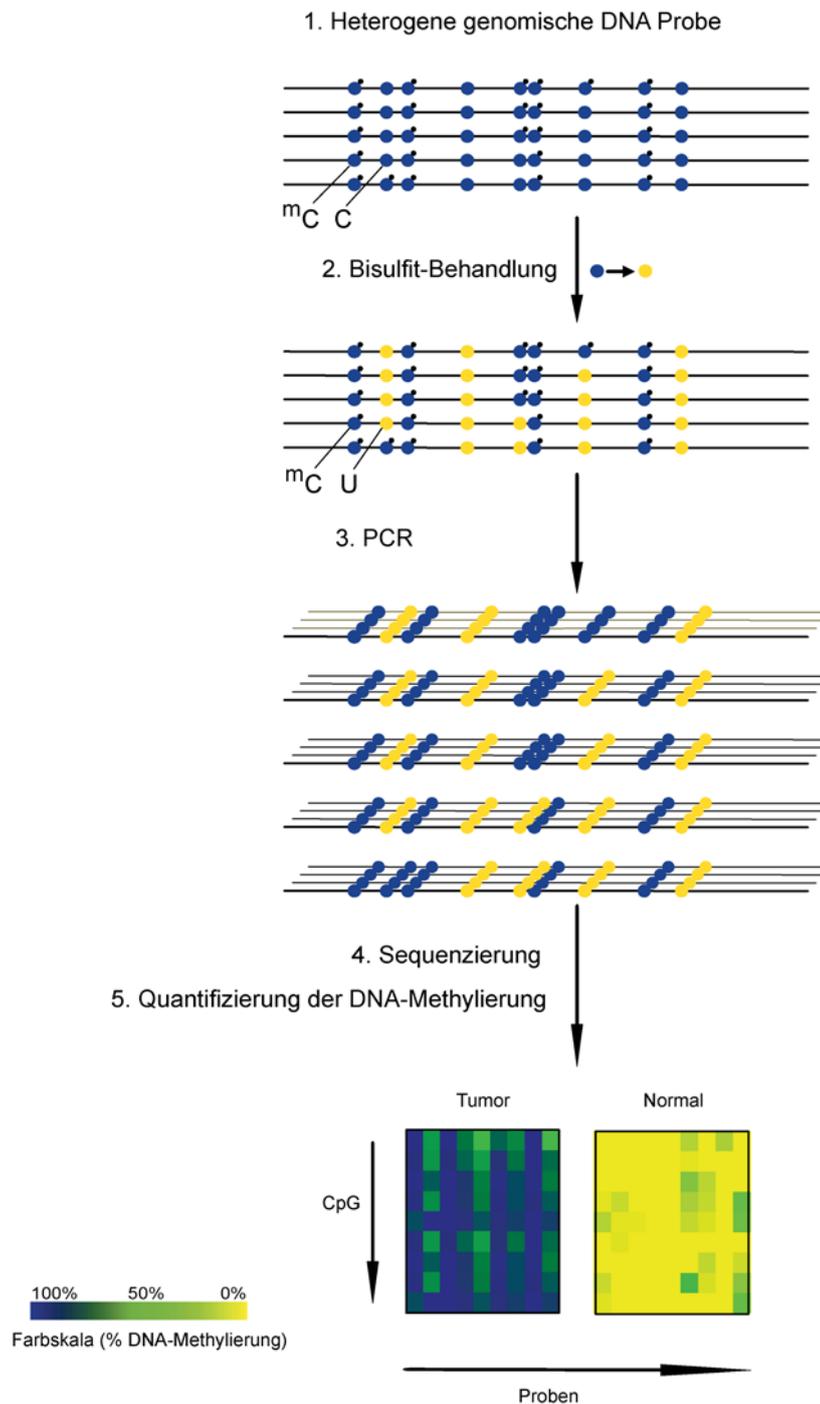


Abbildung 6: Schematische Darstellung für die direkte Bisulfit-Sequenzierung von heterogen methylierten, genomischen Proben. Durch die Behandlung mit Bisulfit (2), werden unmethylierte Cytosine zu Uracil konvertiert, methylierte Cytosine blieben unverändert. Die Software ESME [177] quantifiziert die DNA-Methylierung für die einzelnen CpG's in den Sequenzen (3 und 4). Der Grad an DNA-Methylierung für jedes einzelne CpG im Amplifikat wird durch einen Farbcode angezeigt (5).

Ebenfalls auf der Sequenziermethode nach Sanger *et al.* [178] wurde in dieser Arbeit eine weitere Methode verwendet, die es ermöglicht DNA-Methylierung mit hoher Auflösung zu quantifizieren [179]. Abbildung 7 zeigt das Prinzip dieser Methode für die Sequenzierung, die auf der Einführung eines Normalisierungssignals in das PCR Produkt beruht. Die DNA wird in einer Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert, wobei man einen Rückwärtsprimer verwendet, der an seinem 5' Ende eine Gen-unspezifische Domäne mit Guanosenen enthält. 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. Bei der Analyse wird dabei nur das Sequenzsignal der Cytosine betrachtet. 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 (siehe Abbildung 8).

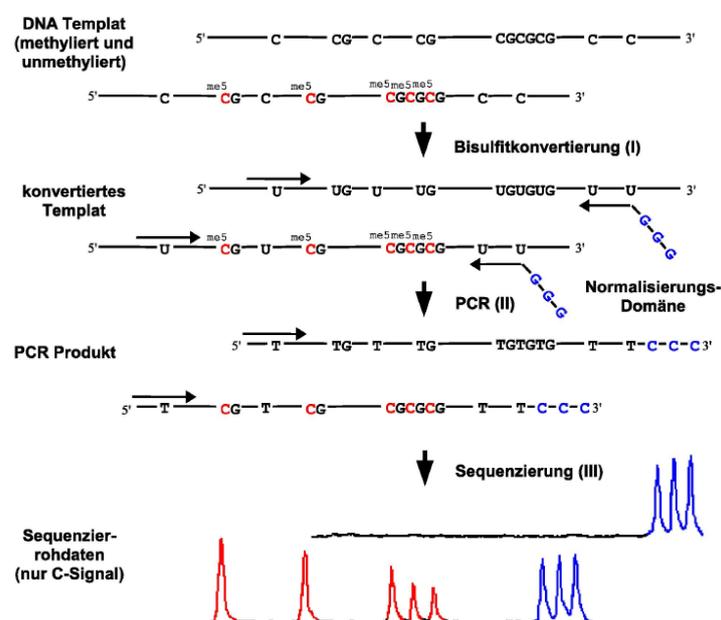


Abbildung 7 : Prinzip der quantitativen Bisulfit-Sequenzierung am Beispiel der G-reiche Sequenzierung über den Vorwärtsprimer. I: Bisulfitkonvertierung: Cytosin desaminiert zu Uracil während Methylcytosin erhalten bleibt. II: PCR mit einem Rückwärtsprimer, der an 5' drei Guanosine enthält (Normalisierungssignal). 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.

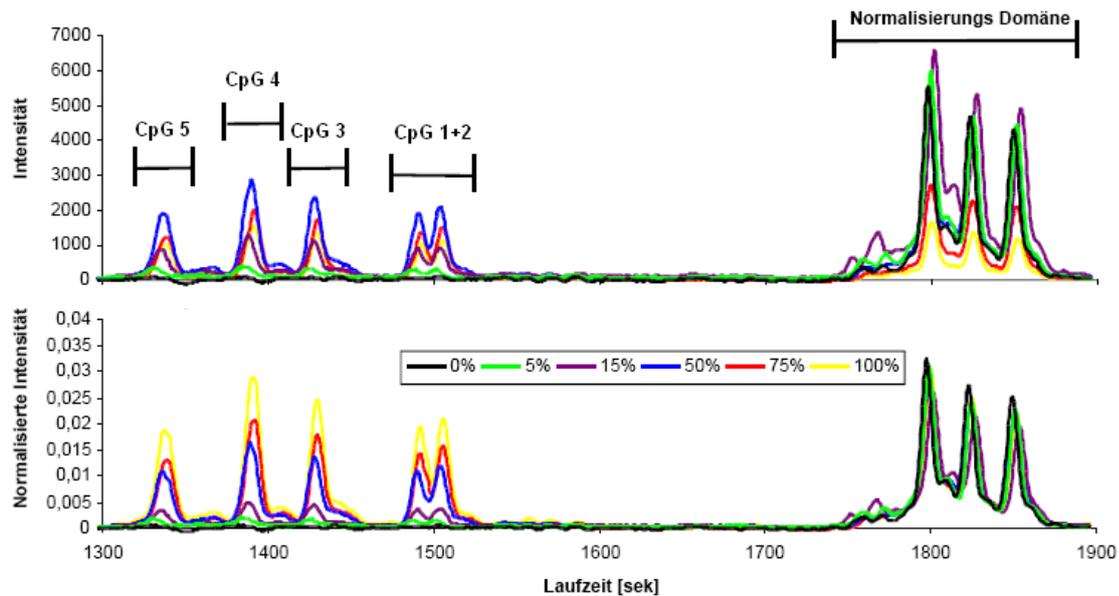


Abbildung 8 : Prinzip der Normalisierung am Beispiel des Amplifikats von CDO1. Darstellung der Sequenzhistogramme (nur C-Signal) von sechs verschiedenen Methylierungsmischungen. Das obere Bild zeigt den Zustand vor der Normalisierung, das untere Bild den Zustand nach der Normalisierung. Das Normalisierungssignal wird in jeder Probe identifiziert und die Intensitäten zu jedem Messpunkt werden durch die Maximale Intensität 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.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Lyse von Gewebeproben und DNA Extraktion**

#### **2.1.1. Tumorproben zur Identifikation prognostischer Brustkrebs Biomaker**

Die in der Studie zur Identifikation potentieller prognostischer Brustkrebs Biomarker untersuchte Kohorte umfasste insgesamt 162 Lymphknoten-positive Brustkrebspatientinnen (Kapitel 3.3). Es wurden nur Proben von Patientinnen verwendet, die den folgenden Kriterien entsprachen: (a) histologisch bestätigter invasiver Brustkrebs, (b) primärer Tumor im Stadium pT1 bis pT3, (c) histologisch bestätigter Lymphknotenbefall ( $pN > 1$ ), (d) Operation des Primärtumors vor 2002 (Vorliegen klinischer Langzeitdaten von mindestens fünf Jahren), (e) Standard adjuvante Anthrazyklin-Behandlung, keine andere systematische Chemotherapie (ausser Hormontherapie) und keine Behandlung mit Taxanen, sowie (f) Verfügbarkeit der klinischen Langzeitdaten.

#### **2.1.2. Brustumorproben für die DNA-Methylierungsanalyse von mikrodisezierten Zellen**

Für die Mikrodissektion wurden Brustumorproben von 23 Patientinnen ausgewählt. Es wurden nur Proben von Patientinnen verwendet, die den folgenden Kriterien entsprachen: (a) histologisch bestätigter invasiver Brustkrebs, (b) primärer Tumor im Stadium pT1 bis pT3, (c) kein histologisch bestätigter Lymphknotenbefall ( $pN = 0$ ), (d) keine histologisch bestätigten Metastasen ( $pM = 0$ ), (e) keine adjuvante Behandlung, keine neoadjuvante Therapie.

#### **2.1.3. Darmtumorproben für die DNA-Methylierungsanalyse von mikrodisezierten Zellen**

Für die Mikrodissektion wurden Darmtumorproben von insgesamt drei Patienten ausgewählt. Die Tumorstadien des Primärtumors der drei Patienten reichen dabei von pT1 für Patient P1, pT2 für Patient P2, bis pT3 für Patient P3.

### **2.1.4. Lyse und DNA Extraktion von gefrorenem Frischgewebe**

Die genomische DNA wurde aus gefrorenem Frischgewebe oder gefrorenen Zellpellets aus Frischgewebe mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, D) entsprechend des vom Hersteller empfohlenen Protokolls extrahiert (Protokoll zur DNA Extraktion aus Gewebe).

### **2.1.5. Herstellung von histologischen Dünnschnitten**

Für die Mikrodissektion von Zellen wurden zunächst Dünnschnitte aus gefrorenem Frischgewebe angefertigt. Diese wurden anschließend histologisch gefärbt (siehe 2.1.6) und die entsprechenden Gewebebereiche mikrodisseziert (siehe 2.1.7).

Zur Herstellung von 10 µm Gewebedünnschnitten der Proben wurde ein Rotationsmikrotom 2035 Biocut (Leica Microsystems, D) verwendet. Die Schnitte für die Mikrodissektion wurden auf Glasobjektträger überführt, nach dem Aufbringen der Dünnschnitte wurden diese über Nacht bei 50 °C in einem Inkubator INB 200 (Mettler, D) getrocknet.

### **2.1.6. Histologische Färbung**

Alle Dünnschnitte wurden histochemisch gefärbt. Die leichte Färbung der Schnitte für die Mikrodissektion wurde durchgeführt, indem die Schnitte 75 Sekunden in die Hämalaunlösung (Sauer nach Mayer, Hollborn und Söhne, D) getaucht wurden. Anschließend wurden diese Schnitte fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und in einer aufsteigenden, wässrigen Ethanolreihe (0 %, 70 % und 80 %) dehydriert und abschließend getrocknet.

### **2.1.7. Mikrodissektion**

Die Mikrodissektion wurde mit dem Mikrodissektionssystem P.A.L.M (P.A.L.M. Microlaser Technologies, 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 Sekunden bei 5000 g).

### 2.1.8. Lyse von mikrodissezierten Proben

Die mikrodissezierten Proben wurden im direkten Anschluss zunächst 8 Stunden bei 60 °C in einem Mastercycler (Eppendorf, D) inkubiert. Danach wurden erneut 2 µl einer wässrigen Proteinase K (Carl Roth, D) Lösung (300 g/l) dazu gegeben und die Proben vorsichtig gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden anschliessend kurz zentrifugiert und weitere vier Stunden bei 60 °C im Mastercycler (Eppendorf, D) inkubiert. Die so lysierten Proben wurden dann, ohne Aufreinigung, in die Bisulfitkonvertierung eingesetzt.

### 2.2. Herstellung von DNA Standards

Für die genaue Quantifizierung von Gesamt-DNA Ausbeuten, sowie die Bestimmung von Methylierungsraten wurden Referenz DNAs hergestellt, die im Folgenden als Standard DNAs bezeichnet werden.

Die Standards wurden durch Mischungen von unmethylierter und methylierter DNA hergestellt. Unmethylierte DNA wurde nach dem Prinzip der multiplen Verdrängungsamplifikation (MDA; *multiple displacement amplification*) 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 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 unmethylierte und methylierte DNA wurde Bisulfitkonvertiert, UV spektrophotometrisch quantifiziert (Kapitel 2.4), und entsprechend der gewünschten prozentualen Methylierung gemischt. Für die Standard DNAs in den Kapiteln 3.1 und 3.2 wurde CpGenome™ Universal Methylated DNA (Millipore, USA) verwendet. Dabei handelt es sich um enzymatisch methylierte, humane (männliche) genomische DNA aus peripherem humanem Blut (PBL, Promega, USA). Als entsprechend unmethyliertes Äquivalent zu dieser methylierten DNA wurden PBL DNA, oder genomische Sperma DNA verwendet. Beide DNAs wurden vor der Bisulfitkonvertierung entsprechend der gewünschten prozentualen Methylierung gemischt.

### 2.3. Bisulfitkonvertierung

Insgesamt wurden zur Bisulfitkonvertierung zwei verschiedene Protokolle eingesetzt, die sich in den verwendeten Volumina und in der Art der Aufreinigung der DNA aus dem Reaktionsgemisch unterscheiden. Ein Protokoll wurde für konventionelle Proben wie DNA aus gefrorenen Geweben und Standard DNAs (Kapitel 2.3.1) verwendet, das andere Protokoll für Proben mit stark limitierter DNA Menge, wie es bei mikrodisektiertem Material der Fall ist (Kapitel 2.3.2).

Für die Bisulfitkonvertierung von DNA wurden folgenden Komponenten verwendet:

DNA Probe (gelöst in Wasser), Bisulfitlösung (enthält 0,4708 g/ml Natriumdisulfit [Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>], Merck, D, und 0,1128 g/ml Natriumsulfit [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>], Fluka Chemie, CH, in Wasser), ein organisches Lösungsmittel (Diethylenglykoldimethylether [DME], Merck, D). In dem organischen Lösungsmittel wurde zusätzlich ein Radikalfänger gelöst (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylsäure [Trolox®], Sigma Aldrich, USA, 125,3 g/l). Die Reaktion 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.

#### 2.3.1. Bisulfitkonvertierung der Standard DNA und DNA aus gefrorenem Geweben

Die Bisulfitkonvertierung 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. Das Reaktionsgemisch wurde gut gemischt und, wie unter Kapitel 2.3 beschrieben, inkubiert.

Die DNA wurde nach der Bisulfitkonvertierung durch Ultrafiltration aufgereinigt. Hierfür wurden Ultrafiltrationssäulen mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa (Microcon® YM-30, Millipore, USA) verwendet. Die Säulen wurden in die dazugehörigen Auffanggefäße überführt und mit 240 µl Wasser befüllt. Das komplette Reaktionsgemisch (160 µl) wurde ebenfalls auf diese Säule gegeben und mit der Pipette gemischt, bis keine Schlieren mehr erkennbar waren. Anschliessend wurde der Filter mit dem verdünnten Reaktionsgemisch 15 Minuten bei 15000 g zentrifugiert, anschließend wurden die Ultrafiltrationssäulen in ein neues Auffanggefäß überführt. Danach wurden 400 µl einer 0,2 M Natronlauge auf den Filter gegeben, dieser erneut 15 Minuten bei 15000 g zentrifugiert und im Anschluss in ein neues Auffanggefäß pipettiert. Die DNA auf dem Filter wurde nun insgesamt dreimal gewaschen, indem je 400 µl Wasser auf die Säule gegeben wurde und die Säulen nochmals 15 Minuten bei 15000 g zentrifugiert wurden. Nach jedem Waschschrift wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß gegeben und das alte verworfen. Für die Elution der DNA von der Filteroberfläche 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. Der Elutionsschritt 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.

### 2.3.2. Bisulfitkonvertierung von geringen DNA Mengen

Für die Bisulfitkonvertierung von lysierten Mikrodissektionsproben und kleinste Mengen von Standard DNAs wurden ebenfalls die unter Kapitel 2.3 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 mikrodissektierten Proben direkt in den 500 µl Auffanggefäßen. Alle Proben mit geringen DNA Konzentrationen waren in Lysepuffer gelöst, der poly-dA als Carrier-DNA enthielt (siehe 2.1.8 für die Zusammensetzung des Lysepuffers). Das Reaktionsgemisch wurde bei dem unter Kapitel 2.3 beschriebenen Temperaturprofil inkubiert.. 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) platziert und mit 166 µl AVL Puffer (Qiagen, D) befüllt. Der AVL Puffer wurde vorher entsprechend der Herstellerangaben mit poly-A angesetzt. Die 64 µl Reaktionsgemisch wurden zu dem AVL Puffer gegeben und die verwendete Pipettenspitze aufgehoben. Das leere Reaktionsgefäß wurde mit AVL Puffer (90 µl) gefüllt, welcher dann mit der ursprünglich verwendeten Pipettenspitze ebenfalls auf die Säule gegeben wurde. Das Gemisch aus Probe und AVL Puffer auf der Säule wurde 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 wurden 250 µl Ethanol hinzugegeben, der Deckel geschlossen und die Säule kräftig geschüttelt. Zur Bindung der DNA an die Silikaoberfläche wurde die Säule dann zwei Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Der Durchfluss im Sammelgefäß wurde verworfen, die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben und mit 500 µl Desulfonierungspuffer (0,2 M NaOH, 90% Ethanol) befüllt. Der Desulfonierungspuffer wurde für zwei Minuten bei 16000 g abzentrifugiert, die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt. Die gebundene und desulfonierte DNA wurde anschliessend 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 zwei Minuten 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 (zwei Minuten 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

vorgewärmtem Wasser (50°C) beladen. Das Wasser wurde dabei vorsichtig direkt auf die Silikamembran pipettiert. Nach einer Minute Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Elution durch eine Minute Zentrifugation bei 6000 g. Die Säule wurde in dem Reaktionsgefäß belassen und die Elution mit weiteren 12,5 µl vorgewärmtem Wasser wiederholt. Bedingt durch das Totvolumen der Säule und Verdunstung resultiert dies in 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, anschließend wurde dieses Wasser ebenfalls in das entsprechende 200 µl PCR Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurde die bereits benutzte Pipettenspitze verwendet.

### 2.4. DNA Quantifizierung

Um die Konzentration der DNA zu messen, wurden sowohl *Real-Time PCR* basierte Verfahren (siehe 2.4.2), als auch ein spektroskopisches Verfahren (siehe 2.4.1) angewendet.

#### 2.4.1. 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.

#### 2.4.2. Real-Time PCR Quantifizierung

Zur Quantifizierung von Bisulfit-konvertierter und genomischer DNA mittels Real-Time PCR wurden zwei verschiedene Assays verwendet. Für die Quantifizierung von Bisulfit-konvertierter DNA konventioneller Proben, wie DNA aus gefrorenen Geweben und Standard DNAs wurde der LightMix® Kit Reference G (Epigenomics AG, D) verwendet. Der von Dietrich *et al.* [179] beschriebene MER9 LTR Assay wurde für die Real-Time PCR Quantifizierung von Bisulfit-konvertierter DNA aus mikrodisektierten Proben verwendet. Dieser Assay ist besonders zur Quantifizierung von geringen Mengen an DNA geeignet.

## 2.5. PCR Amplifikation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PCRs im Wesentlichen für zwei unterschiedliche Anwendungen verwendet. In den Mikrodisektionsstudien (Kapitel 3.1 und 3.2) wurden multiplexierte Voramplifikationen (mPCR) von geringen DNA Mengen, wie zum Beispiel mikrodisektiertem Material und Amplifikationen von einzelnen DNA Fragmenten (sPCR) zur Sequenzierung oder Gelelektrophorese eingesetzt. Als Templat dienten sowohl ca. 10 ng Bisulfit-konvertierte DNA (Kapitel 3.3), als auch 0,5 µl des Produktes der mPCR Voramplifikation (Kapitel 3.1 und 3.2). Je nach nachgelagerter Anwendung wurden verschiedene PCR Protokolle verwendet, die PCR Zusammensetzungen sind in *Tabelle 3* aufgelistet. Die mPCR Voramplifikation wurde in 200 µl PCR Reaktionsgefäßen (Eppendorf, D), alle anderen PCRs in 96 well PCR Platten (ABgene) durchgeführt.

*Tabelle 3 : Zusammensetzungen der PCRs. MgCl<sub>2</sub>, Taq Polymerase und 10-fach PCR Puffer wurden von Qiagen bezogen, dNTPs sind von Fermentas*

Chemikalien	Anwendung	
	mPCR (Voramplifikation)	sPCR
HotStar Taq Polymerase	0,4 µl (2U)	0,2 µl (1U)
dNTP-Mix	0,4 µl (je 25mM)	0,2 µl (je 25mM)
10-fach PCR Puffer	5 µl	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> – Lösung (25mM)	-	-
Primer	2,5 µl (je 1µM)	5 µl (je 2,5 µM)
H <sub>2</sub> O	50 µl Endvolumen	25 µl Endvolumen
Templat DNA	40 µl	10 µl

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind nach der jeweiligen Anwendung getrennt im Anhang aufgelistet. Alle PCRs wurden in DNA Engine Tetrad® Thermocyclern (Biorad, USA) durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Temperaturprofile verwendet:

### mPCR Voramplifikation :

Nach 15 Minuten Denaturierung bei 95 °C folgten 50 Zyklen mit  
20 s bei 95 °C / 45 s bei 58 °C / 30 s bei 72 °C

### sPCR :

Nach 15 Minuten Denaturierung bei 95 °C folgten 45 Zyklen mit  
20 s bei 95 °C / 45 s bei 58 °C / 30 s bei 72 °C

### 2.6. 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 1x 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.

### 2.7. Sequenzierung

PCR Produkte wurden mit der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* sequenziert [178]. Für den Verdau der nicht inkorporierten dNTPs und Primer wurden 3,5 µl der PCR Produkte in eine 96 well PCR Platte (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, anschließend wurden davon 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 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Enzym 15 Minuten 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 MgCl<sub>2</sub> und 10 % [v/v] Sulfolan (Merck, D)), 5 µl dNTP Mix (je 0,02 mM an dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und 5 µl Sequenzierpimer [2 µM]. Die Inkubation dieses Reaktionsgemisches erfolgte in der gleichen Microtiterplatte, 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 well 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 wurden je 300 µl Wasser gegeben und die Matrix über Nacht inkubiert um aufzuquellen. Vor dem Auftragen des Reaktionsproduktes 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-Syntheseprodukt vorsichtig auf die Sephadex Matrix mittig 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.

### 2.8. Datenanalyse der Bisulfit-Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten der Bisulfit-Sequenzierung auf zwei unterschiedliche Arten ausgewertet. Die in Kapitel 3.3 verwendete Vorgehensweise bei der Auswertung der Sequenzierdaten mittels des Normalisierungssignals ist bereits in Abbildung 7 und Abbildung 8 schematisch dargestellt und wird im Folgenden detailliert beschrieben. Die vom Sequenziergerät erzeugten Daten wurden zunächst in ein geeignetes Format überführt. Hierfür bietet zum Beispiel das Programm BioEdit 6.0.7 die Möglichkeit, das Sequenzhistogramm als Textdatei zu exportieren. Die Textdatei beinhaltet die numerischen Werte der Fluoreszenzintensitäten der vier Farbstoffe aller vier Basen zu jedem Messpunkt. Die Daten wurden mit einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft) als Funktion der Fluoreszenzintensität von der (Lauf-)Zeit in der Kapillargelelektrophorese dargestellt. Für die Auswertung ist lediglich die Information desjenigen Fluoreszenzfarbstoffes notwendig, der die Methylierungsinformation trägt. Im Falle der G-reichen Sequenzierung ist dies das C-Signal, im Falle der C-reichen Sequenzierung das G-Signal. In einem Diagramm wurden jeweils die Signale aller Proben dargestellt. Bei der Kapillarelektrophorese von Proben kann es zu leichten Unterschieden im Laufverhalten kommen. Aus diesem Grund wurden, wie in

Abbildung 8 dargestellt, die Signale entlang der x-Achse (Laufzeitachse) so verschoben, dass die Normalisierungssignale übereinander liegen. Für die Normalisierung wurde der Bereich der x-Achse identifiziert, der das gesamte Normalisierungssignal umfasst (Abbildung 8). 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 der Normalisierung ist die quantitative Methylierungsinformation sowohl in der Höhe der Peaks an den entsprechenden Methylierungspositionen, als auch in der Fläche dieser Peaks enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur die *Peakhöhen* für die weitere Auswertung verwendet. In Abbildung 8 auf Seite 28 ist zu erkennen, dass jede einzelne CpG-Stelle separat analysiert werden kann. Wenn nicht anders beschrieben, dann wurde im Rahmen dieser Arbeit der Mittelwert der maximalen Sequenzintensitäten aller Peaks innerhalb eines PCR-Produktes verwendet.

Bei der Auswertung der Daten in Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2 wurde die Analyse der aus dem ABI-*basecaller* resultierenden *tracefiles* mit Hilfe einer zu diesem Zweck von Epigenomics entwickelten Software (ESME) [177] durchgeführt. Diese Software normalisiert zunächst die durch die ABI Auswertung erhaltenen Daten und bringt die Bisulfitsequenz mit der Referenzsequenz, die für das Design verwendet wurde, zur Deckung. Danach werden die durchschnittlichen DNA-Methylierungswerte durch Auswertung von C und T Signalen an CpG Positionen berechnet. Die berechneten Werte werden in einer Gelb-Blau Farbskala dargestellt. Datensätze von mehreren Proben werden in einer Matrix von DNA-Methylierungswerten dargestellt, in der in den Reihen die einzelnen CpGs und in den Spalten die einzelnen Proben angeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Primer für die Reamplifikation der einzelnen Amplifikate zu DNA-Methylierungsanalyse von mikrodisektierten Proben mit einer Normalisierungsdomäne ausgestattet. Dadurch war die Quantifizierung der DNA-Methylierung mit den verschiedenen beschriebenen Auswertungsmethoden möglich. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Quantifizierung der DNA-Methylierung für die einzelnen Amplifikate und Proben, welche innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden (Daten nicht gezeigt). ESME ermöglicht eine sehr übersichtliche Darstellung der DNA-Methylierung für die einzelnen CpG's in einem Amplifikat der untersuchten Proben. Ergebnisse wie Heterogenitäten der DNA-Methylierung innerhalb einer untersuchten Region sind somit einfach und anschaulich zu illustrieren. Aus diesen Gründen wurden in den Kapiteln 3.1 und Kapitel 3.2 die Ergebnisse basierend auf der Quantifizierung mit ESME gezeigt.

### 2.9. 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 mit dem Programm WinSTAT für Microsoft Excel. 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. Die Signifikanz (p-Wert) der mit diesem Modell berechneten Wahrscheinlichkeiten wurde mit dem Likelihood Ratio Test bestimmt. Für eine qualitative Bewertung der Methylierungsmarker unabhängig von einem optimierten Methylierungsschwellenwert zur Klassifizierung, wurden anhand der Rückfalldaten von 72 Monaten nach der Operation ROC (*Receiver Operating Characteristic*) Analysen durchgeführt und die entsprechenden AUC (*Area Under the Curve*) berechnet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. DNA-Methylierungsanalyse in mikrodisektierten Proben aus Brusttumoren

Die DNA-Methylierung spielt in der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle [82]. Demnach können systematische Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen verschiedenen Zelltypen auftreten. Ein Tumor ist hinsichtlich seiner zellulären Zusammensetzung heterogen. Wie im normalen Gewebe kommen dort Zelltypen wie Stroma-, Fett-, Muskel- und Epithelzellen vor. Zusätzlich treten im Tumor entartete Epithelzellen (Tumorzellen) und gegebenenfalls Tumor-infiltrierende Lymphozyten auf. Analysiert man die DNA-Methylierung in einem Teil des Tumors, und verwendet dabei Biopsien oder Dünnschnitte, so entspricht das Ergebnis dem gewichteten Durchschnitt der DNA-Methylierung aller in der Probe enthaltenen unterschiedlichen Zelltypen. Für die Analyse der Methylierung in den einzelnen Zelltypen bietet sich die Mikrodissektion an, die es ermöglicht bestimmte Zellen aus einem heterogenen Gewebe zu isolieren und zu analysieren. Ein Ziel der Mikrodisektionsstudie war es, den Einfluß der Heterogenität von Tumoren auf das Ergebnis eines theoretisch möglichen medizinischen Tests abschätzen zu können. Des Weiteren sollten die Ergebnisse zur Aufklärung der Biologie von Brustkrebs beitragen, um einen perspektivischen Beitrag zur Verbesserung der Prognostik von Brustkrebserkrankungen leisten zu können.

Um die Heterogenität der DNA-Methylierung für die Biomarker PITX2, SFRP1, APC, BMP4, TFF1, RASSF1A, NR5A1, PLAU und C20orf55 innerhalb zweier verschiedener Zelltypen genauer zu charakterisieren, wurde die DNA-Methylierung in Stroma- und Epithelzellen aus Tumoren von Brustkrebspatientinnen untersucht. Dabei wurde eine Methode verwendet, die es ermöglicht, die DNA-Methylierung einer Mehrzahl von Genen in Proben mit geringer DNA Menge parallel zu analysieren (Kapitel 3.1.1).

Der DNA-Methylierungsmarker PITX2 hat prognostische Eigenschaften für Brustkrebs (siehe Einleitung dieser Arbeit, Kapitel 1.5.4). In einigen wenigen Gewebeproben mit sehr heterogenem Tumormaterial schlägt die Prognose mit der DNA-Methylierung von PITX2 jedoch fehl. Es soll untersucht werden, inwieweit sich die Ergebnisse von DNA-Methylierungsanalysen in solch heterogenen Proben von denen in homogenen Proben mit nur einem Zelltypen (Epithel- oder Stromazellen des Tumors) unterscheiden, und ob die Prognose potentiell durch die gezielte Auswahl einer Subpopulation von Zellen verbessert werden könnte. Zusätzlich soll in den untersuchten Proben auch die DNA-Methylierung weiterer DNA-Methylierungsbiomarker (s.o.) mit potentiell prognostischem Wert bestimmt werden.

Für die Analyse von mikrodisssektierten Tumorproben von Brustkrebspatientinnen wurde eine Auswahl basierend auf der gemessenen DNA-Methylierung von PITX2 in heterogenen Tumorproben getroffen (Kapitel 3.1.2), deren korrespondierende Aliquots anschließend mikrodisssektiert wurden. Für die Methylierungsmessung wurde eine direkte Bisulfit-Sequenzier-Methode verwendet, welche die gleichzeitige Quantifizierung der DNA-Methylierung von einer Mehrzahl von Genen in Proben mit sehr geringen DNA-Mengen ermöglicht (Kapitel 3.1.4).

### **3.1.1. Methodenetablierung der DNA-Methylierungsanalyse von Epithel- und Stromazellen aus Brusttumoren**

Die DNA-Methylierung von insgesamt 11 Loci wurde in mikrodisssektierten Proben von den in Kapitel 3.1.2 beschriebenen 23 verschiedenen Brustkrebspatientinnen mittels quantitativer Bisulfit-Sequenzierung parallel untersucht (Epithel- und Stromazellen).

Da in mikrodisssektiertem Material häufig nicht genügend DNA vorhanden ist, um 11 solch eine Anzahl von Loci separat voneinander zu analysieren, wurde die DNA zunächst in einer PCR voramplifiziert, in der die *Primerpaare* für die Amplifikate aller 11 Loci enthalten waren (*multiplex-PCR*; mPCR). Anschließend wurde jedes einzelne der 11 Amplifikate in einer separaten PCR reamplifiziert (*singleplex-PCR*, sPCR), wobei das Produkt aus der Voramplifikation als Templat diente. Das Verfahren der multiplexierten Voramplifikation wurde dabei besonders in Hinblick auf die Spezifität optimiert. Durch eine für mPCRs verhältnismäßig niedrige MgCl<sub>2</sub>- 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 Ziel ist ein Produkt der Voramplifikation, welches geeignet ist in den anschließenden sPCRs nur die Amplifikate der gewünschten Loci zu reamplifizieren, ohne dass potentielle Nebenprodukte auftreten. Zunächst wurden die 11 Amplifikate auf Ihre Eignung für eine quantitative Sequenzierungsanalyse überprüft. Dazu wurden Standard-DNA Gemische (0, 25, 50, 75 und 100 % methyliert) entsprechend der beschriebenen Vorgehensweise prozessiert (Kapitel 2.2). Zur Herstellung der Standard DNAs wurde extrahierte DNA aus humanem, peripherem Blut (PBL) und künstlich methylierte PBL DNA verwendet. PBL DNA ist jedoch nicht an jedem der untersuchten Loci vollständig unmethyliert. Aus diesem Grund ist unmethylierte Standard-DNA nicht für jeden untersuchten Locus herstellbar. Jeweils 1 ng der DNA-Gemische wurde Bisulfit-konvertiert, aufgereinigt, vor- und reamplifiziert und sequenziert. Jede der Standardmischungen wurde in drei unabhängigen Ansätzen parallel prozessiert. Die Standard DNAs wurden neben den Wasserkontrollen (NTC = *non template control*) jeweils als Kontrolle bei allen Experimenten mit prozessiert. Abbildung 10 stellt schematisch den Ablauf der Experimente von der Lyse der Zellen bis zur direkten Bisulfit-Sequenzierung dar.

### 3.1.2. Patientinnenvorauswahl

Im Rahmen dieser Studie wurden die Tumore von 23 verschiedenen Brustkrebspatientinnen untersucht. Dabei handelte es sich um Patientinnen mit ER- und PR-positivem, invasivem Brustkrebs, der weder neoadjuvant noch adjuvant behandelt wurde. Um den Einfluss der Heterogenität von Gewebe auf die PITX2 DNA-Methylierung und damit die abgeleitete Prognose zu untersuchen, wurden geeignete Tumorproben anhand ihrer Prognose in Gruppen eingeordnet.

Hierzu dienten vorhandene DNA-Methylierungswerte von PITX2, die mit quantitativer Methylierungsbestimmung (QM Assay) [180] gemessen wurden. Eine Hypermethylierung des Biomarkers PITX2 entspricht einer schlechten Prognose, Patientinnen mit Hypomethylierung wird eine gute Prognose zugeordnet. Insgesamt wurden 23 Patientenproben aufgrund der mittels PITX2 Methylierung erstellten Prognose (gut oder schlecht) und der tatsächlichen Anamnese (mit oder ohne Rückfall) ausgewählt und in vier Gruppen eingeteilt. Dabei wurden mit Absicht Proben überrepräsentiert, in denen PITX2 zu einer falschen Prognose führt.

Es wurden 10 Patientinnen ausgewählt, die einen Rückfall der Brustkrebserkrankung in Form von Metastasen erlitten hatten, von denen jedoch 5 in der QM Messung für PITX2 eine prozentuale DNA-Methylierung von unter 10% zeigten und daher falsch charakterisiert wurden (Abbildung 9 Gruppe C). Die anderen fünf Proben von Patientinnen mit Rückfall zeigten bei der QM Messung für PITX2 eine deutliche DNA-Hypermethylierung und wurden korrekt charakterisiert (Abbildung 9 Gruppe D). Des Weiteren wurden 13 Proben von Patientinnen ausgewählt die laut Patienteninformation keinen Rückfall erlitten hatten, von denen jedoch 8 in der QM Messung eine deutliche Hypermethylierung für PITX2 zeigten und damit fehlerhafterweise einer schlechten Prognosegruppe zugeordnet wurden (Abbildung 9 B). Von allen 23 ausgewählten Patientinnenproben wurden im Durchschnitt jeweils circa 1000 Epithel- und Stromazellen des Gewebes mikrodisektiert. Die interessanten Tumoreale wurden unter dem Mikroskop aus einem nur leicht mit Hämatoxylin gefärbten, gut geeigneten Dünnschnitt identifiziert und ausgeschnitten.

Die experimentellen Schritte der Mikrodisektion fanden im Rahmen einer Kooperation mit der Erasmus Universität Rotterdam statt. Nach erfolgreicher Dissektion der ausgewählten Areale wurden die Proben entsprechend prozessiert: Die Zellen wurden lysiert, die DNA mit Bisulfit konvertiert, und dann aufgereinigt. Die Bisulfit-konvertierte DNA wurde voramplifiziert, das PCR Produkt reamplifiziert und letztendlich sequenziert und ausgewertet (Abbildung 10).

Tabelle 4: Anzahl von Gewebeproben, die absichtlich mit zahlreichen Fehlprognosen ausgewählt wurden und die anhand der mit PITX2 auf Mischgewebe erstellten Prognose und des tatsächlichen Krankheitsverlaufes in Gruppen A, B, C und D eingeordnet sind. Die vier Gruppen werden durch wahr negative (TN), falsch positive (FP), falsch negative (FN) und wahr positive (TP) definiert, wobei negativ im Sinne von kein Rückfall prognostiziert, d.h. gute Prognose, und positiv im Sinne von Rückfall prognostiziert, also schlechter Prognose, benutzt wird.

PITX2 Prognose	kein Rückfall	Rückfall	Summe
Gut	A: 5 (TN)	C: 5 (FN)	10
Schlecht	B: 8 (FP)	D: 5 (TP)	13
Summe	13	10	23

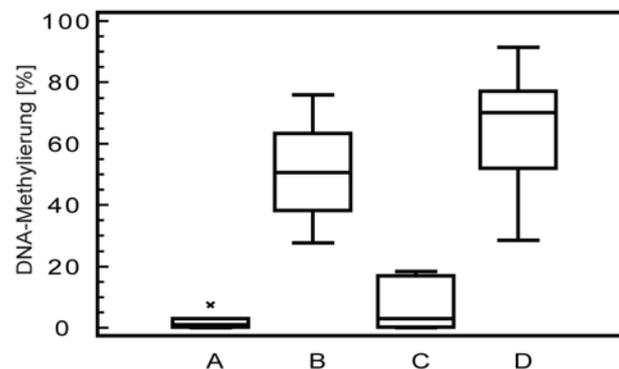


Abbildung 9 DNA-Methylierung der Proben von Brustkrebspatientinnen nach der quantitativen Methylierungsanalyse (QM) von PITX2. Die Proben wurden anhand von PITX2 Methylierung und der Frage ob Patientinnen einen Rückfall der Brustkrebserkrankung erlitten haben in vier Gruppen eingeteilt Gruppe **A**: 5 Patientinnen ohne Rückfall mit niedriger PITX2 DNA-Methylierung und korrekter guter Prognose; Gruppe **B**: 8 Patientinnen ohne Rückfall mit hoher PITX2 DNA-Methylierung und fälschlicherweise daraus abgeleiteter schlechter Prognose; **C**: 5 Patientinnen mit niedriger PITX2 DNA-Methylierung und einer fälschlicherweise daraus abgeleiteten guten Prognose, obwohl sie einen Rückfall erlitten. **D**: 5 Patientinnen, die einen Rückfall erlitten, mit hoher PITX2 DNA-Methylierung sowie einer daraus korrekt abgeleiteten schlechten Prognose.

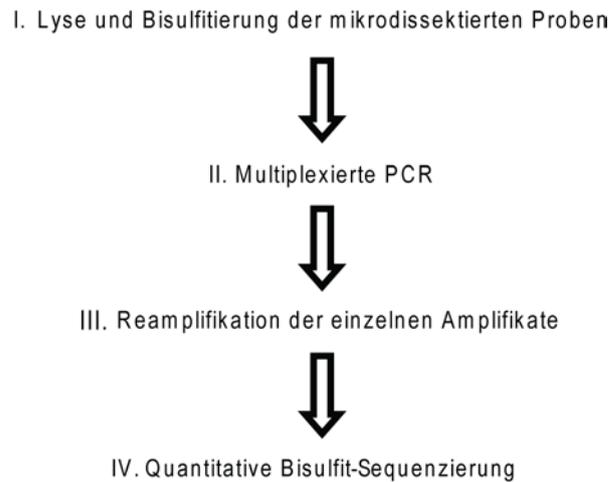


Abbildung 10 : Schematische Übersicht der Arbeitsschritte zur parallelen quantitativen DNA-Methylierungsanalyse mehrerer Regionen in mikrodisektierten Zellen.

### 3.1.3. PITX2 DNA-Methylierung im heterogenen Tumorgewebe und in Epithelzellen

Für die DNA-Methylierungsanalyse in den mikrodisektierten Proben für PITX2 wurden drei unterschiedliche Regionen untersucht. Das Amplifikat für die Bisulfit-Sequenzierung der PITX2 Region 1 beinhaltet neben anderen auch dieselben CpGs wie in der QM Messung, die bei der Auswahl der Tumorproben eine Rolle gespielt hat (Kapitel 3.1.2). Wie im nachfolgenden Kapitel ersichtlich, ist eine differenzielle DNA-Methylierung der untersuchten Gruppen für PITX2 in den Epithelzellen vorhanden.

Abbildung 11 zeigt die mit PITX2 QM gemessenen DNA-Methylierungswerte auf den makroskopischen Tumorproben und korrespondierende, durch Sequenzierung gemessene PITX2 DNA-Methylierungswerte in den mikrodisektierten Epithelzellen des jeweiligen Tumors. Die in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse belegen, dass die unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung der DNA-Methylierung (QM und Bisulfit-Sequenzierung) in vielen der untersuchten Proben vergleichbare Messergebnisse liefern. In den untersuchten Proben ist kein systematischer Unterschied zwischen heterogenem Tumor und isolierten Epithelzellen zu sehen. Zum Beispiel besitzen sowohl die Epithelzellen als auch der heterogene Tumor in der Gruppe der korrekt PITX2 negativen Gruppe A geringe oder keine DNA-Methylierung für PITX2. Lediglich für Patientinnenprobe 5 wurde in den Epithelzellen ein DNA-Methylierungswert von 40% gemessen, so dass sie darauf basierend zu der Gruppe der PITX2 positiven gerechnet werden würde. Wesentliche Unterschiede zwischen DNA-Methylierung der Epithelzellen und des heterogenen Tumors werden in der Gruppe C gemessen. In dieser Gruppe mit fünf Patientinnen, die trotz Rückfalls in den heterogenen

Tumorproben niedrige QM PITX2 DNA-Methylierung zeigten, wurde in korrespondierenden Epithelzellen-Proben eine deutlich höhere DNA-Methylierung für PITX2 gemessen als in den heterogenen Tumorproben. Dieses Ergebnis könnte zu einer Korrektur der auf Gesamtgewebe mit PITX2 falsch prognostizierten Patientinnengruppe genutzt werden und zeigt, dass die Isolierung und Analyse der Epithelzellen zu einer Verbesserung der prognostischen Aussagekraft von PITX2 führen kann.

Die Stromazellen zeigen grundsätzlich in allen Proben eine geringere Methylierung, und die differentielle DNA-Methylierung zwischen den Gruppen ist schwieriger zu identifizieren. Auch zeigen die Messungen der Stromazellen deutlich weniger Übereinstimmungen mit korrespondierenden QM Messungen auf dem Gesamtgewebe (Daten nicht gezeigt). Die dargestellten Ergebnisse zeigen daher die DNA-Methylierungswerte der Epithelzellen.

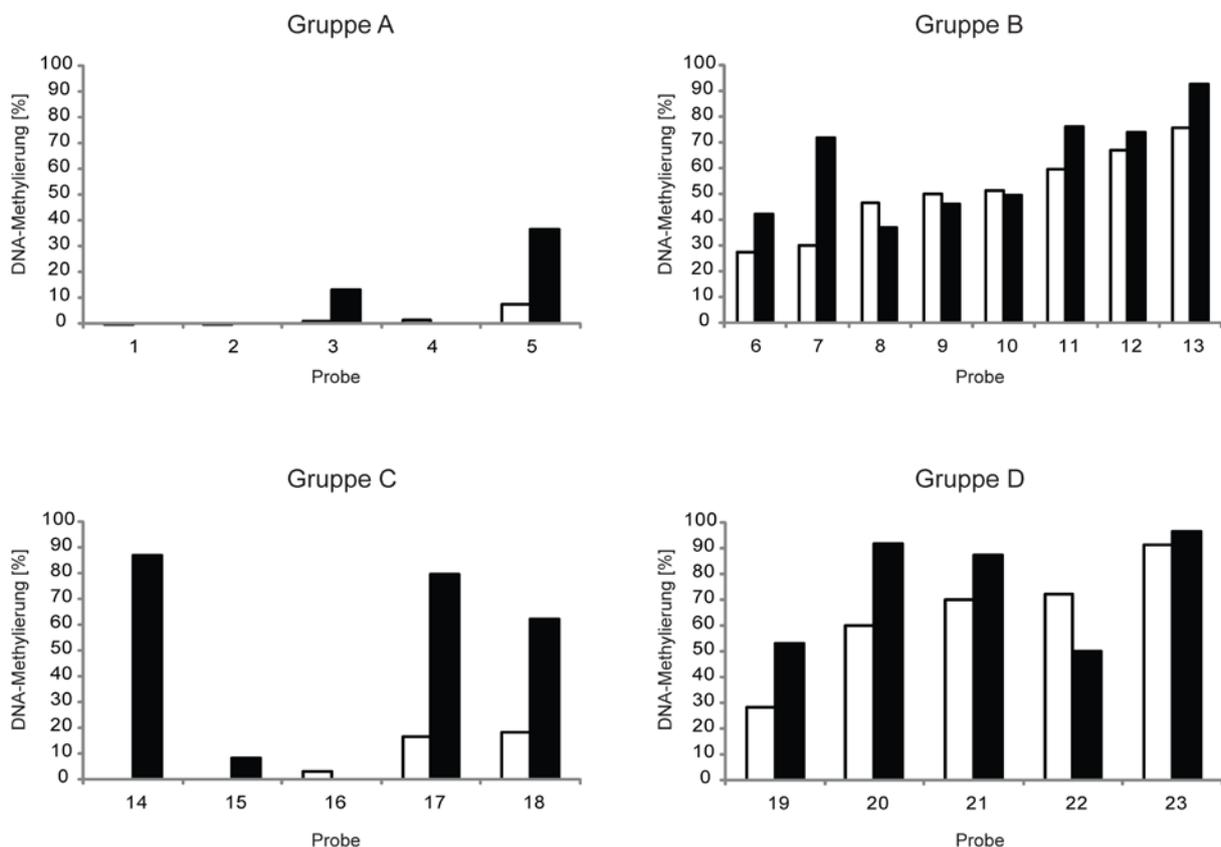


Abbildung 11: Vergleich der DNA-Methylierung für PITX2 Region 1 aus dem heterogenen Tumorgewebe (QM) □ und den mikrodisssektierten Epithelzellen (Quantifizierung durch direkte Bisulfit-Sequenzierung) ■. Gruppe A: 5 Patientinnen mit niedriger PITX2 DNA-Methylierung ohne Rückfall; Gruppe B: 8 Patientinnen mit hoher PITX2 DNA-Methylierung ohne Rückfall; C: 5 Patientinnen mit niedriger PITX2 DNA-Methylierung und mit Rückfall D: 5 Patientinnen mit hoher PITX2 DNA-Methylierung und mit Rückfall.

### 3.1.4. Charakterisierung der DNA-Methylierung elf verschiedener Loci in Epithel- und Stromazellen aus Brustkrebsproben

Quantitative Analysen der DNA-Methylierung, die auf einer PCR-Amplifikation beruhen, sind besonders anfällig für Kontamination der PCR mit DNA, die nicht aus der Probe selbst stammt (Fremd-DNA). In einer PCR wird Fremd-DNA ebenso amplifiziert wie das gewünschte Templat. Eine solche Verunreinigung führt insbesondere bei mikrodisektierten Proben, bei denen die Menge an untersuchter DNA gering ist, zu einem verfälschten Ergebnis. Außerdem ist es notwendig für die Beurteilung der Verlässlichkeit des Methylierungswertes, der in einer mikrodisektierten Probe gemessen wurde, zu wissen, wie viele Templatmoleküle tatsächlich in dieser Probe enthalten waren. Ergebnisse, die nur auf einzelnen Templatmolekülen beruhen, wären aus stochastischen Gründen nicht repräsentativ.

Die insgesamt 46 mikrodisektierten Proben wurden daher mittels *Real-Time* PCR quantifiziert, die die Quantifizierung von Bruchteilen des Genoms ermöglicht [179]. Prozesskontrollen, die einen Hinweis auf eine mögliche Kontamination während der gesamten Prozedur liefern, wurden ebenfalls quantifiziert und zeigten keine Kontamination mit Fremd-DNA (Abbildung 12 B). Abbildung 12 C zeigt die Menge an Bisulfit-konvertierter DNA in Nanogramm basierend auf der Quantifizierung durch die *Real-Time* PCR. In allen untersuchten Proben waren genügend Kopien für eine repräsentative Aussage der DNA-Methylierung vorhanden. In den untersuchten Amplifikaten gab es keinen Hinweis auf einen Einfluss der Ausgangsmenge auf die Qualität der Quantifizierungsergebnisse der DNA-Methylierung durch Bisulfit-Sequenzierung.

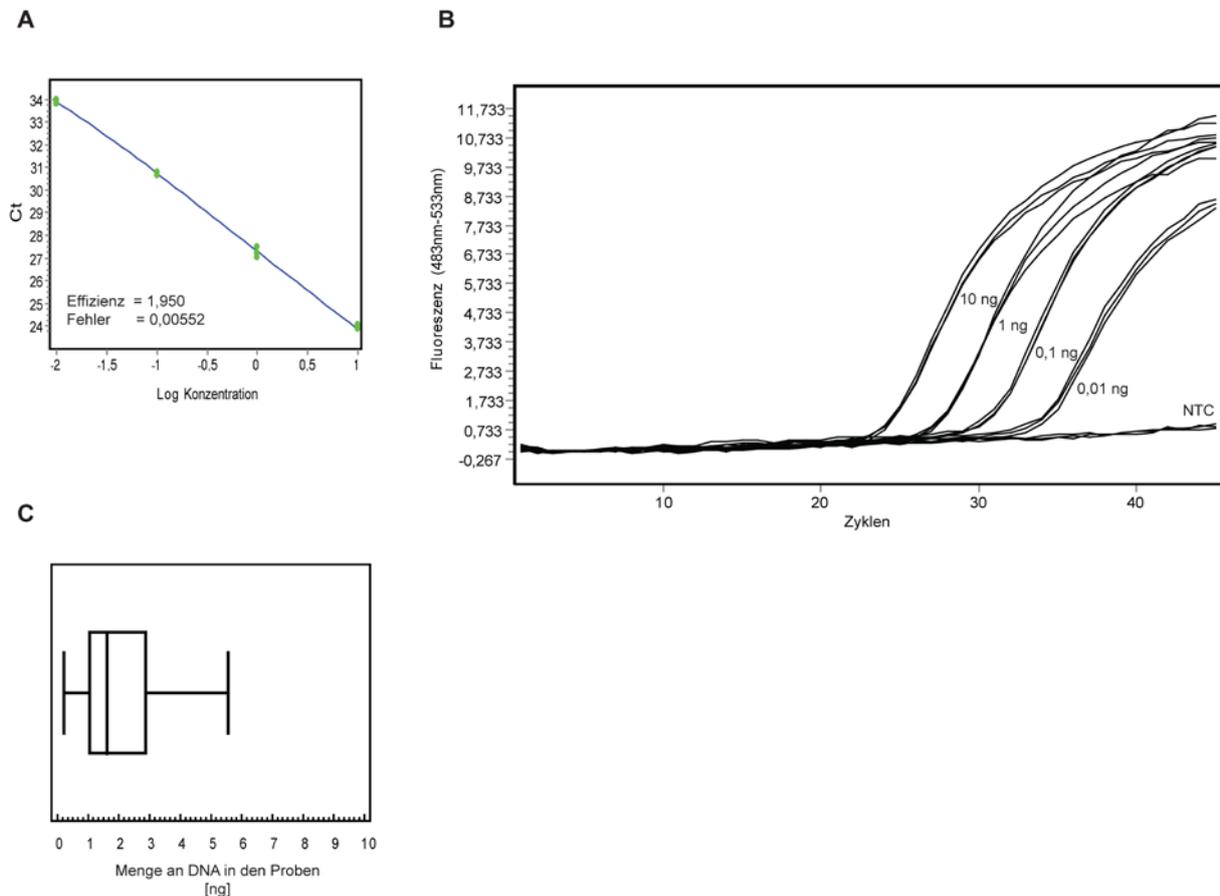


Abbildung 12 : Quantifizierung der Bisulfit-DNA aus mikrodisektierten Proben. A: PCR Effizienz der Real-time PCR zur Quantifizierung der Bisulfit-konvertierten DNA; B: Standard Reihe von 10ng, 1ng, 0,1ng und 0,01ng gemessen in Triplikaten (non template control; NTC); C: Box-Whisker-Plot der quantifizierten Menge in ng an Bisulfit-DNA in 46 mikrodisektierten Proben

Ein weiterer Faktor, der zu falschen Ergebnissen bei der quantitativen DNA-Methylierung führen kann, ist das Phänomen der gerichteten Amplifikation von methylierter oder unmethylierter DNA [181-183]. Eine gerichtete Amplifikation bedeutet, dass zum Beispiel durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen entweder die methylierte oder die unmethylierte DNA in der Amplifikation bevorteilt wird.

Aus diesen Gründen wurden parallel zu den eigentlichen Proben jeweils 1 ng der in Kapitel 2.2 beschriebenen Standardmischungen in unabhängigen Triplikaten prozessiert und als Kontrolle für die jeweiligen Amplifikate in den Experimenten mitgeführt. Ein Amplifikat, das schlecht zwischen den Standards unterscheidet, ist ein Hinweis auf eine gerichtete Amplifikation. Für den Fall, dass ein grosser Teil der in der PCR Etablierung zuverlässig kalibrierbaren Amplifikate in den eigentlichen Experimenten keine Unterscheidung zwischen den Standards mehr zeigt, wäre dies ein Hinweis auf eine mögliche Kontamination mit Fremd-DNA. Die DNA-Methylierung der Gene *PITX2*, *SFRP1*, *APC*, *BMP4*, *TFF1*, *RASSF1A*, *NR5A1*, *PLAU* und *C20Orf55* wurde in den mikrodisektierten Proben parallel analysiert. Über das Gen *PITX2* verteilt befinden sich mehrere CpG-Inseln. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Methylierung in Regionen von drei der CpG-Inseln analysiert

(Abbildung 16). Die Standardkurven der Amplifikate für die drei untersuchten Regionen von PITX2 zeigen, dass eine Unterscheidung zwischen 0, 25, 50 und 100 % für alle Amplifikate möglich ist (Abbildung 13). Auch die untersuchten Amplifikate der anderen Gene zeigen eine gute Quantifizierung der Standard DNAs. Die Ergebnisse in Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen, dass keine Kontamination mit Fremd-DNA oder gerichtete Amplifikation der Amplifikate stattgefunden hat.

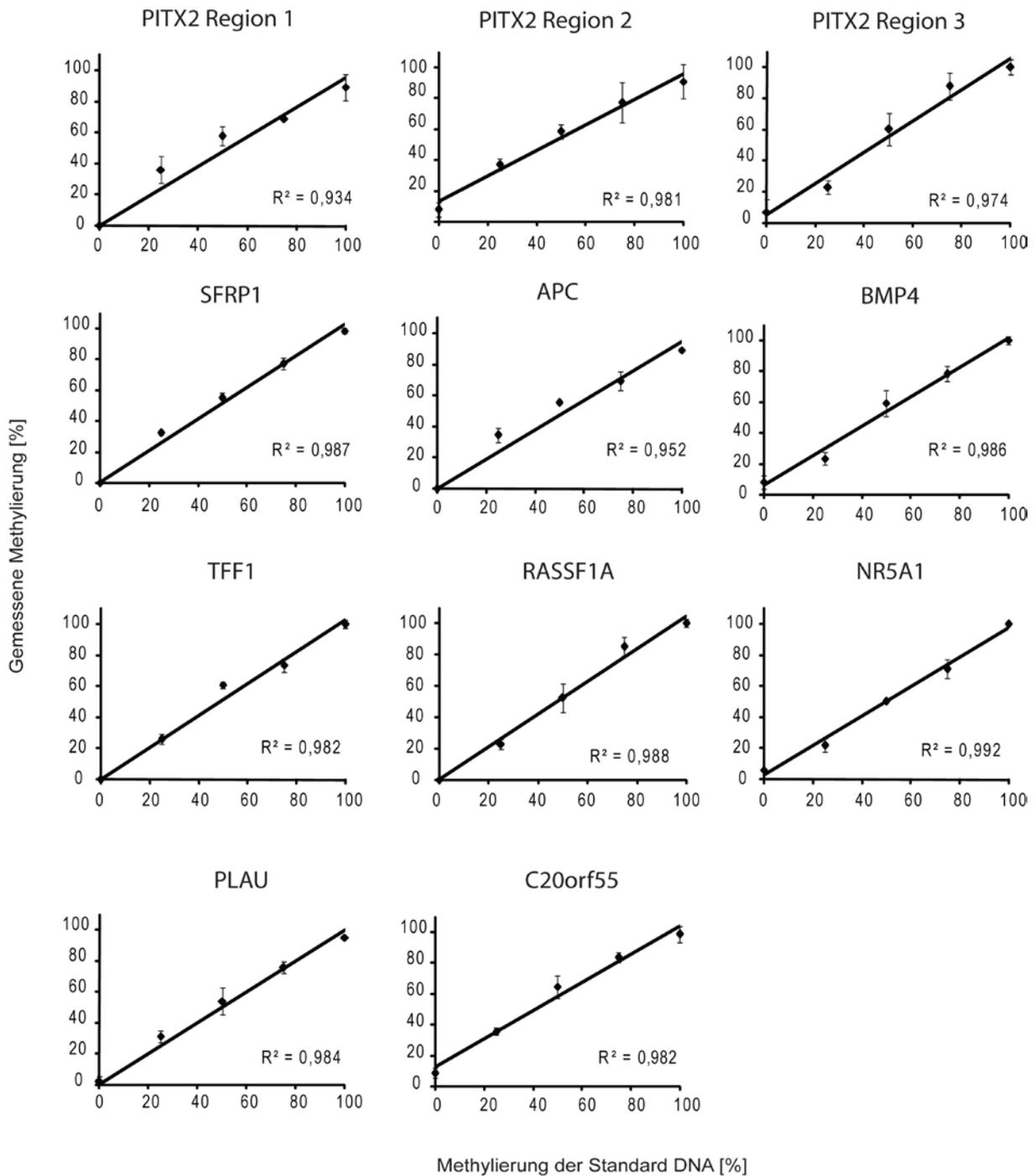


Abbildung 13 : Quantifizierung der 11 untersuchten Regionen bei Verwendung von 1ng Templat. Dargestellt sind die Ergebnisse des Mittelwerts aus drei unabhängigen Ansätzen. Jede der Methylierungsmischungen wurde parallel zu den Tumorproben Bisulfit-konvertiert, voramplifiziert, reamplifiziert und sequenziert.

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, wurden die Proben der Brustkrebspatientinnen anhand der DNA-Methylierung der PITX2 Region1 ausgewählt. Abbildung 14 stellt die prozentuale DNA-Methylierung der einzelnen Cytosine im CpG Kontext für die jeweiligen untersuchten Regionen in einer Farbkodierung dar (blau = 100%, gelb = 0% DNA-Methylierung). Die mikrodisektierten Tumorproben wurden zwischen den Zelltypen in zwei gepaarte Gruppen unterschieden. Des Weiteren wurde berücksichtigt, ob die jeweiligen mikrodisektierten Tumorproben von einer Patientin stammen, die einen Rückfall der Brustkrebserkrankung in Form von Metastasen erlitten hat, oder nicht. Die Darstellung ermöglicht einen direkten Vergleich der Methylierung in den einzelnen gepaarten Proben für die untersuchten Biomarker, die teilweise in Regionen von Genen liegen, die in den gleichen Signaltransduktionswegen involviert sind (Kapitel 1.2.2). Die Ergebnisse in Abbildung 14 zeigen, dass die Mikrodisektionsstudie aus technischer Sicht erfolgreich war. Von den insgesamt 45 mikrodisektierten Proben konnten nur zwei der nicht für alle untersuchten Regionen erfolgreich sequenziert werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist zu erkennen, dass die durchschnittliche DNA-Methylierung für die untersuchten Regionen in den Epithelzellen höher ist als in den Stromazellen. Für die untersuchte Region des TFF1 Gens trifft diese Aussage jedoch nicht zu, in diesem Fall sind die Stromazellen im Durchschnitt höher methyliert als die Epithelzellen. Die Epithelzellen zeigen wesentlich deutlichere Methylierungsunterschiede innerhalb und zwischen den Gruppen mit und ohne Rückfall, als die Stromazellen. Dies belegt, dass die differentielle Methylierung der untersuchten Regionen stärker in den Epithelzellen zu finden ist. Unterhalb der DNA-Methylierung der PITX2 Region 1, deren prognostische Eigenschaften bereits bekannt sind, sind die DNA-Methylierungswerte zweier weiterer Regionen von PITX2 dargestellt. Die Proben 1E, 3E und 5E in der Gruppe ohne Rückfall und die Proben 14E-16E mit Rückfall zeigen deutliche Unterschiede in der Methylierung zwischen den untersuchten Regionen von PITX2. Insgesamt wurde jedoch für die meisten Proben von verschiedenen Patientinnen ähnliche Methylierungswerte für die unterschiedlichen Regionen von PITX2 gemessen.

Es gibt jedoch auch einige Proben, die für bestimmte Gene eine über die Patientinnenpopulation hin sehr homogene DNA-Methylierung zeigen. Zum Beispiel sind SFRP1, APC und BMP4 für die mikrodisektierten Epithelproben 14E, 15E und 16E der Brustkrebspatientinnen in der Gruppe mit Rückfall genauso hypomethyliert wie die PITX2 Region 1. TFF1 weist dagegen in diesen Proben Hypermethylierung im Vergleich zu den anderen Patientinnen auf.

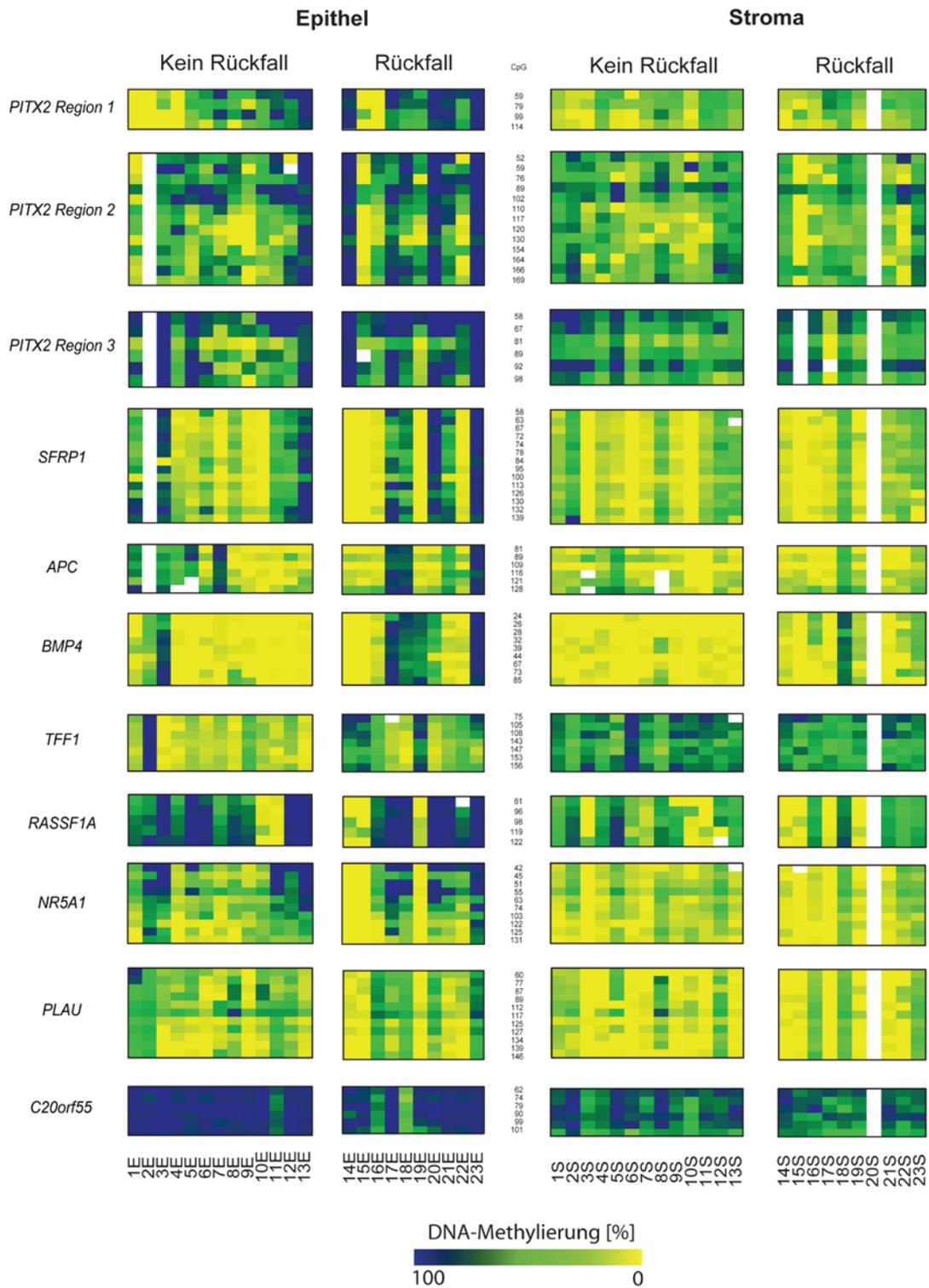


Abbildung 14 : DNA-Methylierung der elf untersuchten Regionen in 23 Proben von Brustkrebspatientinnen. Die Patientinnenproben sind nach Epithel- und Stromazellen sortiert. Jede Spalte stellt eine analysierte Probe dar. Die (farbige) Zeile innerhalb einer Region stellt ein analysiertes CpG dar. Die Proben wurden in Patientinnengruppen mit oder ohne Rückfall eingeteilt.

### 3.1.5. PITX2 Expression in Epithel- und Stromazellen aus Brusttumoren

Für PITX2 sind bisher drei verschiedene Transkriptvarianten PITX2A, B und C eindeutig identifiziert [150, 151]. Die Transkripte A und B unterscheiden sich durch ein alternativ gespleißtes Exon. Dagegen wird die C Variante von PITX2 durch einen alternativen Promotor reguliert [152, 153] (Abbildung 16 D).

Neben der DNA-Methylierung der Epithel- und Stromazellen wurde in dieser Mikrodisektionsstudie auch die Expression der Transkripte PITX2 A und B analysiert. Hierzu wurden auf separaten Dünnschnitten der jeweiligen Tumore circa 1000 Epithel- und Stromazellen für die Expressionsanalyse mikrodisektiert.

Mikrodisektion und Expressionsanalysen wurden im Rahmen einer Kooperation an der Erasmus Universität Rotterdam durchgeführt. Für die quantitative Expressionsanalyse der Transkriptvarianten PITX2A und PITX2B wurden bereits etablierte RT-PCRs verwendet [180]. Abbildung 15 zeigt die gemessene relative Expression der Transkripte PITX2A und B in den Epithel- und Stromazellen der einzelnen Tumorproben. Die Proben 1 und 2 zeigen für beide Transkriptvarianten in den untersuchten Zelltypen deutliche Expression. In diesen Proben sind PITX2A und B in Stromazellen im Vergleich zu den Epithelzellen höher exprimiert. Betrachtet über alle analysierte Proben, zeigen die Stromazellen gegenüber den Epithelzellen eine häufigere und höhere Expression von mindestens einer der beiden PITX2 Transkriptvarianten.

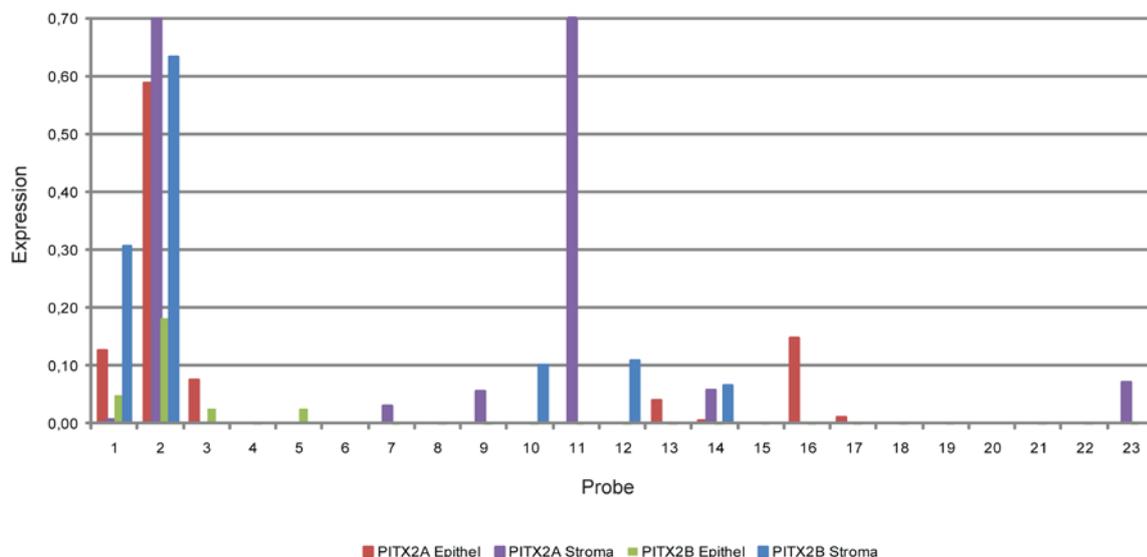


Abbildung 15: Relative Expression der Transkriptvarianten PITX2A und PITX2B in Epithel- und Stromazellen aus Tumoren von 23 Brustkrebspatientinnen

Ein eindeutiges Ergebnis der Mikrodisektionsstudie ist, dass die differentielle DNA-Methylierung für PITX2 Region 1 der Patientinnenproben in den Epithelzellen zu sehen ist (Abbildung 14). Nimmrich *et al.* [180] zeigten bereits im Zelllinienmodell, dass die DNA-Methylierung der PITX2 Region1 invers mit der PITX2 A und B mRNA Expression assoziiert ist. Abbildung 16 zeigt die DNA-Methylierung der drei Regionen von PITX2 im Vergleich zu der Expression der Transkriptvarianten PITX2A und PITX2B in den Epithelzellen. Die untersuchten Proben sind nach aufsteigender DNA-Methylierung der jeweiligen Regionen für PITX2 sortiert. Die DNA-Methylierung der Region1 (Abbildung 16 A) zeigt eine signifikant inverse Korrelation für das PITX2A ( $p= 0,027$ ) und PITX2B Transkript ( $p= 0,036$ ). Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht nur im Zelllinienmodell [180], sondern auch in den Epithelzellen eine mögliche Regulation der Expression der PITX2 Transkripte A und B durch DNA-Methylierung in der PITX2 Region 1 im „klassischen Sinn“ möglich ist. Für die beiden anderen untersuchten Regionen ist keine Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Expression von PITX2 gefunden worden.

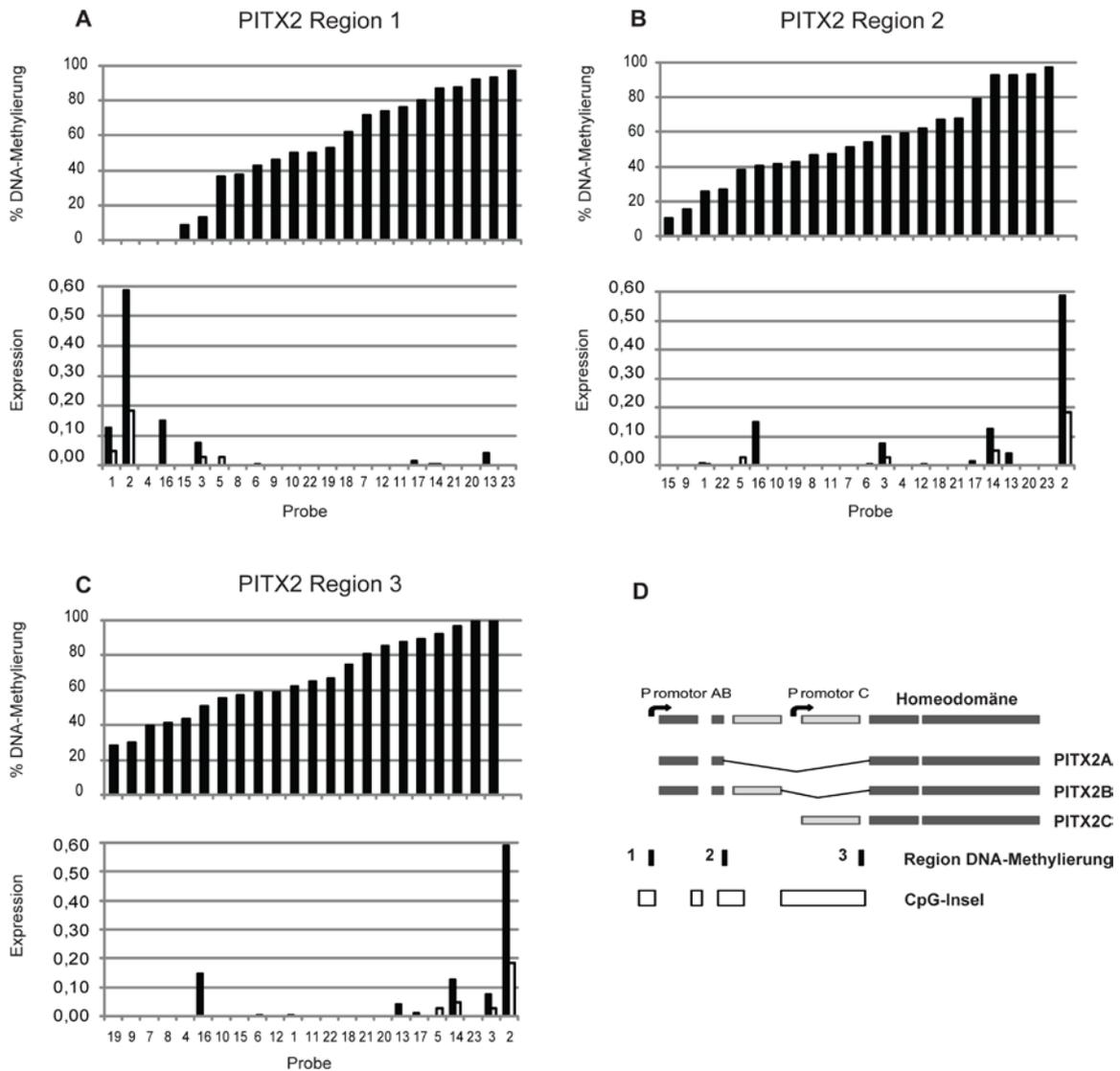


Abbildung 16: DNA-Methylierung der drei untersuchten Regionen von PITX2 im Vergleich zu der Expression der Transkriptvarianten PITX2A■ und PITX2B□ in Epithelzellen. Die DNA-Methylierungswerte in den Graphen stellen den prozentualen Mittelwert der DNA-Methylierung aller in einem Amplifikat mit Bisulfid-Sequenzierung untersuchten CpGs dar. Die Graphen zeigen die DNA-Methylierung und Expression für jede Probe sortiert nach aufsteigender Methylierung der PITX2 Region (A, B und C); D Schematische Darstellung des PITX2 Gens. Bekannte Transkriptvarianten von PITX2 und untersuchte Regionen der DNA-Methylierungsanalyse.

### 3.2. DNA-Methylierungsanalyse von Stroma- und Epithelzellen aus Darmkrebstumoren

Darmkrebs ist bei beiden Geschlechtern die zweithäufigste Krebserkrankung. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird für Männer auf über 37.000 und Frauen auf etwa 36.000 geschätzt. Männer erkranken im Mittel mit 69, Frauen mit 75 Jahren. Darmkrebs ist darüber hinaus sowohl für Frauen als auch für Männer die zweithäufigste krebsbedingte Todesursache in Deutschland.

Ein häufig verwendetes Modell beschreibt, dass Darmkrebs überwiegend über gutartige Vorstufen, die Dickdarmadenomen (sog. Polypen) entsteht. Für die Entwicklung eines bösartigen Tumors bedarf es mehrerer genetischer Veränderungen. Das Modell der Entwicklung von bösartigen Tumoren aus gutartigen Vorstufen ist als Adenom-Karzinom-Sequenz nach Vogelstein bekannt. Neben den genetischen Veränderungen spielen auch epigenetische Veränderungen in der Krankheitsentstehung eine Rolle. Inwiefern das spezifische Muster an epigenetischen Veränderungen diagnostische oder prognostische Aussagen über die Krebserkrankung zulässt, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Experimente, die wesentlich zum Verständnis von Tumorbiomarkern beitragen, helfen bei der Einschätzung der Einsatzmöglichkeiten eines Biomarkers.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Methylierung in mikrodisssektierten Tumor- und tumorbenachbarten Epithel- und Stromazellen für die in der Literatur beschriebenen Biomarker für Darmkrebs SEPT9, VIM, RASSF2, ALX4, SFRP1, APC und TFF1 untersucht. Dabei wurde insbesondere der DNA-Methylierungsmarker Septin 9 näher charakterisiert. Sieben verschiedene Regionen von Septin 9 sind in Hinblick auf die DNA-Methylierung untersucht worden. Septin 9 gehört zu der Familie der Septine, die aus cytoplasmatischen, cytoskeletalen filament-bildenden Proteinen besteht, welche eine konservierte GTP-bindende Domäne besitzen [184]. Ursprünglich wurden die Septine in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, dort schreibt man ihnen wichtige Funktionen bei der Zytokinese zu. Die Septine kommen auch in den Zellen der Säugetiere vor, in denen sie mit weiteren Zellvorgängen, darunter der Exozytose und Apoptose, in Verbindung gebracht werden [185-187]. Septin 9 ist entscheidend für eine normale Teilung von Säugetierzellen [188]. Grützmann *et al.* [189] zeigten das die DNA-Methylierung von Septin 9 in Blutplasma eine minimal invasive Methode ist um Darmtumore zu detektieren.

Die in Abbildung 10 gezeigte Vorgehensweise wurde verwendet, um die DNA-Methylierung an insgesamt 13 verschiedenen Regionen in den mikrodisssektierten Proben zu analysieren.

### 3.2.1. Auswahl der Patientenproben für die Mikrodissektion

Für die Mikrodissektionsstudie wurden die Tumore von drei Patienten untersucht. Dabei besaßen die Proben unterschiedliche Tumorstadien (T1 = Patient 1 bis T3 = Patient 3). Es wurden jeweils Epithel- und Stromazellen aus dem Tumorgewebe, sowie aus Gewebe das sich angrenzend am Tumor befand (*normal adjacent tissue* NAT), mikrodissektiert, durchschnittlich jeweils zweimal 1000 Epithel- und Stromazellen (Kapitel 3.2.2). Die Tumorareale wurden unter dem Mikroskop auf einem geeigneten, nur leicht mit Hämatoxylin gefärbten Dünnschnitt identifiziert und ausgeschnitten. Die experimentellen Schritte der Mikrodissektion fanden im Rahmen einer Kooperation in den Laboren der Semmelweis Universität Budapest statt. Nach erfolgreicher Dissektion der ausgewählten Areale wurden die Proben entsprechend prozessiert (Abbildung 10). Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Mikrodissektion von Epithelzellen im Tumor benachbarten gesunden Gewebe (A) und Tumorgewebe des Darms (B).

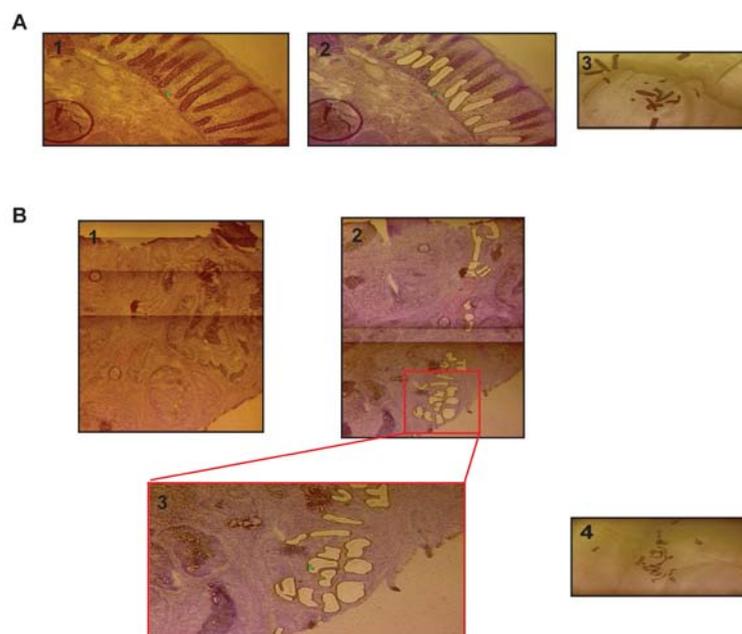


Abbildung 17 : Vorgehensweise bei der Durchführung der Mikrodissektion am Beispiel von am Tumor angrenzendem normalem Kolongewebe **A** und Tumorgewebe **B** ; Identifikation der Areal mit Hilfe eines HE Schnittes (**A1,B1**); Mikrodissektion der entsprechenden Areale (Epithelzellen) (**A2,B2 und B3**); mikrodissektierte Epithelzellen (**A3 und B4**)

### 3.2.2. Charakterisierung der DNA-Methylierung von Septin 9 in Epithel- und Stromazellen aus Darmkrebsproben

Ein Ziel dieser Mikrodissektionsstudie war die Charakterisierung der DNA-Methylierung an verschiedenen Regionen von Septin 9 in mikrodissizierten Epithel- und Stromazellen aus Tumor- und benachbartem Gewebe. Für Septin 9 wurden insgesamt 7 Amplifikate etabliert und verwendet, die über drei unterschiedliche CpG Inseln verteilt sind (Abbildung 18 und Abbildung 20). Wie in Kapitel 3.1.4 beschrieben, sind für eine quantitative DNA-Methylierungsanalyse aus mikrodissiziertem Material Kontrollen für die einzelnen Amplifikate von besonderer Wichtigkeit. Um auch in dieser Studie die Ergebnisse der quantitativen DNA-Methylierungsanalyse zuverlässig deuten zu können, wurde jeweils 1 ng der in Kapitel 2.2 beschriebenen Standardmischungen in unabhängigen Triplikaten parallel zu den eigentlichen Proben prozessiert und als Kontrolle für die jeweiligen Amplifikate in den Experimenten mitgeführt (Abbildung 18).

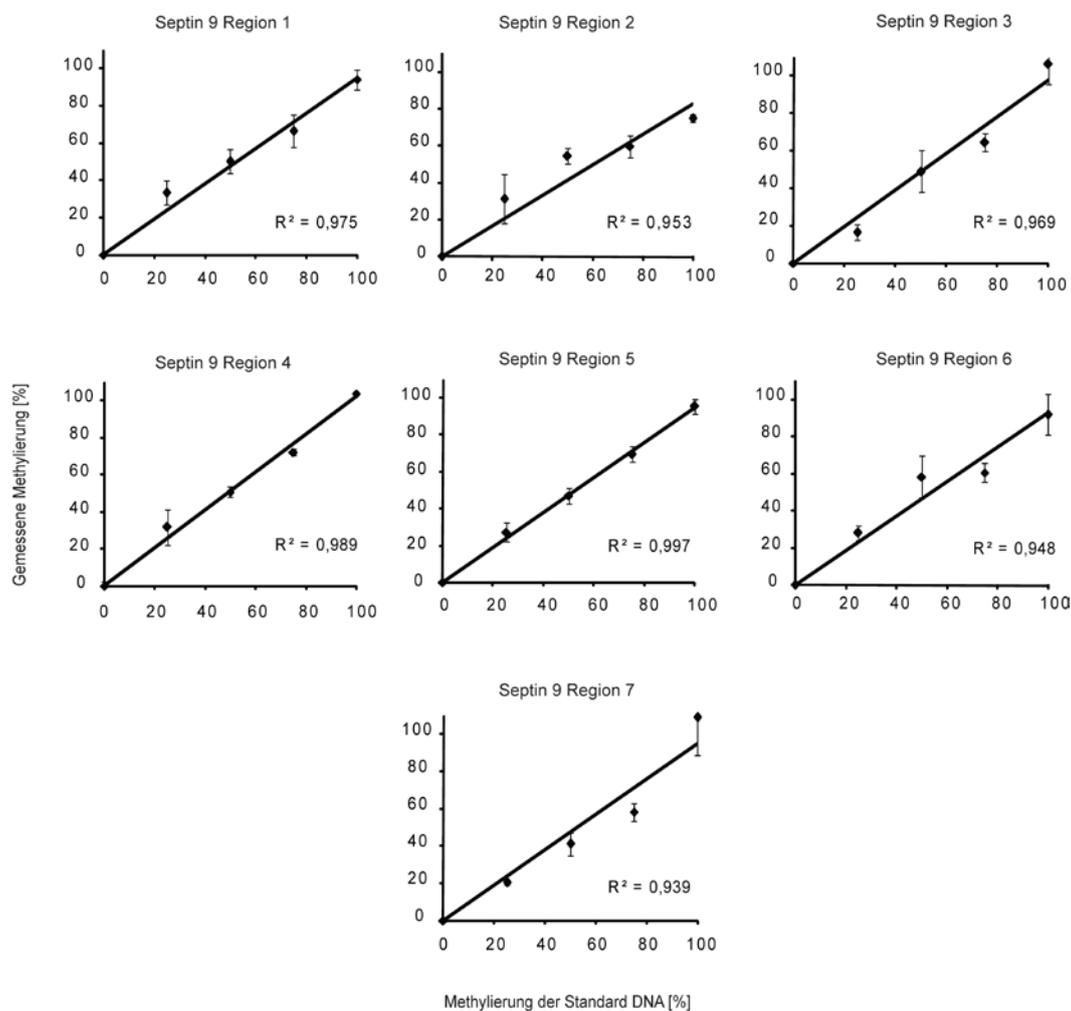


Abbildung 18: Quantifizierung der 7 untersuchten Regionen für Septin 9 bei Verwendung von 1ng Templat-DNA. Jede der Methylierungsmischungen wurde parallel zu den Tumorproben Bisulfit-konvertiert, voramplifiziert, reamplifiziert und sequenziert. Dargestellt sind die Ergebnisse des Mittelwerts aus drei unabhängigen Ansätzen.

Prozesskontrollen, die einen Hinweis auf eine mögliche Kontamination während der gesamten Prozedur liefern, wurden ebenfalls quantifiziert. Diese zeigten keine Kontamination mit Bisulfit-konvertierter DNA.

Ausgehend von dem theoretischen Wert von circa 6 pg DNA pro diploider Zelle lässt sich für die PCR Quantifizierung der einzelnen Proben die ungefähre Anzahl der mikrodisektierten Zellen errechnen. Abbildung 19 A zeigt die Anzahl der Zellen in den Proben (ET= Epithel Tumor, ST= Stroma Tumor, EN= Epithel *Normal Adjacent*, SN= Stroma *Normal Adjacent*) pro Patient (P1-P3). Für die unterschiedlichen Zelltypen wurden, wenn möglich, jeweils biologische Duplikate pro untersuchten Patient mikrodisektiert. Dies ermöglicht einen sehr guten Vergleich des Einflusses der Menge an Ausgangsmaterial auf die quantitative DNA-Methylierungsanalyse durch Bisulfit-Sequenzierung. Abbildung 19 B zeigt die gemessenen DNA-Methylierungswerte für die 7 Regionen von Septin 9 in den mikrodisektierten Proben. Trotz der zum Teil deutlichen Unterschiede an Ausgangsmaterial (Anzahl der Zellen) der Duplikate, sind die DNA-Methylierungswerte sehr gut reproduzierbar.

Dies lässt auf ein konstantes Verhältnis an methylierten Kopien schließen, unabhängig von der eingesetzten und zu untersuchenden Templat-Menge und der guten Reproduzierbarkeit der Bisulfit-Sequenzierung.

Auch die anderen 6 untersuchten Regionen (Kapitel 3.2.4) zeigten keine Abhängigkeit der DNA-Methylierung von der Ausgangsmenge an Templat-DNA (Daten nicht gezeigt).

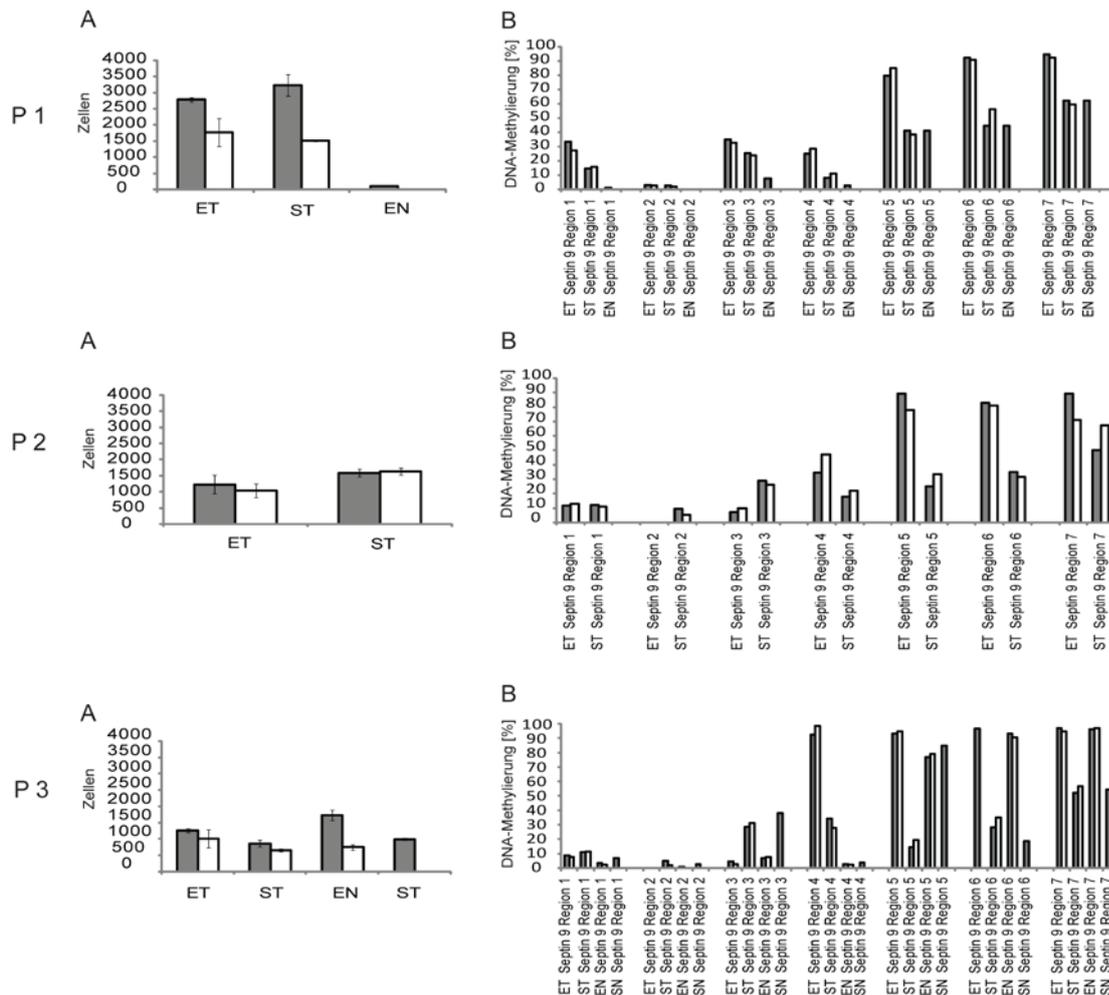


Abbildung 19 : Abhängigkeit der quantitativen DNA-Methylierungsanalyse von der Anzahl der untersuchten Zellen pro Patient und Probe. **A** Anzahl der Zellen pro Probe (ET= Epithel Tumor, ST= Stroma Tumor, EN= Epithel Normal Adjacent, SN= Stroma Normal Adjacent) und Patient (P1-P3); **B** Prozentuale DNA-Methylierung der sieben untersuchten Regionen von Septin 9; ■ = erste Mikrodissektion, □ = zweite Mikrodissektion

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse für die 7 Regionen von Septin 9 in den mikrodisssektierten Zellen. Die prozentuale DNA-Methylierung der einzelnen untersuchten Cytosine (im CpG Kontext) sind in einer Farbkodierung dargestellt (blau = 100%, gelb = 0% DNA-Methylierung). Die Proben der Darmkrebspatienten wurden zwischen den Zelltypen und den mikrodisssektierten Regionen unterschieden. Aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit der Quantifizierung der DNA-Methylierung für die jeweiligen biologischen Replikate (Abbildung 19), werden in den folgenden Abbildungen stets die Mittelwerte dargestellt. Region 1 befindet sich in einer CpG-Insel vor dem Transkriptionsstart einiger Transkriptvarianten von Septin 9 (Abbildung 21 D). Diese Region, wie auch die Region 2, welche in einer CpG-Insel unmittelbar im Transkriptionsstart einiger Transkriptvarianten von Septin 9 ansässig ist, zeigt zwischen den untersuchten Proben keine Unterschiede in der DNA-Methylierung. Alle untersuchten Proben sind in diesen beiden Regionen annähernd vollständig hypomethyliert. Region 3 von Septin 9 besitzt in den Stromazellen des Tumors (Tumor S) und in den benachbarten

Stromazellen (NAT S) eine höhere prozentuale DNA-Methylierung als die Epithelzellen. Region 4 zeigt im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben bei zwei der drei Patienten in den Tumor-Epithelzellen eine deutlich höhere DNA-Methylierung. Insbesondere Patient 3 mit einem T3 Stadium des Tumors zeigt eine Hypermethylierung der Region 4 in den Tumorepithelzellen. Region 5 befindet sich in der dritten CpG-Insel von Septin 9 und zeigt eindeutige Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen den Epithel- und Stromazellen. Es sind deutliche Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen den Epithelzellen des Tumors und den benachbarten Epithelzellen vorhanden. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse, dass bereits für alle drei Patienten, unabhängig vom Tumorstadium (T1 = Patient 1 bis T3 Patient 3) in den Epithelzellen des benachbarten Gewebes DNA-Methylierung in der Region 5 von Septin 9 zu finden ist. Die Tumor-Epithelzellen sind in dieser Region eindeutig hypermethyliert. Die Region 6 ist ebenfalls in der dritten CpG-Insel von Septin 9 beheimatet. In dieser Region sind die Unterschiede zwischen Tumor-Epithelzellen und den benachbarten Epithelzellen zum Tumor nicht mehr vorhanden. Auch Region 7 zeigt keine differentielle Methylierung zwischen NAT und Tumorzellen. Alle untersuchten Epithelzellen zeigen annähernd 100 % DNA-Methylierung in diesen Regionen. Auch die untersuchten Stromazellen sind in Region 6 und 7 deutlich höher methyliert, als in Region 5. Die Probe für die benachbarten Epithelzellen des Patienten P1 konnte in dem Amplifikat für die Region 6 von Septin 9 nicht erfolgreich amplifiziert werden. Der Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen den Epithel- und den Stromazellen ist jedoch auch in diesen Regionen eindeutig vorhanden. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die untersuchten Regionen für Septin 9 zum Teil stark in der DNA-Methylierung der verschiedenen Zelltypen unterscheiden. Insbesondere in der dritten CpG-Insel (Region 4 bis 6) sind deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Die Region 5 zeigt die deutlichsten Unterschiede zwischen den untersuchten NAT und Tumor Epithelzellen.

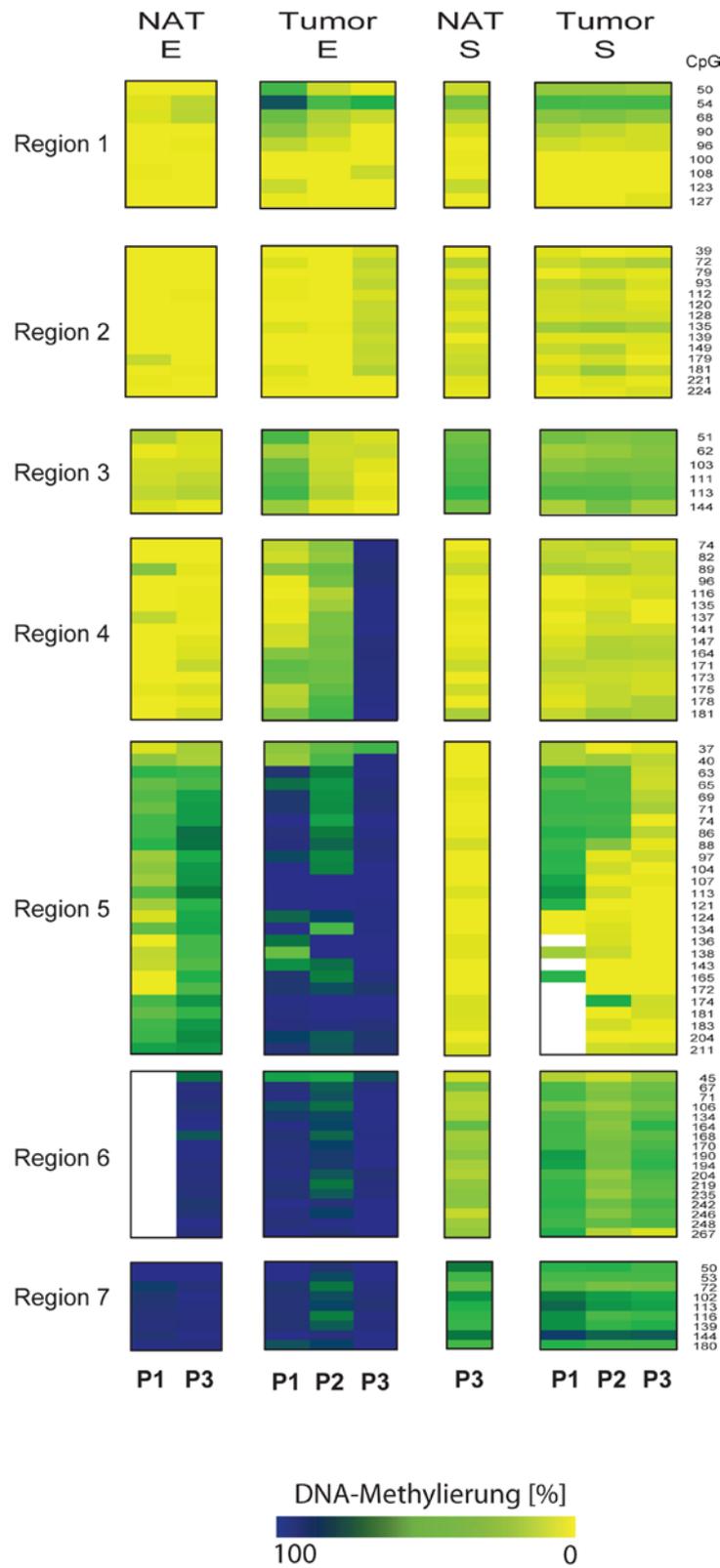


Abbildung 20 : DNA-Methylierung der sieben untersuchten Regionen für Septin 9. A DNA-Methylierung in den mikrodisssektierten Epithel- und Stromaprobe aus Tumorgewebe (Tumor E und Tumor S) und aus zum Tumor benachbarten Gewebe (NAT E und NAT S) von maximal drei verschiedenen Patienten. Jede Spalte stellt eine analysierte Probe dar. Jede Zeile innerhalb einer Region stellt ein analysiertes CpG dar.

### 3.2.3. Septin 9 Expression in Epithel- und Stromazellen aus Darmtumoren

Für Septin 9 wurden bislang Transkripte identifiziert, die fünf verschiedene Isoformen kodieren (SEPT9\_v1 – SEPT9\_v5) [190]. Differentielle Expression der Septin 9 Transkripte wurde bereits in verschiedenen Tumorzellen entdeckt, zum Beispiel in Ovarial- und Prostatakrebszellen [190-192].

Im Rahmen der Mikrodisektionsstudie wurde neben der DNA-Methylierung auch die Expression der Transkripte SEPT9\_v1 bis SEPT9\_v5 in den Epithel- und Stromazellen aus Darmkrebsproben analysiert (Abbildung 21). Hierzu wurden circa 1000 Epithel- und Stromazellen auf separaten Dünnschnitten der jeweiligen Tumore für die Expressionsanalyse mikrodisektiert. Die Mikrodisektion und die Expressionsanalysen wurden im Rahmen einer Kooperation an der Semmelweis Universität Budapest durchgeführt. Für die quantitative Expressionsanalyse der Transkriptvarianten von Septin 9 wurden bereits etablierte RT-PCRs verwendet [190, 193]. Abbildung 21 zeigt die gemessene relative Expression der untersuchten Transkriptvarianten von Septin 9 in den Epithel- und Stromazellen der Tumorproben, sowie der mikrodisektierten Zellen des an den Tumor angrenzenden Gewebes. Die Ergebnisse der DNA-Methylierung und der Expression sind für jede untersuchte Probe in Abbildung 21 A, B und C dargestellt. Eine erhöhte Expression der Transkripte SEPT9\_v2 und SEPT9\_v4 ist in den Epithelzellen des Tumors bei den Patienten 1 und 3 zu finden. Patient 2 zeigt in den Tumorepithelzellen deutlich erhöhte Expression der Transkriptionsvarianten SEPT9\_v4 und SEPT9\_v4\*. Das SEPT9\_v4\* Transkript ist im Vergleich zu SEPT9\_v4 signifikant stärker exprimiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch insgesamt keine bestimmte Zuordnung der DNA-Methylierung bestimmter CpG Inseln als regulatorische Region für die Transkripte von Septin 9 (Abbildung 21).

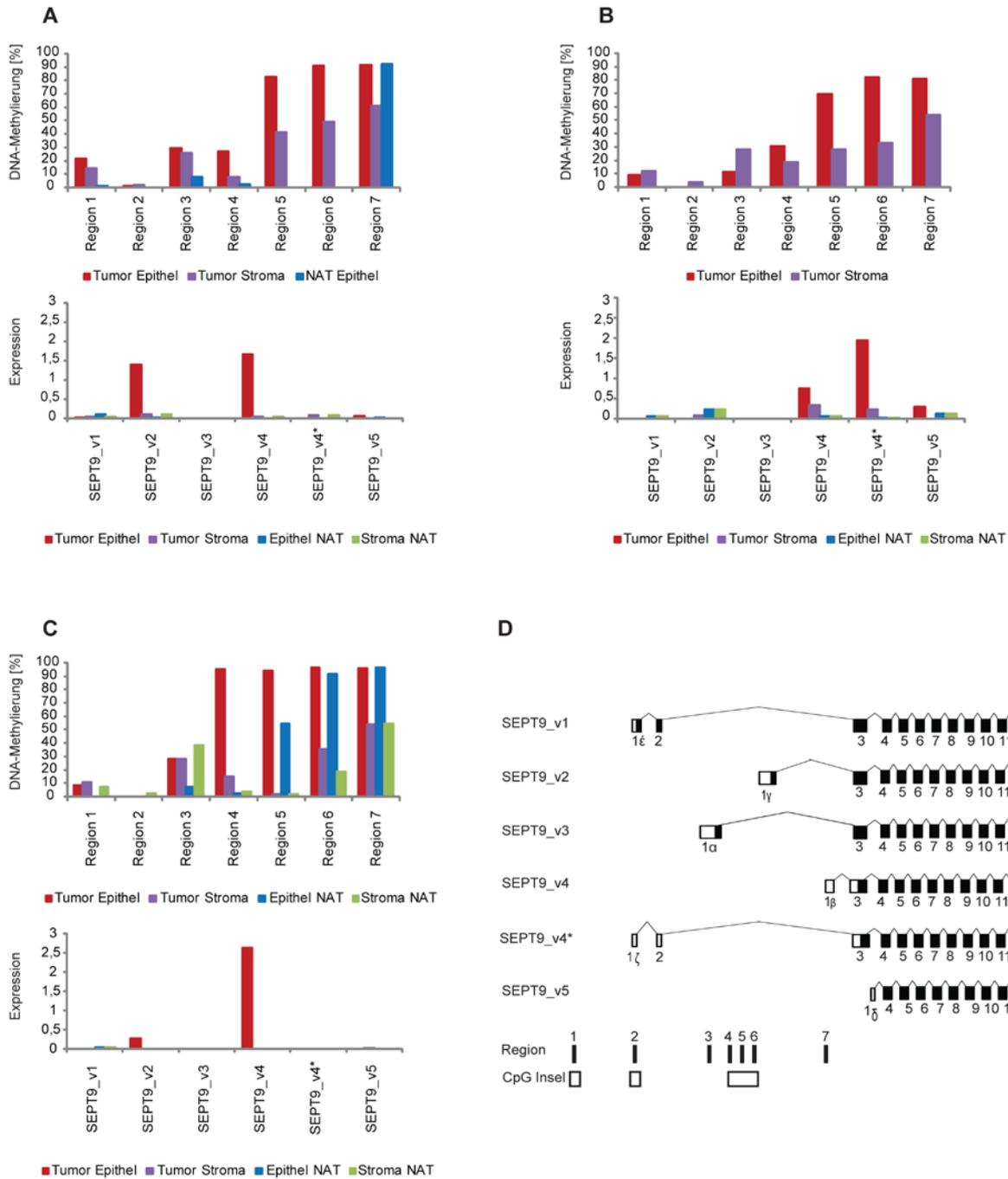


Abbildung 21: DNA-Methylierung der untersuchten Regionen von Septin 9 und Expression der 6 verschiedenen Transkriptvarianten in den mikrodisssektierten Zellen (A = Patient 1, B = Patient 2 und C = Patient 3).

### 3.2.4. Charakterisierung der DNA-Methylierung von sechs weiteren Biomarkern in mikrodisssektierten Darmkrebsproben

In dieser Mikrodisssektionsstudie wurde neben den verschiedenen Regionen von Septin 9 (siehe Kapitel 3.2.2) die DNA-Methylierung in Epithel- und Stromazellen für Regionen der Gene VIM, RASSF2, ALX4, SFRP1, APC und TFF1 untersucht. Abbildung 22 zeigt die Standardkurven für die einzelnen Amplifikate. Alle untersuchten Amplifikate können quantitativ die eingesetzten Standard DNAs unterscheiden. Die Ergebnisse für die 6 untersuchten Gene sind in Abbildung 23 dargestellt.

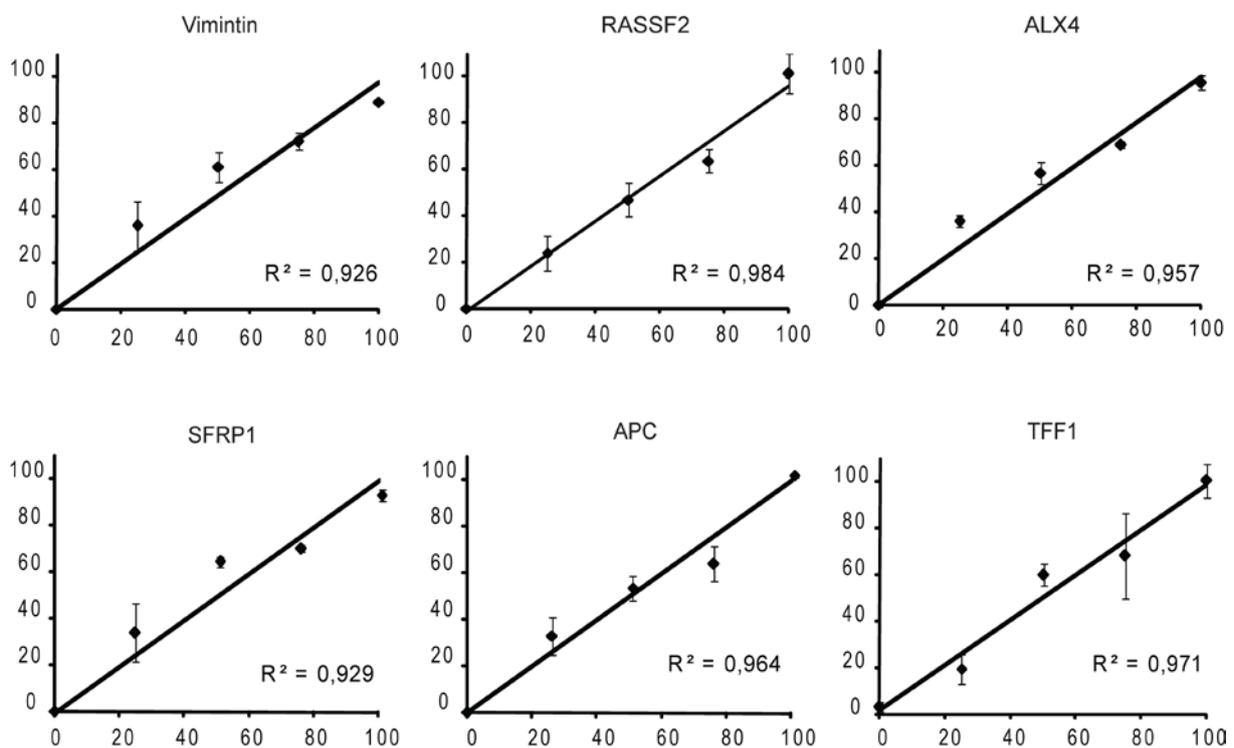


Abbildung 22 : Quantifizierung der sechs verschiedenen Regionen bei Verwendung von 1ng Templat-DNA. Jede der Methylierungsmischungen wurde parallel zu den Tumorseiten prozessiert. Dargestellt sind die Ergebnisse des Mittelwertes aus drei unabhängigen Ansätzen.

Insgesamt zeigen die untersuchten Regionen der Gene VIM und SFRP1 deutliche Unterschiede in der DNA-Methylierung der Epithel- und Stromazellen. Die Region von VIM ist in den Tumorepithelzellen und den benachbarten Epithelzellen deutlich differentiell methyliert. Die Ergebnisse zeigen für VIM ein ähnliches Methylierungsprofil wie die Region 5 von Septin 9. Chen *et al.* [194] zeigten, dass es sich bei der hier untersuchten VIM Region um einen Bereich handelt, bei dem die DNA-Methylierung eine diagnostische Aussage für

Darmkrebs ermöglicht. Die untersuchte Region von SFRP1 ist sowohl in den Tumorepithelzellen als auch in den Epithelzellen im angrenzenden Bereich jeweils hypermethyliert. Auch die DNA-Methylierung der Stromazellen ist für SFRP1 deutlich höher als für die anderen untersuchten Genregionen. Die Region von APC zeigt für die mikrodissidierten Tumorepithelzellen des Patienten 3 eine DNA-Methylierung von ca. 50%. Alle anderen untersuchten Proben zeigen für APC deutliche Hypomethylierung. TFF1 besitzt in allen untersuchten Proben eine DNA-Methylierung von durchschnittlich 50 %. Die Regionen für ALX4 und für RASSF2 zeigen tendenziell höhere DNA-Methylierung in den Epithelzellen im Vergleich zu den Stromazellen. Insbesondere die Tumorepithelprobe für den Patienten 2 ist in beiden Genregionen stärker methyliert.

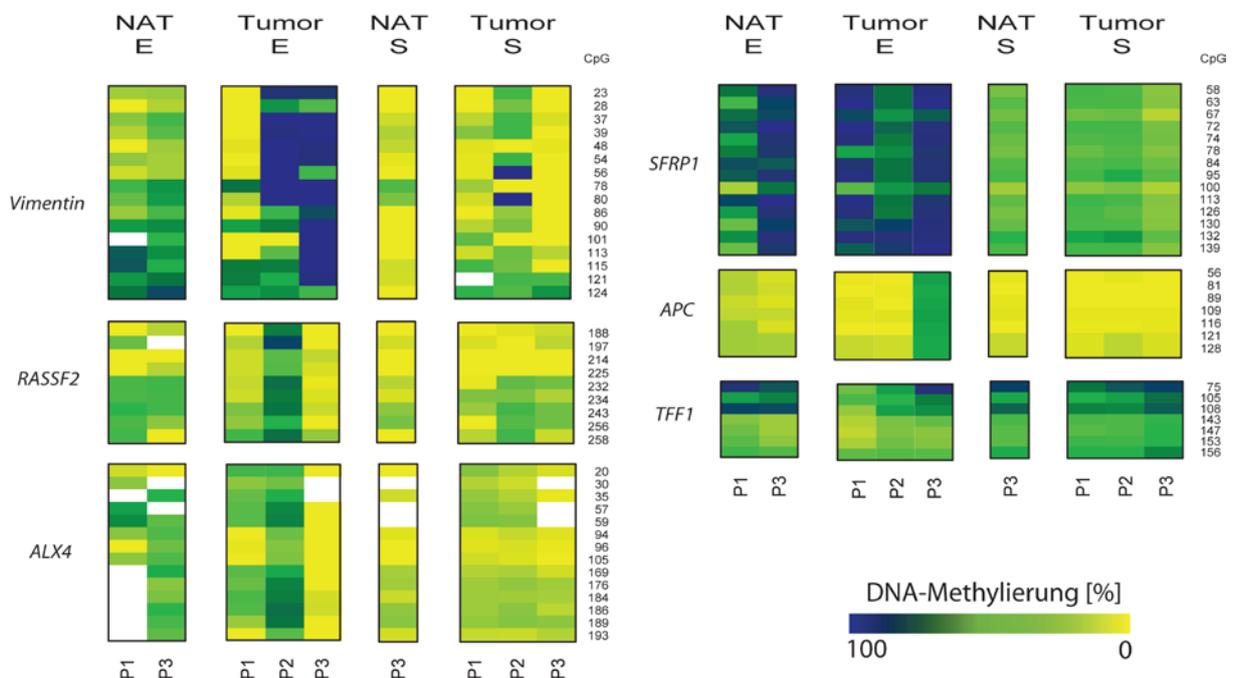


Abbildung 23 : DNA-Methylierung in den mikrodissidierten Epithel- und Stromaprobe aus Tumorgewebe (Tumor E und Tumor S) und aus zum Tumor benachbartem Gewebe (NAT E und NAT S) von maximal drei unterschiedlichen Patienten in den sechs verschiedenen Regionen. Jede Spalte stellt eine analysierte Probe dar, die Zeile innerhalb einer Region ein analysiertes Cytosin im CpG Kontext.

### **3.3. Quantitative Bisulfit-Sequenzierung zur Identifikation potentieller prognostischer Brustkrebs-Biomarker**

#### **3.3.1. Auswahl der Patientinnen**

Seit der Einführung in den 80er Jahren gehören Anthrazykline zu den vielversprechendsten Wirkstoffen für die Behandlung von metastasierendem Brustkrebs. Anthrazykline sind mittlerweile Bestandteil vieler adjuvanter und palliativer Chemotherapien, besonders in Kombination mit Taxanen. In den 90er Jahren war die Behandlung von Lymphknoten-positivem Brustkrebs mit einer auf Anthrazyklinen basierenden, adjuvanten Chemotherapie Standard [195]. Eine Behandlung mit Anthrazyklinen ist jedoch mit relativ starken Nebenwirkungen verbunden [196]. Ein Biomarker, der zuverlässig Lymphknoten-positive Brustkrebspatientinnen identifiziert die ein niedriges Rückfallrisiko nach einer adjuvanten Anthrazykline basierten Chemotherapie besitzen, könnte eine unnötig lange und hochdosierte Behandlung mit Anthrazyklin verhindern. Prädiktive Biomarker könnten individuell bei der Entscheidung helfen, ob Anthrazyklin Bestandteil einer adjuvanten Chemotherapie für die jeweilige Patientin sein sollte, oder nicht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Identifizierung von potentiell prognostischen Brustkrebs-Biomakern die DNA von Lymphknoten-positiven Brustkrebspatientinnen aus vier verschiedenen klinischen Zentren in Fall-Kontroll Studien untersucht.

Diese Patientinnenpopulation umfasste insgesamt 162 adjuvant mit Anthrazyklin behandelte, Östrogen-Rezeptor und Lymphknoten-positive Brustkrebspatientinnen. Von den 162 Patientinnen haben 64 einen Rückfall in Form von Metastasenbildung erlitten. Alle Patientinnen haben eine adjuvante Chemotherapie (Anthrazyklin) erhalten, 59 Patientinnen sind zusätzlich noch durch eine Endokrine-Therapie mit Tamoxifen therapiert worden. Der Beobachtungszeitraum nach der Operation des Primärtumors betrug in der gesamten untersuchten Patientenpopulation durchschnittlich 67 Monate. Eine Übersicht der Charakteristika der Patientinnenpopulation in der Trainings- und Teststudie ist in Tabelle 5 zu finden.

Tabelle 5: Charakteristika der untersuchten Kohorten

	Trainingsstudie		Teststudie	
	Gesamt	Metastasen	Gesamt	Metastasen
<b>Gesamtzahl Patientinnen</b>	<b>84 (100%)</b>	<b>39</b>	<b>78 (100%)</b>	<b>25</b>
<i>Alter zum Zeitpunkt der Diagnose</i>				
≤ 50 Jahre	38 (45%)	20	41 (53%)	16
> 50 Jahre	46 (55%)	19	37 (47%)	19
Median Alter (Jahre)	49		49	
Bereich (Jahre)	29-71		33 - 81	
<i>T-Stadium</i>				
< 2cm (T1)	19 (23%)	4	24 (31%)	5
> 2cm (T2+T3)	63 (75%)	35	53 (68%)	19
Unbekannt	2 (2%)	0	1 (1%)	1
<i>Grad</i>				
G1	2 (2%)	0	3 (4%)	1
G2	24 (29%)	11	30 (38%)	7
G3	47 (56%)	21	28 (36%)	11
Unbekannt	11 (13%)	7	17 (22%)	6
<i>Progesteron Rezeptor</i>				
Negativ	12 (14%)	4	18 (23%)	9
Positiv	72 (86%)	35	60 (77%)	16
<i>Endokrine Behandlung</i>				
Ja	22 (26%)	8	37 (47%)	9
Nein	61 (73%)	30	40 (51%)	15
Unbekannt	1 (1%)	1	1 (1%)	1
<i>Nachuntersuchung</i>				
Median [Monate]	80		53,5	
Bereich [Monate]	6-144		5-166	

### 3.3.2. Vorgehensweise zur Analyse potentiell prognostischer Methylierungsmarker

Es wurden 202 Markerkandidaten für die Analyse ausgewählt (Tabelle 8; Seite 97). Die Auswahl der Markerkandidaten basierte auf einer Literaturrecherche oder auf differentiell methylierten genomischen Loci, die in einer genomweiten DNA-Methylierungsanalyse (DMH = *Differential Methylation Hybridization* [173]) identifiziert wurden. Bei Kandidaten, die aufgrund einer Literaturrecherche ausgewählt wurden, handelt es sich um solche, für die entweder eine Rolle bei der Entstehung des primären Tumors, beim malignen Wachstum der Zellen oder bei der Metastasierung des Geschwülstes angenommen wird. Von der Vielzahl beschriebener Kandidatengene wurden vor allem diejenigen in die Auswahl genommen, für die bereits Hinweise auf veränderte Methylierungsprofile vorliegen. Des Weiteren wurden Gene untersucht, die einen direkten Bezug zu bereits bekannten Brustkrebsbiomarkern durch Signaltransduktionswege (wie z.B. den Wnt-Signalweg) haben.

Für die Biomarkerkandidaten wurden jeweils modifizierte Primerpaare für die Analyse mittels quantitativer Bisulfit-Sequenzierung entworfen (Kapitel 1.6.4). Die Primerpaare wurden auf Bisulfit-konvertierter MDA DNA unter den definierten Sequenzierbedingungen getestet (siehe Kapitel 2.5 und 2.7). Bei der Sequenzierung der Brustkrebs-DNAs wurde zusätzlich für jedes Amplifikat als Referenz eine 100% methylierte DNA (Kapitel 2.2) sequenziert. Dieser Standard diente als 100%ige Referenz bei der Auswertung der C-Signale in dem jeweiligen Amplifikat. Dabei zeigten vorrangegangene Tests, dass das als Referenz genutzte C-Fluoreszenzsignal nach der Normalisierung für dasselbe Amplifikat auf unterschiedlichen Platten voneinander abweichen kann. Aus diesem Grund wurden die Standards immer auf der gleichen Platte sequenziert, auf der sich auch die DNAs der Brustkrebsproben für das jeweilige Amplifikat befanden, und nur innerhalb dieser als Referenz verwendet.

Um aus den 202 potentiellen Markerkandidaten prognostische Biomarker zu identifizieren, wurde ein Selektionsverfahren entwickelt (Abbildung 24). In einem ersten Selektionsschritt wurde die DNA-Methylierung aller 202 Loci auf 12 zufällig ausgewählten, Bisulfit-konvertierten DNA Tumorproben untersucht, die zu gleichen Anteilen von Patientinnen mit und ohne Rückfall der Brustkrebserkrankung nach Behandlung mit Anthrazyklin innerhalb des Beobachtungszeitraumes stammten.

Eine statistische Größe, über welche die Qualität eines Biomarkers beurteilt werden kann, ist die Fläche unter der Kurve (*Area Under the Curve AUC*) der *Receiver Operating Characteristic (ROC)*. Im Rahmen dieser Arbeit wird ROC als eine graphische Darstellung bezeichnet, bei der die Sensitivität über die Spezifität (100% - Spezifität) für alle möglichen Schwellenwerte der DNA-Methylierung (0% - 100%) der untersuchten Region aufgetragen wird. Das bedeutet, die Auftragung der richtig positiv über die falsch positiv klassifizierten Patientinnen in diesem Graphen, also den Anteil von den Rückfallpatientinnen, die richtig in

die schlechte Prognosegruppe eingeteilt wurden, über den Anteil von den rückfallfreien Patientinnen die „falsch“ in die schlechte Prognosegruppe eingestuft wurden. Handelt es sich um keinen Methylierungsmarker, so gilt aus statistischen Gründen, dass für jeden Methylierungsschwellenwert der Anteil an falsch positiven und 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 wäre für alle Schwellenwerte zwischen 0% und 100% DNA-Methylierung eine richtige Einstufung der Patientinnen möglich, die Fläche unter dem Graphen wäre somit 1. Alle Patientinnen mit Rückfall wären zu 100% methyliert, während die ohne Rückfall zu 0% methyliert wären (oder umgekehrt). Somit stellt der Wert der AUC zwischen 0,5 und 1 die Fähigkeit eines Biomarkers dar, zwischen Patientinnen zu unterscheiden, von denen ein Teil einen Rückfall erleidet und der andere nicht, ohne das zuvor ein Schwellenwert festgelegt werden muss.

165 der untersuchten Biomarkerkandidaten zeigten im ersten Schritt der Studie keine signifikante differentielle DNA-Methylierung zwischen den beiden oben genannten Gruppen. Diese Amplifivate wurden von den weiteren Experimenten ausgeschlossen. Die 37 potentiellen DNA-Methylierungsmarker, die zwischen den beiden untersuchten Probengruppen signifikante differentielle Methylierung zeigten, wurden in einer Trainingsstudie auf zusätzlichen 72 Brustkrebsproben untersucht. Dabei wurden 6 vielversprechende Biomarkerkandidaten (CDO1, APC, ZBTB16, NCR1, POU4F3, und CXCL12) in der Trainingsstudie identifiziert.

Zur Bestätigung dieser 6 potentiellen Biomarker wurden diese in einer Teststudie auf weiteren 78 Tumorproben von Brustkrebspatientinnen untersucht. In der Teststudie bestätigte sich die Region im Cystein-dioxygenase 1 Gen (CDO1) als prognostischer DNA-Methylierungsmarker für eine mit Anthrazyklin behandelte, Östrogen Rezeptor positive, Lymphknoten-positive Patientinnengruppe. In Tabelle 6 sind die AUC der ROC nach 72 Monaten nach der Operation dargestellt. Die DNA-Methylierung von CDO1 zeigt in der Trainings- und der Teststudie jeweils signifikante Ergebnisse.

Tabelle 6: Ergebnisse der statistischen Analyse der DNA-Methylierung der 6 Gene in der Trainings- und Teststudie von Lymphknoten-, Östrogenrezeptor- positiven, adjuvant mit Anthrazyklin behandelten Brustkrebspatientinnen. Gezeigt sind die AUC Werte der ROC 72 Monate. Die Gene sind nach den Ergebnisse der p-Werte geordnet. Der Median der DNA-Methylierung wurde als Schnittpunkt gewählt.

Gen	Trainingsstudie (n = 84)		Teststudie (n = 78)	
	AUC	p-Wert	AUC	p-Wert
CDO1	0,70	0,0034	0,69	0,0010
APC	0,68	0,0204	0,55	0,5306
ZBTB16	0,67	0,0224	0,63	0,0582
NCR1	0,63	0,0239	0,56	0,9048
POU4F3	0,69	0,0248	0,69	0,0754
CXCL12	0,67	0,0282	0,49	0,4854

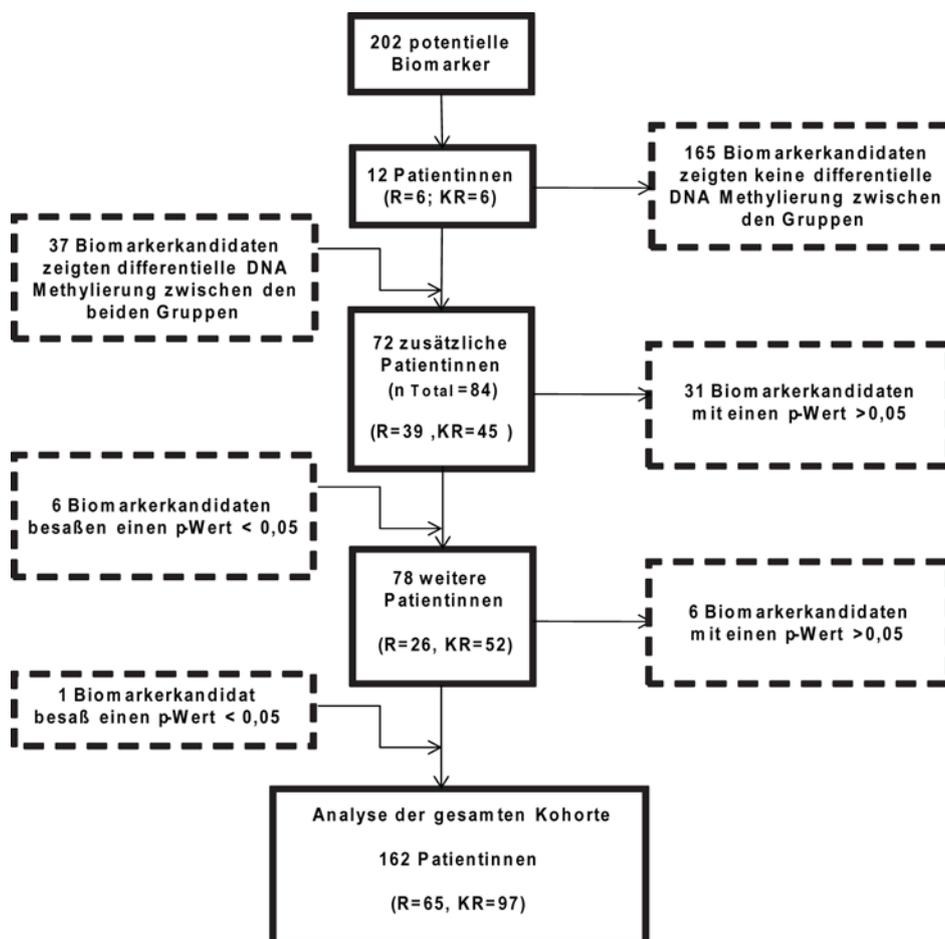


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Biomarkerfindung. **R**= Rückfall der Brustkrebserkrankung, **KR**= Kein Rückfall der Brustkrebserkrankung

### 3.3.3. Analyse der DNA-Methylierung von CDO1 als prognostischer Biomarker für Brustkrebs

Um die Qualität eines Markers in einer Patientenpopulation beurteilen zu können, sollte in der Regel eine Studie durchgeführt werden, bei der zunächst in einem Training ein Methylierungs-Schwellenwert ermittelt wird, anhand dessen die Prognose für die Patienten als entweder schlecht oder gut klassifiziert wird. In einem anschließenden Test würde dann der Marker unter Verwendung des zuvor ermittelten Schwellenwertes auf einem unabhängigen Datensatz validiert werden.

In vielen Arbeiten wird dies so nicht durchgeführt, stattdessen wird ein optimierter Schwellenwert ohne unabhängigen Testdatensatz 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 jeweilig untersuchten Patientenpopulation gewählt. Die Wahl des Medians hat gegenüber einem optimierten Schwellenwert den Vorteil, dass dieser vor der jeweiligen Studie festgelegt wird und somit nicht zu stark optimierten Ergebnissen führt.

Das prognostische Potential der DNA-Methylierung von CDO1 in der Trainings- und Teststudie ist in Abbildung 25 in Form von Kaplan-Meier-Überlebenskurven für das Metastasen-freie Überleben in der Trainings- und der Teststudie dargestellt. Dabei können aufgrund der DNA-Methylierung von CDO1 zwei signifikant unterscheidbare Gruppen gebildet werden. Die Gruppe, die über dem Median liegt (hypermethyliert) und die, die unter dem Median der DNA-Methylierung von CDO1 in der jeweiligen untersuchten Population liegt (hypomethyliert). In der Trainingsstudie (n=84), befinden sich von insgesamt 38 Patientinnen mit einem Rückfall einer Brustkrebserkrankung 13 (34,2%) in der entsprechenden für CDO1 hypomethylierten Gruppe, und 25 (65,8%) in der hypermethylierten Gruppe. In der Teststudie (n=78), befinden sich von den insgesamt 26 Patientinnen mit einem Rückfall einer Brustkrebserkrankung 8 (30,8%) in der hypomethylierte Gruppe und 18 (69,2%) in der hypermethylierten Gruppe.

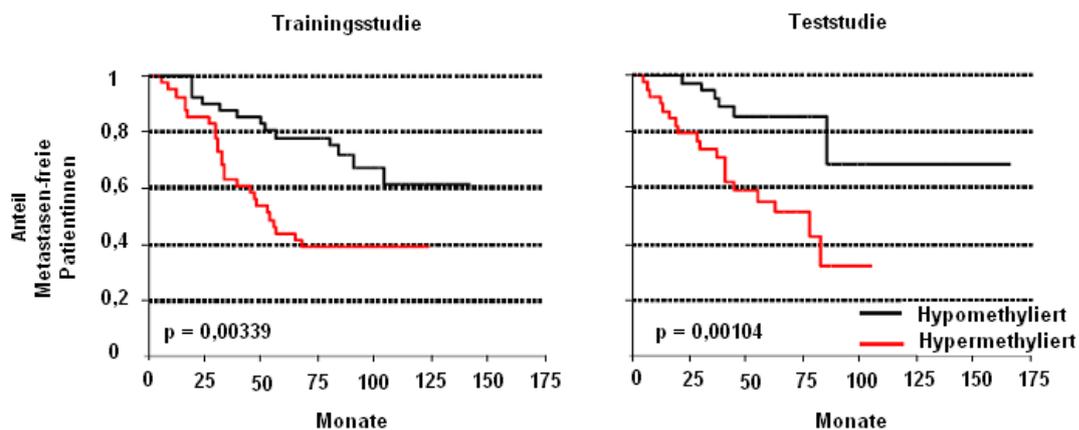


Abbildung 25 : Kaplan-Meier Analyse für das Metastasen-freie Überleben in der Trainings- (84 Patientinnen) und der Teststudie (78 Patientinnen) von Lymphknoten- und Östrogen-positiven Tumoren, die adjuvant mit Anthrazyklinen behandelt wurden. Die Graphen zeigen die Analyse des DNA-Methylierungsstatus von CDO1. Der Median der DNA-Methylierung von CDO1 in den untersuchten Populationen wurde als Trennpunkt definiert.

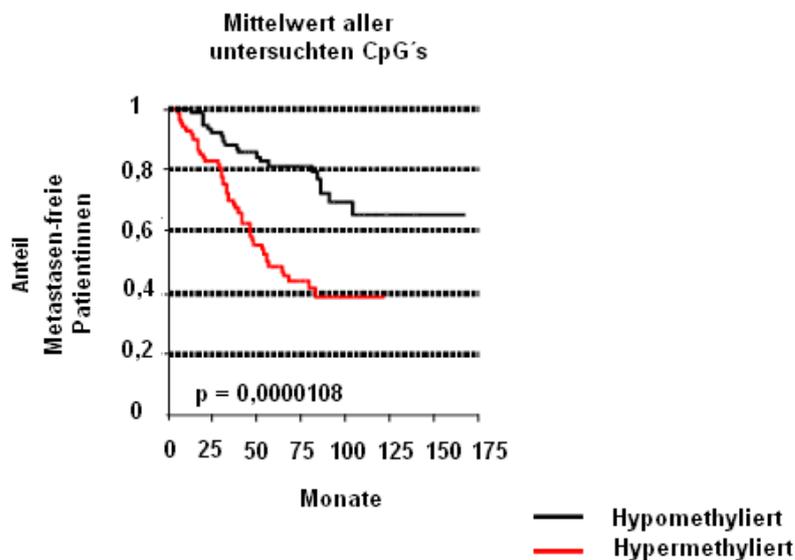


Abbildung 26: Kaplan-Meier Analyse für das Metastasen-freie Überleben der insgesamt untersuchten Patientinnen mit Lymphknoten- und Östrogen-positiven Tumoren, die adjuvant mit Anthrazyklin behandelt wurden (n=162). Der Graph zeigt die Analyse des DNA-Methylierungsstatus von CDO1. Der Median der DNA-Methylierung von CDO1 in den untersuchten Populationen wurde als Trennpunkt definiert.

Das Cox-Modell ist eine häufig verwendete Regressionsmethode zur Analyse von Überlebensdaten. Es wird auch als proportionales Hazard Modell (*proportional hazards model*) bezeichnet. Das Cox-Modell wird eingesetzt wenn gleichzeitig der Effekt mehrerer Einflussgrößen auf eine Zielvariable untersucht werden soll. Bei der Identifikation von Biomarkern ist es von Bedeutung, die Relevanz bzw. das Ausmaß des Effekts hinsichtlich des Überlebens von Patienten (in diesem Fall Metastasen-freies Überleben) unter gleichzeitiger Berücksichtigung weiterer relevanter Einflussfaktoren im Rahmen einer multiplen Überlebenszeitanalyse zu untersuchen. Außerdem kann bei randomisierten Studien in der Regel mit präziseren Schätzungen durch die Adjustierung nach prognostisch relevanten Variablen gerechnet werden. Das Cox-Modell liefert eine Schätzung des Effekts auf die Überlebenszeit (in dieser Arbeit: Metastasen-freie Zeit), adjustiert für die anderen Einflussgrößen des Regressionsmodells. Das Modell erlaubt das unmittelbare Risiko für eine Person im Hinblick auf den Tod oder ein anderes interessierendes Ereignis zu schätzen (den Hazard). Hierfür müssen aber gleichzeitig die Werte für alle Einflussvariablen dieser Person gegeben sein. Tabelle 7 zeigt die Ergebnisse der univariaten und paarweisen *Cox-proportionalen Hazard Regression* in der Teststudie. In der univariaten Analyse ist die DNA-Methylierung von CDO1 mit einem hohen Risiko eines Rückfalls bei den untersuchten Patientinnen assoziiert (p-Wert = 0,0098; HR = 3,7; 95% CI = 1,4 – 9,8). Der Progesteron Rezeptor Status (p-Wert = 0,01904; HR = 2,7; 95% CI 1,2 – 6,0) zeigt ebenfalls signifikante Ergebnisse. Auch in der gepaarten Cox-Proportional Hazard Analyse, welche die CDO1 DNA-Methylierung und andere Variablen wie Alter bei der Operation, T-Stadium, Progesteronrezeptor Status und endokrine Behandlung beinhaltet, zeigt sich die DNA-Methylierungen von CDO1 als signifikanter Marker (siehe Tabelle 7).

### 3. Ergebnisse

Tabelle 7 : Univariate und multivariate Cox-Proportional Hazard Analyse für die Zeit bis zur Identifizierung von Metastasen in der Teststudie. CDO1 DNA-Methylierung, das Alter T-Stadium, Endokrin Behandlung und Progesteron Rezeptor Status wurden als binäre Variablen analysiert.“

	<b>Hazard Ratio (95% CI)</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Anzahl der Patientinnen</b>
<b>Univariate Analyse</b>			
CDO1 Methylierung	3,7 (1,4 – 9,8)	0,0098	78
Alter bei Operation	1,3 (0,6 – 2,8)	0,5545	78
T-Stadium (T2,T3 vs. T1)	2,0 (0,7 – 5,2)	0,1799	78
Progesteron Rezeptor Status (Positiv vs. Negativ)	2,7 (1,2 – 6,0)	0,0190	77
Endokrine Behandlung (Nein vs. Ja)	2,0 (0,9 – 4,5)	0,1115	77
Grad (1,2 vs,3)	2,0 (0,8 – 4,9)	0,1397	61
<b>Paarweise Analyse</b>			
CDO1 Methylierung	3,9 (1,5 – 10,5)	0,0072	78
Alter bei Operation	1,5 (0,7 – 3,4)	0,3160	78
CDO1 Methylierung T-Stadium (T2,T3 vs. T1)	3,5 (1,3 - 9,5) 2,0 (0,7 - 5,3)	0,0128 0,1790	77 77
CDO1 Methylierung Progesteron Rezeptor Status (Positiv vs. Negativ)	3,5 (1,3 - 9,4) 2,5 (1,1 - 5,7)	0,0123 0,0275	78 78
CDO1 Methylierung Endokrin Behandlung (Nein vs. Ja)	4,6 (1,6 - 13,5) 2,0 (0,9 - 4,7)	0,0055 0,0938	77 77
CDO1 Methylierung Grad1 (1,2 vs. 3)	3,1 (1,1 - 8,7) 1,7 (0,7 - 4,3)	0,0318 0,2506	61 61

Die vorangegangenen Analysen von CDO1 in den untersuchten Tumorproben von Brustkrebspatientinnen beruhten stets auf dem Mittelwert der DNA-Methylierung aller im Amplifikat von CDO1 enthaltenden Cytosine in CpG Dinukleotiden. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der direkten Bisulfit-Sequenzierung ermöglicht auch die Analyse der DNA-Methylierung jedes einzelnen CpG's im Amplifikat. Um herauszufinden, ob jedes im Amplifikat befindliche CpG die gleiche prognostische Aussagekraft besitzt, wurden diese einzeln analysiert. Dabei sind die Cytosine im CpG Kontext 1 und 2 aufgrund der direkten Aufeinanderfolge im Mittelwert zusammengefasst. Abbildung 27 zeigt, dass jeder der im CDO1 befindlichen Cytosine im CpG Kontext eine signifikante prognostische Aussagekraft in den insgesamt untersuchten Patientinnenproben besitzt. Das dritte CpG im Amplifikat von CDO1 zeigt das beste Ergebnis ( $p$ -Wert = 0,000023), dagegen zeigen die zusammengefassten CpG's 1 und 2 im Vergleich zu den anderen das schlechteste Ergebnis ( $p$ -Wert = 0,00244). Insgesamt zeigt jedoch keines der einzeln analysierten CpG's ein besseres Ergebnis als die Analyse der Mittelwerte aller CpG's (siehe Abbildung 27).

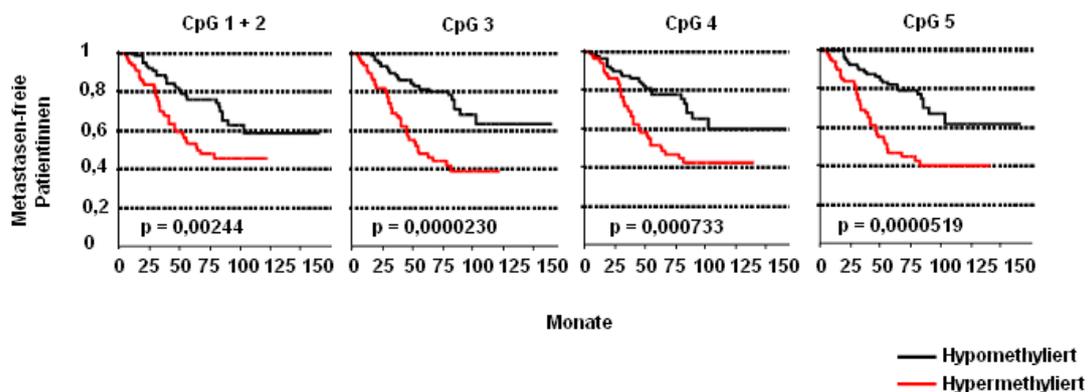


Abbildung 27 : Kaplan-Meier Analyse für das Metastasen-freie Überleben der insgesamt untersuchten Patientinnen mit Lymphknoten- und Östrogen-positiven Tumoren, die adjuvant mit Anthrazyklin behandelt wurden ( $n=162$ ). Der Graph zeigt die Analyse des DNA-Methylierungsstatus von CDO1 der einzelnen im Amplifikat enthaltenen CpG's. Der Median der DNA-Methylierung von CDO1 in den untersuchten Populationen des jeweiligen CpG's wurde als Grenzwert definiert.

Die Fähigkeit deutlich und reproduzierbar zwischen unterschiedlich hohen DNA-Methylierungswerten unterscheiden zu können, ist für die Qualität der prognostischen Aussagekraft von essentiellern Wert. Um dies für das CDO1 Amplifikat sicherzustellen, wurde CDO1 auf verschiedene Methylierungsmischungen jeweils in Triplikaten sequenziert. Hierzu wurden sechs verschiedene Bisulfit-konvertierte DNA's, bestehend aus unmethylierter DNA (MDA DNA) und methylierter DNA (mMDA DNA), eingesetzt (siehe Kapitel 2.2). Die Mischungen bestanden jeweils zu 0%,5%,15%,50%,75% oder 100% aus vollständig methylierter DNA. Abbildung 28 zeigt, dass alle fünf CpG's im Amplifikat des Gens CDO1 zuverlässig die DNA-Methylierung der Standards quantifizieren. Die große Genauigkeit, mit der die Analyse einzelner CpGs die Methylierung der Templat-DNA wiedergibt, erlaubt die Schlussfolgerung, dass die in Abbildung 27 gezeigten Unterschiede zwischen den CpGs nicht auf unzureichende Quantifizierbarkeit dieser Methode zurückzuführen ist.

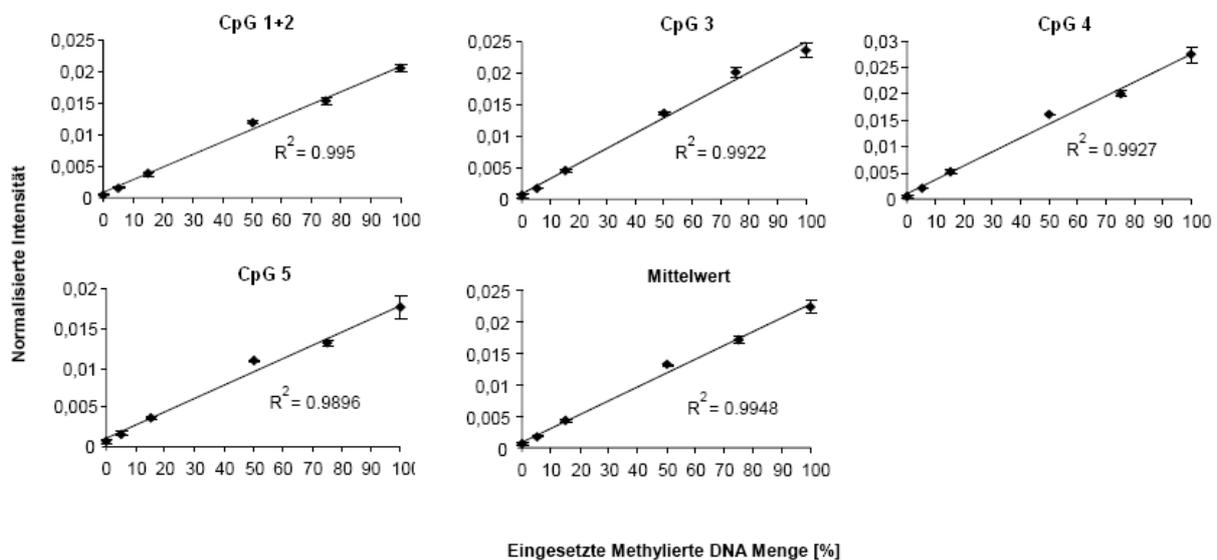


Abbildung 28: Abhängigkeit des normalisierten Methylierungssignals von der DNA-Methylierung der eingesetzten Standard-DNAs. Gezeigt sind Kalibrierungen für 5 CpGs im Amplifikat für das Gen CDO1 und der Mittelwert aus den 5 CpGs.

## 4. Diskussion

### 4.1. Methode zur DNA-Methylierungsanalyse mikrodisektierter Proben

Ein Ziel dieser Arbeit war die Analyse der DNA-Methylierung von Brust- und Darmkrebsmarkern in mikrodisektierten Zellen innerhalb eines Tumors, bzw. im anliegenden Gewebe. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die verwendete Methode (Kapitel 3.1 und 3.2) genutzt werden kann, um ein möglichst genaues Bild der Verteilung der DNA-Methylierung mehrerer Marker innerhalb mikrodisektierter Proben zu erhalten.

Der Ansatz, zunächst mehrere zu untersuchende Regionen im limitierten Templat mit einer multiplexierten PCR vorzuamplifizieren und anschließend die einzelnen Regionen zu reamplifizieren, ermöglicht die quantitative Messung der DNA-Methylierung von bis zu 13 Regionen in 1000 Zellen (Kapitel 3.2).

Dabei werden in der Multiplex PCR und der Reamplifikation insgesamt 95 PCR Zyklen durchgeführt. Diese sehr hohe Zahl von Zyklen ist eine potentielle Fehlerquelle. Eine gerichtete Amplifikation könnte beispielsweise zu falschen prozentualen DNA-Methylierungswerten führen.

Die gerichtete Amplifikation eines bestimmten Amplifikates kann unter anderem darauf beruhen, dass die Einzelstränge konvertierter methylierter und unmethylierter DNA aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens von Cytosinen verschiedene Sekundärstrukturen ausbilden können, welche dann zu einer Beeinträchtigung der Amplifikation der einen oder anderen Variante führen [181-183]. Weitere Faktoren für eine gerichtete Amplifikation sind die unterschiedlichen Schmelztemperaturen der Amplikate von methylierter und unmethylierter DNA. Aufgrund des höheren Anteiles an Cytosinen in methylierter DNA besitzt diese prinzipiell eine höhere Schmelztemperatur als unmethylierte DNA. Für die in dieser Studie etablierten Multiplex PCRs wurden jedoch solche Effekte für keines der untersuchten Amplikate festgestellt, da dies als systematische Verschiebung des Verhältnisses von Messwerten der eingesetzten Standards zu den Erwartungswerten sichtbar geworden wäre (siehe Abbildung 13, Abbildung 18 und Abbildung 22). Ein Grund für die Vermeidung der gerichteten Amplifikation bei den verwendeten Amplikaten in der multiplexierten PCR liegt vermutlich an den Reaktionsbedingungen. Alle verwendeten Primer besitzen eine Schmelztemperatur von ungefähr 55°C. Um die Spezifität der PCR für die jeweiligen Amplikate zu erhöhen, wurde eine geringe  $MgCl_2$  Konzentration und eine *Annealing* Temperatur von 58 °C gewählt. Dadurch wurde unter anderem auch die Bildung

von unerwünschten Nebenprodukten verhindert. Die Magnesium-Ionen erfüllen bei der PCR drei Aufgaben: Sie fungieren als Cofaktor der Polymerase, sie bilden lösliche Komplexe mit den dNTPs, und sie wirken sowohl auf die spezifische als auch auf die unspezifische Anlagerung des Primers an die Templat-DNA stabilisierend. Eine höhere Annealingtemperatur verringert die Bildung von Sekundärstrukturen und kann so gerichtete Amplifikationen verhindern [182]. Die in den multiplexierten PCRs verwendeten Primer wurden zuvor als eigenständige PCRs getestet. Ein Primerpaar galt als etabliert, wenn nach 50 PCR Zyklen und 1 ng Templat DNA ein deutliches PCR Produkt auf dem Agarosegel erkennbar war und das Sequenzierergebnis mit der *in silico* erwarteten Sequenz übereinstimmte. Dieses Vorgehen führte zu den in Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2 verwendeten, multiplexierten PCRs. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass diese Art der Primeretablierung erfolgreich war. Die entwickelten, multiplexierten PCRs zeigen keine erkennbare gerichtete Amplifikation von methylierter oder unmethylierter DNA.

Um die Eignung der verwendeten Methode für eine erfolgreiche Quantifizierung der DNA-Methylierung von geringen Mengen an DNA sicherzustellen wurde der gesamte Arbeitsablauf, bestehend aus Lyse, Bisulfitkonvertierung, Aufreinigung, Voramplifikation, Reamplifikation und quantitativer Bisulfit-Sequenzierung, mit Standard DNAs getestet. Je 1 ng (entspricht dem Äquivalent von circa 166 diploiden Zellen) mit den theoretischen DNA-Methylierungen von 0%, 25%, 50%, 75% und 100% wurde als Standard in Triplikaten eingesetzt. Bei der Auswahl der geeigneten DNAs zur Herstellung der Standards mussten einige Faktoren berücksichtigt werden. Mischungen aus künstlich hergestellter DNA (MDA-DNA, Kapitel 2.2) waren für die Tests zur Überprüfung der Leistung der einzelnen Amplifikate nicht geeignet. Bei der Herstellung der MDA-DNAs kann nicht sichergestellt werden, dass alle untersuchten Loci in gleicher Kopienzahl vorliegen und somit alle verwendeten Amplifikate die gleiche Menge an Ausgangstemplat für die multiplexierte PCR besitzen. Aus diesem Grund wurden überwiegend Mischungen aus peripherer Blut-Leukozyten-DNA (PBL-DNA) und künstlich methylierter PBL DNA verwendet. Diese DNAs stellen eine ausgewogene Repräsentation aller untersuchten Regionen dar. Für alle Regionen in Kapitel 3.1 und Kapitel 3.2 zeigten die Ergebnisse, dass eine deutliche Unterscheidung der Standard DNAs möglich war.

Bei den verwendeten Standards ist zu beachten, dass es sich um „Modell-DNAs“ handelt. Im Gegensatz zur Tumor DNA kann man bei den verwendeten Standard DNAs davon ausgehen, dass die Templatmoleküle an allen CpGs entweder methyliert oder unmethyliert sind und keinerlei Mosaikmuster im Methylierungsprofil vorliegen. Das bedeutet für die untersuchten Amplifikate, dass lediglich zwei verschiedene Arten von Templat in unterschiedlichen Mengen vorhanden sind. Bei der untersuchten DNA aus Gewebeproben kommt es hingegen durchaus vor, dass die CpGs innerhalb eines Amplifikates sehr

heterogen methyliert sind. Der Einfluss eines heterogen methylierten Templats auf die Effizienz der jeweiligen PCRs konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Hierzu müsste zunächst eine repräsentative zu erwartende Molekülpopulation, welche in verschiedenen Mischungen die DNA-Methylierungszustände eines Templats abbilden kann, beispielsweise durch Klonsequenzierung analysiert werden, im Anschluss müsste der Einfluss verschiedener Mischzustände auf die PCR getestet werden. Würde man bei einem Amplifikat mit 10 CpGs den Einfluss aller möglichen Kombinationen eines heterogen methylierten Templats auf die Effizienz der PCR analysieren wollen, würde das bedeuten, dass man verschiedene Mischungen aus bis zu  $2^{10}$  möglichen Molekülen testen muss. Somit ist zwar bei Betrachtung der Standardkurven der jeweiligen Amplifikate (siehe Abbildung 13, Abbildung 18 und Abbildung 22) stets zu berücksichtigen, dass diese auf „Modell-DNAs“ beruhen, ein Test der Amplifikate unter realen Bedingungen war jedoch im Rahmen dieser Arbeit zu zeit- und zu kostenintensiv.

Für die Amplifikate der Multiplex PCR in Kapitel 3.2 wurde eine sehr gute Reproduzierbarkeit der DNA-Methylierungswerte auf biologischen Replikaten gezeigt (Kapitel 3.2.2), basierend auf der Tumor-DNA von mikrodisezierten Zellen. Diese geringe Varianz verdeutlicht, dass für die untersuchten Amplifikate selbst im Falle einer theoretisch möglichen gerichteten Amplifikation in DNA von realen Gewebeproben die Ergebnisse zumindest reproduzierbar wären, was zur Folge hätte, dass Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorproben mit diesen Amplifikaten trotzdem erfolgreich zu analysieren wären.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Primer für die Reamplifikation der einzelnen Amplifikate zur DNA-Methylierungsanalyse von mikrodisezierten Proben mit einer Normalisierungsdomäne ausgestattet. Dadurch war die Quantifizierung der DNA-Methylierung mit den in der Einleitung (Kapitel 1.6.4) beschriebenen Auswertungsmethoden möglich. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Quantifizierung der DNA-Methylierung für die einzelnen Amplifikate und Proben in dieser Arbeit (Daten nicht gezeigt). Die automatisierte und deterministische Analyse der Sequenzierungsdaten mit der Software ESME und die Benutzung der von ESME zur Verfügung gestellten Ergebnisse in Tabellenform, sowie die anschließende automatisierte Darstellung, ermöglichen auch in größeren Datensätzen eine sehr gute und reproduzierbare Übersicht der DNA-Methylierung für die einzelnen CpG's. Ergebnisse wie Heterogenitäten der DNA-Methylierung innerhalb der untersuchten Regionen sind dadurch einfach und intuitiv zu illustrieren. Aus diesen Gründen wurden in den Kapiteln 3.1 und 3.2 die Ergebnisse basierend auf der Quantifizierung mit ESME gezeigt.

## 4.2. Vergleich der Methoden zur Mikrodissektionsanalyse

In dieser Arbeit wurden die untersuchten Biomarker und die Heterogenität ihrer DNA-Methylierung innerhalb verschiedener Zelltypen eines Tumors erstmals in dieser Form untersucht. Es sind zwar bereits einige Studien veröffentlicht, in denen DNA-Methylierungsanalyse auf mikrodissektierten Proben durchgeführt wurde, aber bei dem überwiegenden Teil dieser publizierten Arbeiten handelt es sich nur um semiquantitative oder qualitative Analysen.

Ein direkter Vergleich mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methode zur DNA-Methylierungsanalyse von mikrodissektierten Proben zu anderen publizierten Methoden ist daher relativ schwer. Dies liegt vor allem an der unterschiedlichen Menge an mikrodissektiertem Material und der Dicke der verwendeten Schnitte. Auch die unterschiedlichen Fixier- und Färbemethoden, die in den jeweiligen Experimenten verwendet wurden, beeinträchtigen in unterschiedlichem Maße die Qualität der DNA [197-199]. Bian *et al.* [200] analysierten die DNA-Methylierung von p16 in mikrodissektiertem Material und fanden, dass 1 ng DNA für eine semiquantitative Analyse ausreicht. 1ng entspricht einem Äquivalent von ca. 150 intakten, diploiden Zellkernen. Millar *et al.* [201] analysierten 100 bis 200 mikrodissektierte Zellen. Dabei ergab die Klonsequenzierung der Proben, dass häufig nur ein bis zwei Kopien des Genoms für die Analyse zur Verfügung standen. Die Ursache für dieses Ergebnis führten sie auf die Degradierung der DNA während der Bisulfitkonvertierung zurück.

Die Erkenntnisse bereits publizierter Mikrodissektionstudien wurden im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt. Unter anderem wurde aus diesen Gründen für die Etablierung der Multiplex PCR´s 1ng Ausgangstemplat verwendet und die mikrodessektierte Proben DNA mit einer sensitiven Real-Time PCR [179] quantifiziert (Abbildung 9). Zusätzlich wurde ein für mikrodissektierte Proben etabliertes Protokoll zur Bisulfitkonvertierung verwendet.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die verwendete Methode zur parallelen Analyse und Charakterisierung der DNA-Methylierung von 9 Biomarkern in mikrodissektierten Proben von 23 Brustkrebspatientinnen eingesetzt werden kann (Kapitel 3.1). Auch wurde die Nutzbarkeit zur simultanen Analyse der DNA-Methylierung eines Gens an bis zu 7 verschiedenen Regionen von SEPT9 in mikrodissektierten Proben gezeigt (Kapitel 3.2). Es wurden jeweils zirka 1000 Zellen aus 10 µm Hämatoxylin-gefärbten „fresh frozer“ Dünnschnitten mikrodissektiert. Dietrich *et al.* [179] zeigten, dass diese Art der Vorgehensweise sogar bis zu einer Templatmenge von 50 diploiden, intakten Zellkernen auf Hämatoxylin-gefärbten FFPET möglich ist.

### 4.3. Heterogenität innerhalb von mikrodissektierten Arealen gleichen Zelltyps

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Mikrodissektionsstudien fällt die uneinheitliche Methylierung innerhalb einzelner mikrodissektierter Areale auf. Wären alle Krebszellen eines mikrodissektierten Bereichs für einen Biomarker einheitlich methyliert, dann würden theoretisch bei stabiler Vererbung nur Methylierungswerte von 0 % (kein Allel methyliert), 50 % (ein Allel methyliert) und 100 % (beide Allele methyliert) möglich sein. Dies konnte jedoch überwiegend nicht beobachtet werden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse (Kapitel 3.1) besitzen die einzelnen Proben für die untersuchten Regionen eine relativ heterogene DNA-Methylierung.

Der Grund für diese Messergebnisse kann unterschiedlichen Ursprungs sein. Eine mögliche Erklärung wäre, dass das DNA-Methylierungsmuster bei den sich schnell teilenden Zellen nicht stets stabil vererbt wird. Desweiteren könnten die quantifizierten DNA-Methylierungswerte der mikrodissektierten Zellen ein möglicher Hinweis darauf sein, dass die Tumorzellen nicht alle klonalen Ursprungs sind, sondern von verschiedenen Zellen abstammen. Eine andere mögliche Erklärung basiert auf der Annahme, dass die Tumorzellen zwar von der gleichen Zelle abstammen, jedoch einen unterschiedlichen Grad der Differenzierung aufweisen, der sich unter anderem in der unterschiedlichen DNA-Methylierung zeigt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode zur DNA-Methylierungsanalyse von mikrodissektierten Zellen könnte ein geeignetes Werkzeug zur weiteren Untersuchung dieser Fragestellung darstellen.

Um die Klonalität der Tumorzellen in den mikrodissektierten Zellen analysieren zu können, könnte man die in dieser Arbeit verwendete Technologie durch PCR Amplifikate erweitern, die sowohl *Short Tandem Repeats*, als auch CpG Positionen enthalten, welche im X-Chromosom gelegen sind [202]. Wäre dann in den mikrodissektierten Proben stets dasselbe X-Chromosom inaktiviert, könnte dies auf einen klonalen Ursprung der mikrodissektierten Proben hinweisen.

#### 4.3.1. Mikrodissektionsstudie Brustkrebsbiomarker

Für ein besseres Verständnis der DNA-Methylierung der Biomarker PITX2, SFRP1, APC, BMP4, TFF1, RASSF1A, NR5A1, PLA1 und C20Orf55 wurde eine Mikrodissektionsstudie durchgeführt. Von 23 Patientinnen wurden die im Tumor vorkommenden Epithel- und Stromazellen isoliert und analysiert. Die Ergebnisse der Studie sollten unter anderem dazu beitragen Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob die heterogene Zellzusammensetzung eines

Tumors einen Einfluss auf das Ergebnis eines möglichen medizinischen Tests basierend auf der DNA-Methylierung haben könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde neben der DNA-Methylierung für PITX2 auch die Expression der PITX2 Transkripte A und B in mikrodisezierten Epithel- und Stromazellen der Brustkrebstumore untersucht. Die Ergebnisse in Kapitel 3.1.5, Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen unter anderem die Ergebnisse der Expression für die beiden Transkripte PITX2 A und B in mikrodisezierten Tumorepithel- und Stromazellen.

Für das PITX2 Gen sind drei verschiedene Transkripte bekannt, welche die Proteine PITX2A, B und C kodieren [150, 151]. Das Gen besitzt zwei alternative Promotoren P1 und P2 [152, 153]. Der Promotor P2 reguliert die Transkription der mRNA Varianten der Proteine A und B. PITX2A und B unterscheiden sich durch alternatives Spleißen in der Aminosäuresequenz in Exon 3 [150]. Der Promotor P1 reguliert die dritte Transkriptvariante PITX2C [153]. Der P2 Promotor steht unter der Kontrolle des Wnt-Signalweges [152]. Mitglieder der TGF $\beta$  Familie scheinen den P1 Promotor zu regulieren [153, 154]. Nimmrich *et al.* [180] untersuchten die DNA-Methylierung und Expression von PITX2 in 32 Brustkrebszelllinien. Sie fanden, dass 11 von 32 (43%) der untersuchten Zelllinien PITX2A und 13 (40%) PITX2B exprimierten. Dabei waren bei der überwiegenden Zahl der Zelllinien PITX2A und B koexprimiert [180]. Dieses Ergebnis stimmt mit der Annahme überein, dass beide Transkripte von dem PITX2 P2 Promotor reguliert werden. Der Vergleich der DNA-Methylierung mit der Expression von PITX2 zeigte einen inversen Zusammenhang in einer großen Anzahl der untersuchten Zelllinien [180].

Die Ergebnisse der Mikrodisektionsstudie in Kapitel 3.1.5 zeigen im Vergleich zu den Zelllinienexperimenten von Nimmrich *et al.* [180] deutlich weniger Expression der Transkripte PITX2A und B in Epithelzellen aus „echten“ Tumorproben. Für die untersuchte Region 1, welche sich im P2 Promoter von *PITX2* befindet, lässt sich eine inverse Korrelation der DNA-Methylierung zu den Transkripten PITX2A und B erkennen. Für die Regionen 2 und 3 ist dies nicht der Fall. Dies ist auch nicht notwendigerweise zu erwarten, da sich diese Regionen nicht im Promotorbereich der PITX2A und B Transkripte befinden.

Das Amplifikat für die Bisulfit-Sequenzierung der PITX2 Region 1 beinhaltet unter anderem die gleichen CpGs der QM Region, anhand derer die Patientinnenauswahl für die Tumorproben stattgefunden hat (Kapitel 3.1.2). Abbildung 11 auf Seite 45 zeigt die mit PITX2 QM gemessenen DNA-Methylierungswerte auf den makroskopischen Tumorproben und die korrespondierenden, durch Bisulfit-Sequenzierung gemessenen PITX2 DNA-Methylierungswerte in den Epithelzellen des Tumors. Insgesamt führen die unterschiedlichen Methoden zur Quantifizierung der DNA-Methylierung (QM und Bisulfit-Sequenzierung) in den meisten Fällen zu eindeutig vergleichbare Messergebnissen. Wesentliche und essentielle Unterschiede in der DNA-Methylierung der Epithelzellen und des heterogenen Tumors sind

in der Gruppe mit fünf Patientinnen beinhaltet, welche in den heterogenen Tumorproben trotz Rückfalls der Brustkrebskrankung niedrige PITX2 DNA-Methylierung (QM) zeigten (Seite 45, Abbildung 11 Gruppe C). Die Isolierung der Epithelzellen führt in diesen Fällen zu einer Verbesserung der prognostischen Aussagekraft von PITX2.

Die Stromazellen der untersuchten Tumore zeigten im Vergleich zu den Epithelzellen eine deutlich niedrigere DNA-Methylierung in den analysierten PITX2 Regionen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Dietrich *et al.* [179, 203] überein.

Eine eindeutige biologische Funktion von PITX2 in der Tumorgenese ist derzeit nicht bekannt. Nimmrich *et al.* [180] fanden, dass größere Hormon Rezeptor-positive Brusttumore in der die regulatorische Region PITX2 P2 Methylierung zeigten. Sie vermuten, dass diese Tumore schneller wachsen und „aggressiver“ sind, als Tumore in denen die PITX2 P2 Region hypomethyliert ist.

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, sind auch SFRP1, APC und BMP4 im Wnt-Signaltransduktionsweg involviert. NR5A1 steht mit PITX2 in direkter Interaktion. Die Ergebnisse in Abbildung 14 (Seite 51) zeigen, dass viele der untersuchten Epithelzellen in Regionen dieser Gene sehr ähnliche DNA-Methylierung besitzen. Eine Analyse der DNA-Methylierung von direkt interagierenden oder im gleichen Signaltransduktionsweg involvierten Genen mit bereits bekannten Biomarkern kann folglich eine mögliche Strategie zur Findung neuer DNA-Methylierungsmarker sein.

Die Ergebnisse dieser Mikrodisektionsstudie zeigen für einige der untersuchten Proben deutliche Hypermethylierung von SFRP1. Eine signifikante prognostische Aussage anhand der DNA-Methylierung von SFRP1 zwischen den Patientinnen, die keinen oder einen Rückfall der Brustkrebskrankung erlitten haben, ist anhand der Probenzusammenstellung dieser Mikrodisektionsstudie nicht möglich. Da die Patientinnenproben nach bestimmten Kriterien der DNA-Methylierung von PITX2 ausgewählt wurden, und sich die überwiegende Anzahl der untersuchten Proben in der DNA-Methylierung von PITX2 und SFRP1 ähneln, ist die fehlende prognostische Aussagekraft von SFRP1 aufgrund der in dieser Arbeit untersuchten Anzahl und Art von Proben zu erwarten. Desweiteren zeigt die DNA-Methylierung von SFRP1 in den mikrodisektierten Proben keine Abhängigkeit vom Tumor-Stadium.

Veeck *et al.* [204] zeigten jedoch, dass die DNA-Methylierung des Promotors von SFRP1 signifikant mit einer verkürzten Überlebenserwartung der Patientinnen assoziiert war, was das SFRP1-Molekül als einen potentiellen, prognostischen Biomarker des Mammakarzinoms klassifiziert. Klopocki *et al.* [146] zeigten mit einem SFRP1-spezifischen Antikörper, dass das SFRP1 Protein in mehr als 80% aller Mammakarzinome komplett oder fast vollständig verloren geht. Sie fanden, dass der Verlust von SFRP1 schon früh in der Tumorgenese des Mammakarzinoms auftritt. Gewebe von Patientinnen mit *duktalen carcinoma in situ* (DCIS) zeigten bereits ähnlich hohe Verlustraten für SFRP1 wie beim invasiv duktalen

Mammakarzinom (IDC). SFRP1 scheint in den frühen Mammakarzinomen T1-Tumore (d.h. bis zwei Zentimeter Durchmesser), noch eine protektive Wirkung zu haben. Unter den in dieser Studie untersuchten 310 Patientinnen mit T1 Tumoren hatten jene mit persistierender SFRP1 Expression eine deutlich bessere Prognose als solche Patientinnen mit einem Verlust des SFRP1 [146]. Eine stabile epigenetische Veränderung des SFRP1-Promoters war in den Tumorgeweben von 61% aller untersuchten Brustkrebs-Patientinnen zu finden und war nachweislich für den Transkriptionsverlust von SFRP1 verantwortlich.

Bei NR5A1 und BMP4 handelt es sich um Gene, die in Verbindung zum PITX2 Signaltransduktionsweg stehen. Interessanterweise ist die DNA-Methylierung der untersuchten Region von BMP4 in Epithelzellen in der Gruppe derer, die keinen Rückfall einer Brustkrebserkrankung erlitten haben, fast nahezu invers zu der DNA-Methylierung der PITX2 Region 1 (Abbildung 14 Seite 51). In der Gruppe der Patientinnen, die einen Rückfall erlitten, zeigt BMP4 dagegen für die untersuchten Proben ein ähnliches DNA-Methylierungsmuster wie die PITX2 Region 1. Die Tatsache, dass es sich bei BMP4 um ein *target* des Wnt-Signalweges [205, 206] handelt und PITX2 ein Repressor von BMP4 ist [207], könnte ein möglicher Ansatz zur Klärung des inversen DNA-Methylierungsmusters in der Gruppe der Rückfallpatientinnen sein. Um dies zu klären, müssten jedoch weitere Experimente durchgeführt werden, die unter anderem die Korrelation der DNA-Methylierung von PITX2 und BMP4 mit der Repression von PITX2 in dieser Patientinnggruppe untersuchen. NR5A1 gehört ebenso wie der Östrogenrezeptor zur Familie der Nuklearezeptoren. Der Ligand von NR5A1 ist noch nicht bekannt. Das untersuchte Amplifikat von NR5A1 zeigt keine erkennbare Auffälligkeiten in der DNA-Methylierung der untersuchten Patientinnenproben, obwohl NR5A1 wie PITX2 an der Entwicklung der Hypophyse beteiligt ist [208, 209] und synergistisch mit PITX2 bei der Transkription vieler Gene in der Hypophyse agiert [210].

Bis auf drei Patientinnenproben ist die untersuchte Region für C20orf55 in den Epithelzellen hypermethyliert. C20orf55 gehört zu der FAM110 Proteinfamilie und wurde in einem genomweiten DNA-Methylierungsexperiment zur Identifizierung differentieller DNA-Methylierung in Brustkrebs identifiziert [211]. Mitglieder dieser Proteinfamilie sind an den Zentromeren und Spindelpolen der Chromosomen lokalisiert, was ein möglicher Hinweis auf die Rolle dieser Gene in der Tumorphagenese sein könnte [212]. Hartmann *et al.* [211] fanden erstmals Hinweise für die prognostische Eigenschaften der DNA-Methylierung der Gene C20orf55, NR5A1 und BMP4 in Lymphknoten-positiven, Östrogen Rezeptor-positiven, adjuvant mit Anthrazyklin behandelten Brusttumoren. Die DNA-Methylierung von BMP4 und C20orf55 ermöglicht zusammen mit FGF4 und PITX2 in einem Vier *marker panel* eine bessere prognostische Aussage als die DNA-Methylierung von PITX2 alleine [211]. Ein

anderes Markerpanel, bestehend aus C20orf55, NR5A1 und BMP4, zeigt in den Proben der Mikrodisektionsstudie keine signifikanten prognostischen Eigenschaften. Aufgrund der Vorauswahl der Proben, basierend auf PITX2 (Kapitel 3.1.2) sowie der Tatsache, dass es sich nicht um die gleiche Patientenpopulation wie bei Hartmann *et al.* [211] handelt, war dies zu erwarten.

RASSF1A ist vermutlich eines der am häufigsten untersuchten Gene hinsichtlich von DNA-Methylierung in allen Formen von Krebs, insbesondere in Brustkrebs. Die meisten Studien zeigen übereinstimmend, dass dieses Gen in einem hohen Anteil der Tumoren methyliert ist und somit wahrscheinlich einen diagnostischen Marker darstellt. Pfeifer *et al.* [213] fanden, dass RASSF1A bereits in den als Krebsvorstufe angenommenen Hyperplasien verbreitet methyliert ist. Dass die DNA-Methylierung von RASSF1A in einem hohen Anteil der Tumoren methyliert ist, findet sich auch in den Ergebnissen der DNA-Methylierungsanalyse dieser Arbeit (Abbildung 14; Seite 51). Bis auf fünf der 23 untersuchten Epithelzellen weisen alle untersuchten Proben Hypermethylierung von RASFF1A auf.

Im direkten Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Genen, zeigt die Region von PLAU in den mikrodisektierten Epithelzellen der Tumorproben insgesamt deutlich geringere prozentuale DNA-Methylierung. PLAU (Plasminogenaktivator vom Typ Urokinase) spielt bei der Invasion von Tumorzellen in benachbarte Gewebe eine wichtige Rolle. Dabei ist die Degradierung der extrazellulären Matrix (ECM) ein wesentlicher Schritt. Die extrazelluläre Matrix stellt eine physische Barriere für die Invasion und Migration von Tumorzellen dar, und wird durch eine Vielzahl von Proteasen degradiert, welche vom Tumor exprimiert werden. Eine dieser Proteasen ist PLAU, 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 [214]. Zusätzlich wirkt Plasmin bei der Aktivierung weiterer inaktiver Proteasen wie zum Beispiel Matrixmetalloproteasen (MMPs) mit, wodurch die invasive Progression des Tumors weiter unterstützt wird [215]. Neben der Aktivierung von Plasminogen ist PLAU selbst in der Lage Wachstumsfaktoren zu aktivieren, welche wiederum eine wichtige Rolle in der Angiogenese haben [214, 216, 217]. Pulukuri *et al.* [218] zeigten, dass in Prostatatumoren die Überexpression von PLAU mit der Demethylierung des Promotors korreliert. Bei den in der Mikrodisektionsstudie untersuchten Proben handelt es sich um invasive Tumore. Die relativ niedrige DNA-Methylierung von PLAU könnte einen möglichen Hinweis auf die invasiven Eigenschaften dieser Tumorzellen sein.

Die DNA-Methylierung von TFF1 zeigt gegenüber den anderen untersuchten Biomarkern deutlich höhere DNA-Methylierung in den Stromazellen (Abbildung 14; Seite 51). Die

differentielle DNA-Methylierung zwischen den einzelnen Proben ist jedoch auch bei diesem Gen in den Epithelzellen zu finden. Dietrich *et al.* [179, 203] beschrieben bereits, dass sich die DNA-Methylierung von TFF1 nahezu invers zu der DNA-Methylierung von PITX2 in Brusttumoren verhält. Dieses Ergebnis ist bei Betrachtung der DNA-Methylierung der in dieser Arbeit untersuchten Proben ebenfalls erkennbar.

Bei TFF1 (*Trefoil Factor 1*) handelt es sich um ein Protein, dessen Expression direkt durch Östrogen induziert wird [219] und die Migration von Zellen stimuliert [220, 221]. In Hormonrezeptor-positiven Tumoren ist fehlende TFF1 Expression mit einer geringeren Sensitivität gegenüber Hormonen und einer erhöhten Proliferation der Tumore verbunden [160]. Die Expression von TFF1 scheint sowohl ein prognostischer als auch ein prädiktiver Marker für eine antihormonelle Therapie bei Brustkrebs zu sein [161-163].

Die Ergebnisse dieser Mikrodisektionsstudie verdeutlichen, dass es trotz der Analyse von relativ homogenen Zellpopulationen innerhalb eines Tumors und zum Teil miteinander im gleichen Signalweg involvierten Biomarkern zu individuellen DNA-Methylierungsmustern bei verschiedenen Patientinnen und in den verschiedenen untersuchten Regionen kommen kann. Dies deutet darauf hin, dass in den Tumorzellen unterschiedliche Mechanismen Einfluss auf die DNA-Methylierung einer Region haben können. Experimente die zur Aufklärung eines „Gesamtbildes“ der biologischen Eigenschaften eines Tumors beitragen, helfen diese zum Teil individuellen DNA-Methylierungsprofile von Tumoren verschiedener Patientinnen besser zu verstehen. Dieses Wissen könnte dazu beitragen, die in dieser Arbeit untersuchten Gruppen weiter zu unterteilen, was zum Beispiel die prognostische Aussagekraft von Biomarkern verbessern könnte.

### 4.3.2. Mikrodisektionsstudie Darmkrebsbiomarker

Im Rahmen dieser Mikrodisektionsstudie wurde die DNA-Methylierung der Biomarker SEPT9, VIM, RASSF2, ALX4, SFRP1, APC und TFF1 in mikrodisektierten Stroma und Epithelzellen von drei Darmkrebspatienten mit unterschiedlichem T-Stadium untersucht.

Das Amplifikat der Septin 9 Region 5 beinhaltet die CpGs, auf denen die diagnostische Eigenschaft für Darmkrebs beruht. Alle aus dem Tumor mikrodisektierten Proben besitzen in dieser Region eindeutige Hypermethylierung. Interessanterweise ist für diese Region bereits in den an den Tumor angrenzenden Epithelzellen ein gewisser Grad an DNA-Methylierung vorhanden. Dies könnte auf einen möglichen Feldeffekt schließen lassen (Kapitel 1.2.1). Um das Vorhandensein eines möglichen Feldeffektes jedoch tatsächlich bestätigen zu können, müsste zum Beispiel die DNA-Methylierung der Septin 9 Region 5 in Darmkrebsepithelzellen aus „gesunden“ Patienten gemessen werden. Wären diese Region

in diesen Zellen eindeutig hypomethyliert, so könnte sich der Verdacht erhärten, dass die DNA-Methylierung in dieser Region ein relativ frühes Ereignis in der Tumorentstehung von Darmkrebs ist. Da geeignetes Probenmaterial schwer zu erhalten ist, soll diese Frage unter anderem in einer der in dieser Arbeit anschließenden Mikrodisektionsstudie beantwortet werden.

Für Septin 9 wurden bislang 7 Transkripte identifiziert, die fünf verschiedene Isoformen kodieren (SEPT9\_v1 bis SEPT9\_v5) [190]. Differentielle Expression der Septin 9 Transkripte wurden in verschiedenen Tumorzellen identifiziert, zum Beispiel in Ovarien und Prostatakrebszellen [222]. Scott *et al.* [190] zeigten in einer Studie anhand von insgesamt über 7000 normalen und Tumorproben, sowie an 292 humanen Zelllinien, dass eine Überexpression der Septin 9 Isoformen in einer großen Varianz in den verschiedenen untersuchten Tumorproben auftritt. Das in verschiedenen Geweben und Tumoren eine hohe Varianz der Septin 9 Isoformen zu finden ist, ist ein Grund, warum ein direkter Vergleich mit den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Expressionsdaten der Transkriptvarianten von Septin 9 mit Literaturergebnissen nur bedingt möglich ist. Es scheint für den Vergleich der Expression entscheidend zu sein, aus welchem Tumor und Gewebe die jeweiligen publizierten Ergebnisse basieren.

Gonzales *et al.* [193] untersuchten die Expression der Septin 9 Transkripte in Brustkrebszelllinien und primären Brustkrebszellen. Sie zeigten, dass die veränderte Expression der Septin 9 Transkripte zu proonkogenische Phänotypen einhergeht. Insbesondere eine erhöhte Expression des SEPT9\_v1 Transkripts, führt zu verstärkter Zellproliferation, Invasivität, Zell-Motilität und Aneuploidie der untersuchten Zellen. Die Überexpression von SEPT9\_v1 verändert die Morphologie der Zellen und führt zu einer Transition von Epithel- zu Mesenchymalzellen. Diese Veränderung gilt als wesentlich bei der Entstehung von Epitheltumoren. Die in dieser Arbeit durchgeführte Expressionsanalysen der mikrodisektierten Proben aus Darmtumoren zeigen jedoch keine erhöhte Expression des SEPT9\_v1 Transkripts, weder in den untersuchten Epithel- noch in den Stromazellen (Abbildung 21). In mikrodisektierten Epithelzellen aus Ovarientumoren fanden Scott *et al.* [191], zusätzlich zu einer erhöhten Expression des SEPT9\_v1 Transkriptes, eine deutlich erhöhte Expression von SEPT9\_v4\*. McDade *et al.* [223] zeigten, dass die beiden Transkriptvarianten SEPT9\_v4 und SEPT9\_v4\* (Abbildung 21 D; Seite 63) in Ovarientumoren exprimiert werden. Dabei ist das SEPT9\_v4\* deutlich stärker exprimiert als das SEPT9\_v4 Transkript. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen für alle der drei untersuchten Patienten im Vergleich zu den anderen Transkriptvarianten eine deutlich erhöhte Expression des SEPT9\_v4 Transkripts in den Epithelzellen der Darmtumore. Die Tumorepithelzellen des Patienten 2 zeigen erhöhte Expression des SEPT9\_v4\* Transkripts. Dabei ist auch in diesem Fall das SEPT9\_v4\* gegenüber dem SEPT9\_v4 Transkript deutlich stärker exprimiert. Interessanterweise ist bei den Patienten 1 und 3, bei denen das SEPT9\_v2 Transkript in den

Tumorepithelzellen überexprimiert ist, keine erhöhte Expression des SEPT9\_v4\* vorhanden. Einen direkten Zusammenhang der DNA-Methylierung der untersuchten Regionen von Septin 9 auf die Transkripte konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Burrows *et al.* [222] zeigten zwar, dass die Behandlung einer Zelllinie bei der das SEPT9\_v4 Transkript reprimiert wird, durch die Behandlung mit 5-Azacytidin wieder exprimiert wird. Ein solches Ergebnis ist jedoch nur bedingt aussagekräftig, da eine Behandlung mit 5-Azacytidin eine globale Veränderung der DNA-Methylierung in den Zellen verursacht. Ob die DNA-Methylierung einer spezifischen Region von Septin 9 für die Regulation der Expression des v4 Transkriptes verantwortlich ist, müsste noch im Detail untersucht werden.

Berücksichtigt man bei der Betrachtung der Ergebnisse in Abbildung 20 das Tumorstadium der untersuchten Patientenproben, so fällt auf, dass die Region 4 von Septin 9 nur in der Patientenprobe der mikrodisezierten Epithelzellen mit T3 Stadium hypermethyliert ist. Dagegen zeigt die Region 5 in allen Epithelzellen von T1 bis T3 Stadium Hypermethylierung. Wie erwähnt handelt es sich bei der Region 5 um einen Bereich von Septin 9, in dem Grützmann *et al.* [189] zeigten, dass die DNA-Methylierung in Blutplasma eine minimal invasive Methode ist um Darmtumore zu detektieren. Dass die Hypermethylierung in dieser Region schon in Tumoren mit T1 Stadium vorhanden ist, scheint ein wesentlicher Grund für die diagnostischen Eigenschaften des Septin 9 Biomarkers sein.

Vimentin wird als ein diagnostischer DNA-Methylierungsmarker für Darmkrebs in der Literatur beschrieben [194]. Des Weiteren kann Vimentin als cytoskeletaler Proteinmarker von Mesenchymalzellen, die eine erhöhte Mobilität und Intensivität aufweisen, verwendet werden [224]. Die DNA-Methylierung der Vimentin Region (Abbildung 23; Seite 65) zeigt in den untersuchten Proben ähnliche DNA-Methylierung wie die Septin 9 Region 5. Jedoch sind die Epithelzellen der Tumorprobe mit T1 Stadium deutlich niedriger methyliert.

Gonzales *et al.* [193] beschreibt die Interaktion von Septin 9 und Vimentin in Brustkrebszellen. Dieses Ergebnis ist ein weiteres mögliches Beispiel dafür, dass Gene, die miteinander in einem biologischen Verhältnis innerhalb der Zelle stehen, ähnliche DNA-Methylierungsmuster in verschiedenen Zelltypen besitzen können.

Die Ergebnisse der DNA-Methylierungsanalysen für SFRP1 zeigen sowohl in allen Tumorepithelzellen als auch in den zum Tumor benachbarten Epithelzellen Hypermethylierung, unabhängig vom Tumorstadium. Unter Berücksichtigung, dass der Verlust der Proteinexpression von SFRPs aufgrund von epigenetischen Mechanismen schon während früher Phasen der Kolonkrebsentstehung stattfindet, könnte dieses Ergebnis auf einen möglichen Feldeffekt der am Tumor benachbarten Epithelzellen hinweisen. Somit wäre der Biomarker SFRP1 möglicherweise dazu geeignet, phänotypisch normale Zellen von bereits entarteten Zellen zu unterscheiden. Um diese Schlussfolgerung jedoch tatsächlich schliessen zu können, müssten zunächst die DNA-Methylierung aus „echten“ normalen

Darmepithelzellen untersucht werden. Auch diese Frage soll in einer der in dieser Arbeit anschließenden Mikrodissektionsstudie beantwortet werden.

### **4.4. DNA-Methylierungsanalyse von potentiellen prognostischen Brustkrebsmarkern**

#### **4.4.1. Methode zur DNA-Methylierungsanalyse potentieller prognostischer Brustkrebsmarker**

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Analyse von DNA-Methylierung ist die quantitative Sequenzierung von PCR Produkten nach Amplifikation von bisulfitkonvertierter DNA. Die direkte Bisulfit-Sequenzierung erlaubt die parallele Analyse einer großen Anzahl von CpG's in verschiedenen Proben zur gleichen Zeit. Für die Studie zur Entdeckung neuer prognostischer Brustkrebsmarker wurden modifizierte Primer für die Bisulfit-Sequenzierung verwendet (Kapitel 1.6.4). Das Einfügen von Cytosinen mittels Domänenprimern ermöglicht die interne Normalisierung für die Quantifizierung der DNA-Methylierung. Die Ergebnisse für die in Kapitel 3.3 verwendeten Sequenziermethoden sind zunächst normalisierte Intensitäten (Peakhöhen oder Peakflächen). Für die Identifizierung von prognostischen Brustkrebs-Biomarkern unter der in Kapitel 3.3 dargestellten, klinischen Fragestellung konnten bereits die normalisierten Intensitäten als Messwert verwendet werden, um auf technischer Seite festzustellen, ob ein potentieller Biomarker in der Lage ist zwischen zwei Gruppen (z.B. Patientinnen mit guter und mit schlechter Prognose) zu unterscheiden. Für die Auswertung der Rohdaten wird keine Software zur Ermittlung der DNA-Methylierung benötigt, die ermittelten Daten lassen sich mit gängigen Tabellenkalkulationsprogrammen auswerten. Dieses Vorgehen ermöglicht die DNA-Methylierungsanalyse von vielen Regionen auf einer großen Anzahl von Proben. Für die biologische Aussage über die DNA-Methylierung eines Biomarkers ist die Bestimmung eines prozentualen Methylierungswertes von Vorteil. Eine relativ gute Abschätzung der prozentualen DNA-Methylierung kann bereits getroffen werden, indem die Intensitäten an der entsprechenden CpG Position mit der Intensität des Normalisierungssignals, welches 100 % Methylierung entspricht, ins Verhältnis gesetzt werden. Da sich die maximale Sequenzierintensität (100% methylierte DNA) für die einzelnen C-Signale innerhalb eines Amplifikates unterscheiden kann, wenn diese auf unterschiedlichen Platten sequenziert werden, ist es allerdings Voraussetzung, dass sich die 100% methylierte DNA auf der gleichen Platte befindet, auf der sich auch die zu messenden Proben für das jeweilige Amplifikat befinden. Für den Vergleich zweier oder mehrerer Biomarker ist die Kenntnis über den Unterschied in der DNA-Methylierung der jeweiligen Gruppen notwendig (Effektgröße). Biomarker, bei denen die Differenz in der DNA-Methylierung zwischen den untersuchten Patientengruppen größer ist, sind sehr

wahrscheinlich geeigneter als Biomarker mit geringerer Effektgröße. Insbesondere wenn sich die DNA-Methylierungsunterschiede in einem Bereich befinden, der nur erschwert methodisch auflösbar ist. Bei der Selektion der 202 Markerkandidaten wurden deshalb Amplifikate nicht weiter untersucht, die auf den ersten Proben nur Unterschiede auf sehr geringen oder sehr hohem DNA-Methylierungsniveau zeigten (unter 10% oder über 75 %).

### 4.4.2. CDO1 als prognostischer DNA-Methylierungsmarker für Brustkrebs

Die adjuvante Chemotherapie wird nach heutigen Richtlinien für die Mehrheit der Patientinnen mit primärem Brustkrebs eingesetzt [225]. Die Anthrazyklin basierte, adjuvante Chemotherapie bei Lymphknoten-positiven Brustkrebs ist in den 90'er Jahren zur Standardbehandlung geworden [226]. Verschiedene Studien zeigen, dass die Kombination von Anthrazyklinen und Taxanen, oder die Verkürzung der Behandlungsintervalle mit sukzessiven Dosen von gängigen Chemotherapeutika („*Dose-Dense-Therapie*“), zu einem besseren Ergebnis bei der Therapie von Lymphknoten-positiven Brusttumoren führt [227]. Es profitieren jedoch nicht alle Patientinnen von diesen aggressiveren Therapieformen. Brustkrebspatientinnen mit einer guten Prognose, oder Patientinnen mit Tumoren, die nicht für diese Art der Chemotherapie sensitiv sind, wären unnötigerweise den stärkeren Nebenwirkungen der Therapie ausgesetzt. Die Identifizierung von DNA-Methylierungsmarkern, die verwendet werden können um den Ausgang einer Brustkrebserkrankung oder das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorauszusagen, stellen somit ein wichtiges medizinisches Werkzeug dar. Ein Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung solcher potentiellen Marker.

Die Auswahl der Markerkandidaten basierte auf einer Literaturrecherche und auf Kandidaten, die durch eine genomweite DNA-Methylierungsanalyse (DMH = *differential methylation hybridization* [173]) als Biomarker-Kandidaten in Brusttumorproben identifiziert wurden. Die untersuchten, auf einer Literaturrecherche basierten Gene stehen im Zusammenhang mit bereits bekannten Biomarkern für Brustkrebs, oder sind in der Tumorgenese involviert.

Für die Identifizierung von prognostischen Biomarkern für Brustkrebs wurde die DNA-Methylierung von 202 unterschiedlichen Regionen in Tumoren von Anthrazyklin behandelten, Östrogen Rezeptor-positiven, Lymphknoten-positiven HER-2-negativen Brustkrebspatientinnen untersucht. Diese Tumorcharakteristika stellen eine Subgruppe bei Brustkrebspatientinnen dar, für die standardisierte Behandlungsrichtlinien existieren [225, 228]. Außer der Tatsache, dass es sich um Lymphknoten-positive Brustkrebspatientinnen handelt, besitzt diese Subpopulation aufgrund des positiven Steroidhormonrezeptor-Status und das Fehlen einer HER-2 neu Amplifikation eine relative gute Prognose. Es sollten potentielle Biomarker identifiziert werden, die es ermöglichen diese Subpopulation weiter zu

stratifizieren, so dass die Gruppe mit guter Prognose genauer definiert werden kann. Patientinnen in der Gruppe mit guter Prognose könnten von einer konventionellen, Anthrazyklin basierten Therapie profitieren, und der Einsatz von aggressiveren Therapieformen eventuell vermieden werden.

Die schrittweise Selektionsstrategie zur Identifizierung potentieller Marker wurde in dieser Arbeit erfolgreich angewendet und resultiert in einem Marker. Das angewandte Vorgehen ist relativ kostengünstig und ermöglicht eine groß angelegte Analyse von vielen Genen. In einem ersten Selektionsschritt wurden nur insgesamt 12 Tumorproben untersucht (Tumorproben von 6 Brustkrebspatientinnen mit Rückfall einer Brustkrebserkrankung, 6 Brustkrebspatientinnen ohne Rückfall). In diesem Schritt wurden die Kandidatengene von den weiteren Experimenten ausgeschlossen, welche keine differentielle Methylierung zwischen den beiden untersuchten Patientinnengruppen zeigten. Die übriggebliebenen Regionen (n=37) wurden in einer Trainingspopulation untersucht. Anschließend wurde die Leistung des Markers mit dem besten Ergebnis in einer unabhängigen Testgruppe analysiert. Diese Vorgehensweise führte zur Identifikation der DNA-Methylierung der Promoterregion für das Gen Cysteindioxygenase 1 (CDO1) als potentiell prognostischen Biomarker in der untersuchten Patientengruppe. Um diese Schlussfolgerung für die reale Patientengruppe treffen zu können, müssten unter anderem weitere unabhängige Patientenpopulationen analysiert werden, wie zum Beispiel Patienten, die keine adjuvante Anthrazyklin basierte Chemotherapie erhalten haben. Aufgrund der Retro-Perspektiven Natur dieser Studie enthält die untersuchte Kohorte überwiegend Patientinnen, die nicht nach dem heutigen Standard behandelt wurden. Nur 59 der insgesamt 162 Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebspatientinnen erhielten eine zusätzliche adjuvante endokrine Therapie. Bei diesen Patientinnen wurde die Brustkrebserkrankung diagnostiziert bevor die adjuvante endokrine Therapie als Standardbehandlung bei steroid Hormonrezeptor-positiven Tumoren eingeführt wurde. Die DNA-Methylierung von CDO1 zeigt in der Kaplan-Maier-Analyse auch in dieser Subgruppe signifikante prognostische Eigenschaften ( $p=0,0001$ , Graph nicht gezeigt).

CDO1 wurde als potentieller Biomarkerkandidat in dieser Arbeit in die Liste der 202 zu untersuchenden Biomarkern aufgenommen, da diese Region bereits in einer DMH Studie differentielle DNA-Methylierung gezeigt hatte. In dem zugrundeliegenden DMH Experiment wurden Tumore von Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs untersucht, die mit einer FAC Chemotherapieschema (FAC = fluorouracil, adriamycin, cytoxan) behandelt wurden (A. Fassbender, Daten nicht publiziert).

Das CDO1 Protein ist ein Enzym, das die Konversion von L-Cystein zu Cysteinsulfinsäure katalysiert - ein regulierender Schritt in der Sulfat Produktion. CDO1 ist einer der Schlüsselenzyme in der Taurin Biosynthese [229]. Taurin ist ein Inhibitor der Apoptose [230-233]. Das humane CDO1 Gen befindet sich auf Chromosom 5q23.2 und ist homolog zu der

Cysteindioxygenase von Ratte und Maus. Oien *et al.* [234] zeigten, dass das murine CDO1 Protein der Maus aufgrund der Fähigkeit Cysteinreste zu oxidieren in der Proteinregulation und im antioxidativen Abwehrmechanismus der Zelle eine Rolle spielt. Staub *et al.* [235] gehen davon aus, dass die Deletion oder die epigenetische Inaktivierung dieser chromosomalen Region ein häufiger Mechanismus bei der Tumorentstehung von Darmkrebs ist. Eine erhöhte Expression von CDO1 wurde im Sézary- Syndrome gefunden, dabei handelt es sich um ein aggressives, kutanes T-Zell-Lymphom. Beim kutanen T-Zell-Lymphom werden bestimmte Zellen des lymphatischen Systems (die sogenannten T-Lymphozyten) zu „böartigen“ Krebszellen und befallen die Haut. Erhöhte Expression der Cysteindioxygenase wurde in ductalen Zellen von schwangeren Ratten gefunden, aber nicht in anderen Brustepithelzellen oder in ductalen Zellen von nicht schwangeren Ratten [236]. Eine differenzielle DNA-Methylierung von CDO1 in Brustkrebs, wie in dieser Arbeit gefunden, wurde bis jetzt noch nicht in der Literatur beschrieben. Interessanterweise fanden Namba *et al.* [237], dass die Repression von *Cdo1* abhängig von einer malignen Transition von Brustepithel Neoplasien zu Tumoren in einem Maus Model für ductale Karzinome in situ ist. Ob die Repression durch DNA-Methylierung verursacht wird, wurde in der Studie von Namba *et al.* nicht untersucht.

CDO1 könnte als potentieller prognostischer DNA-Methylierungs Biomarker in der Therapie von Brustkrebspatientinnen eine Rolle spielen: Für die mit einer adjuvanten endokrinen Therapie behandelten Patientinnen mit einer guten Prognose durch CDO1 sind aggressive Therapieansätze möglicherweise vermeidbar. In diesen Fällen könnte eine Standard Anthrazyklin basierte Chemotherapie, gefolgt von einer adjuvanten endokrinen Behandlung die geeignetere Vorgehensweise sein. Für Patientinnen mit einer schlechten Prognose nach CDO1 DNA-Methylierung könnten andere adjuvante Chemotherapie Ansätze (wie z.B. die Zugabe von Taxanen) oder komplett Anthrazyklin freie Behandlungen von Erfolg sein. Ein Marker, der zur Entscheidungsfindung bezüglich einer adjuvanten Anthrazyklin Therapie verhelfen kann, ist von wachsender klinischer Bedeutung [238]. Topoisomerase IIa gilt als validierter Marker für die Identifizierung des Nutzens einer Anthrazyklin Behandlung, allerdings in Her2-neu positiven Tumoren [239]. Hartmann *et al.* [211] zeigten, dass ein DNA-Methylierungsmarkerpanel bestehend aus PITX2, BMP4, FGF4 und c20orf55 in einer Lymphknoten-positiven, Östrogen Rezeptor-positiven, Her2-neu negativen Population von 241 Brustkrebspatientinnen ein nützlicher klinischer Marker ist. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass die DNA-Methylierung von CDO1 als prognostischer Marker sehr vielversprechend ist, weitere Studien zur besseren Aufklärung der Sensitivität und Spezifität des CDO1 sind jedoch notwendig und scheinen durchaus lohnenswert.

### 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die DNA-Methylierung spielt eine wesentliche Rolle bei der Tumorgenese und besitzt somit ein großes Potential für die Verwendung als prognostischer oder diagnostischer Biomarker.

Der für Brustkrebs prognostische DNA-Methylierungsmarker PITX2 hat eine gewisse geringe Fehlerrate. In einer Mikrodisektionsstudie wurde gezeigt, in welchem Maße sich die DNA-Methylierung in heterogenen Proben von der in mikrodisektierten Epithel- und Stromazellen des Tumors unterscheidet, und dass die Analyse der Methylierung von PITX2 auf Tumorepithelzellen zu einer möglichen Verbesserung der prognostischen Aussagekraft des Biomarkers beitragen kann. Zusätzlich wurde ein Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und der Expression von PITX2 in den mikrodisektierten Proben gefunden. Im Bereich des Transkriptionsstartes unmethylierter Epithelzellen exprimierten die PITX2 Isoformen A und B. Durch multiplexierte PCR wurde in den mikrodisektierten Zellen neben der DNA-Methylierung von PITX2 auch die Methylierung von Regionen der Biomarker SFRP1, APC, BMP4, TFF1, RASSF1A, NR5A1, PLAU und C20Orf55 analysiert. In vielen Fällen ist die innerhalb mikrodisektierter Tumorareale gemessene DNA-Methylierung nicht homogen, ein Hinweis darauf, dass sich unmittelbar benachbarte Tumorzellen unterscheiden. In einer zweiten Mikrodisektionsstudie wurde die DNA-Methylierung der Biomarker SEPT9, VIM, RASSF2, ALX4, SFRP1, APC und TFF1 in Darmtumoren und tumorbenachbarten Epithel- und Stromazellen untersucht, für SEPT9 in 7 verschiedenen Regionen. Es konnte gezeigt werden, dass die Methylierung in den untersuchten Bereichen nicht homogen verteilt ist: CpG Inseln im intragenischen Bereich weisen im Vergleich zu CpG Inseln im Bereich des Transkriptionsstartes eine deutlich stärkere, differentielle Methylierung zwischen den Zelltypen auf. Ein direkter Zusammenhang der DNA-Methylierung und der Expression verschiedener Transkriptvarianten von SEPT9 wurde in den untersuchten Proben nicht gefunden. Die Identifizierung von prognostischen DNA-Methylierungsmarkern in Brusttumoren durch quantitative direkte Bisulfit-Sequenzierung mit modifizierten Sequenzier-Primern war ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Hierzu wurde eine Strategie angewandt, die eine effiziente Analyse von 202 potentiellen Markerkandidaten auf insgesamt 162 Tumorproben in einer Trainings- und einer Teststudie erlaubt. Die DNA-Methylierung im Promotor des Gens Cysteindioxygenase 1 (CDO1) zeigte in den untersuchten Brustkrebsproben von Lymphknoten-positiven, Östrogenrezeptor-positiven, adjuvant mit Anthrazyklin behandelten Patientinnen signifikante prognostische Eigenschaften. Weitere Studien zur besseren Aufklärung der Sensitivität und Spezifität des CDO1 sind jedoch notwendig und scheinen aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse durchaus lohnenswert.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur DNA-Methylierungsanalyse basiert auf der direkten Sequenzierung von PCR Produkten bisulfit konvertierter DNA. In den letzten Jahren hat sich insbesondere die Sequenzierungstechnologie wesentlich weiterentwickelt. Die Technologien der zweiten Generation ermöglichen unter anderem die gleichzeitige Analyse verschiedener Amplifikate auf Einzelmolekülebene. Die Kombination der in dieser Arbeit etablierten, multiplexierten PCRs mit den neuen Sequenzierungstechnologien wäre höchstwahrscheinlich eine gute Weiterentwicklung. Dadurch könnte mit großer Wahrscheinlichkeit Reamplifikation der einzelnen Genregionen weggelassen werden, was eine schnellere DNA-Methylierungsanalyse der untersuchten Biomarker auf einer größeren Anzahl von Zelltypen und Tumoren ermöglicht. Hinzu kommt, dass die neuen Technologien das Auffinden von möglichen Mosaik-DNA-Methylierungsmustern ermöglichen. Würde man innerhalb eines Zelltyps heterogene DNA-Methylierung für verschiedene Kopien in den CpGs einer Region finden, so könnte dieses Ergebnis wesentlich zum Verständnis der in dieser Arbeit gefundenen heterogenen DNA-Methylierungsmuster in mikrodisezierten Proben für die untersuchten Biomarker beitragen. Auch unspezifische Nebenprodukte bei multiplexierten PCRs könnten mit den Sequenzierungstechnologien der zweiten Generation zuverlässig identifiziert und quantifiziert werden. Die Ergebnisse der Mikrodisektionsstudien dieser Arbeit verdeutlichen die komplexen DNA-Methylierungsmuster der verschiedenen Biomarkern innerhalb eines Tumors. Die Multiplexierung von Biomarkern scheint ein geeigneter Ansatz zur besseren Aufklärung der Zusammenhänge verschiedener DNA-Methylierungsmarker zu sein. Die Kombination und gleichzeitige Analyse mehrerer diagnostischer oder prognostischer Biomarker in einer Tumorseite könnte zu einer besseren Stratifizierung der Tumore führen. Etablierte multiplexierte Markerkombinationen, die eine klare diagnostische oder prognostische Anwendung auf geringen Gewebemengen verfolgen, könnten beispielsweise auch auf DNA Hybridisierungschips zu klar definierten, diagnostischen Produkten weiterentwickelt werden.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
<i>ALX4</i>	<i>ALX homeobox 4</i>
<i>APC</i>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
AUC	<i>Area Under the Curve</i> [Fläche unter der Kurve]
<i>BMP4</i>	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
<i>bp</i>	Basenpaaren
<i>CDO1</i>	cysteine dioxygenase, type I
CGH	<i>Comparative Genome Hybridization</i> [Komparative Genomhybridisierung]
COBRA	<i>Combined Bisulfite Restriction Assay</i> [Kombinierter Bisulfit-Restriktionsassay]
Ct	Cycle Treshold [Durchbruchzyklus]
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DCIS	<i>Duktales Carcinoma in situ</i> [Duktales Karzinom <i>in situ</i> ]
DME	Dimethylether
DMH	<i>Differential Methylation Hybridization</i> [Differenzielle Methylierungs Hybridisierung]
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> [Desoxyribonukleinsäure]
dsDNA	<i>Double Stranded DNA</i> [Doppelsträngige DNA]
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	<i>Estrogen Receptor</i> [Östrogenrezeptor]
ESME	<i>Epigenetic Sequencing MEthylation analysis</i> [Analyse epigenetische Sequenzierungs-Methylierungsanalyse]
EtOH	Ethanol
FFPET	<i>Formalin Fixed and ParaffinEmbedded Tissues</i> [Formalin-fixierte und Paraffin-eingebettete Gewebe]
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm
g	Erdschwerebeschleunigung
h	Stunde
IDC	<i>Invasive Ductal Carcinoma</i> [Invasives duktales Karzinom]
kb	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
kV	Kilovolt
l	Liter
LMD	Laser Mikrodissektion
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i> [Verlust der Heterozygotität]
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
M	Mol
MDA	<i>Multiple Displacement Amplification</i> [Multiple Verdrängungsamplifikation]
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Milli-Mol
mPCR	Multiplex-PCR
<i>M-Stadium</i>	Fernmetastasen Stadium
NR5A1	<i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i>
<i>N-Stadium</i>	Lymphknotenmetastasen Stadium
PBL	Periphere Blut-Lymphozyten

## 5. Abkürzungsverzeichnis

---

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction [Polymerasekettenreaktion]</i>
PgR	Progesteronrezeptor
<i>PITX2</i>	<i>Paired-Like Homeodomain 2</i>
PK	Prozesskontrolle
<i>PLAU</i>	<i>plasminogen activator, urokinase</i>
<i>pT-Stadium</i>	<i>Primärtumor Stadium</i>
QM	Quantitative Methylierung
<i>RASSF1A</i>	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1</i>
<i>RASSF2</i>	<i>Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid [Ribonukleinsäure]</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RT PCR	<i>Real Time PCR [Echtzeit PPCR]</i>
s	Sekunden
SAM	S-Adenosylmethionin
<i>SEPT9</i>	<i>Septin 9</i>
<i>SFRP1</i>	<i>secreted frizzled-related protein 1</i>
sPCR	<i>Singleplex-PCR</i>
ssDNA	<i>Single Stranded DNA [Einzelsträngige DNA]</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>TFF1</i>	<i>trefoil factor 1</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Stadium	Tumor Stadium
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume [Volumenprozent]</i>
V	Volt
VIM	<i>Vimentin</i>
w/v	<i>weight per volume [Gewichtsprozent]</i>

## 6. Anhang

### 6.1. Primersequenzen

Tabelle 8: Sequenzen der Primer, die in Kapitel 3.3 verwendet wurden. Die Rückwärtsprimer besitzen alle eine Domäne (cgctgctg) zur Generierung des Normalisierungssignals. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Deutschland) bezogen.

	Gen	Vorwärtsprimer	Modifizierter Rückwärtsprimer
1	ABCC5	TAGTTTTGGGAATGTTTTGTGT	cgctgctgACAACAACCATCACCTACCTAC
2	ABTB2	GGGTATGGGATTGTTGAATTA	cgctgctgACAATAAATAACTAACCTCCAAACA
3	ADAM17	TTTGTGTTTATTTTATTAAGGAGT	cgctgctgCCTAAACACACTAAACAAAAAACC
4	AIM1	TAGAATAGTAAGAAGTTATTTGGGTTAA	cgctgctgAAAAACTCCCACAAACAAAAA
5	AKT1	TTTTATGATTTTGGGGAGGT	cgctgctgAACCCCAACTCCAAACCC
6	ALOX12P2	GGAGGGTGTGTTGTTTTATTT	cgctgctgAATACCTCTCATCTCTCTATTCC
7	APC	TTAATTTTTTTGTTTGTGGGAT	cgctgctgAATTACACAACACTTCTCTCTCC
8	APPBP2	GGAGGAGAGTAGAGAGGAGGT	cgctgctgATAAATCCCAAAACTCTCTATAACA
9	ARHGAP25	TTTGGTTAGTTATAGGTTTGTTTTT	cgctgctgAACCTACACAACCTACCAATTAATAAC
10	ASCC1	AGTTATTTTTTTTATTTAGTTGGGTTT	cgctgctgATAAAAAATTTCCCAAAACC
11	ATF3	GTTGGTTTGGGTATTATTGGTT	cgctgctgCCCTCTCTCTCCATATCAAAA
12	ATP13A3	GTTTTGGATGTAAATTAATATTTTT	cgctgctgCAACCAAAAACTACAAATAACC
13	BAG1	TTAGTGGGTTTTATGTAGGTTT	cgctgctgATAAAAAATATACAAACACAAACC
14	BCAR3	GGGTGAAGTATAGGGTGGGT	cgctgctgTTCCTATTAACCTACAACAATCC
15	BCL6	GATTTAGGAGGAGAGAAGGGTAT	cgctgctgAAACCACAAATTACAAATCCAA
16	BIK	GTGTAATGGGGTGGTTTTTT	cgctgctgCATCTTCCCTCTTTTAAAAACA
17	BIRC5	TTTTGAGAAAGGGTGTAGGT	cgctgctgCCTCTACTCCCAAAAAACC
18	BMP7	GTAGTAGGAATAGGGGTGTTTAGA	cgctgctgCCCCCTCTACCACCTAAAA
19	BMP8B	GAAGGGTTTTAGAGTTTTGGTT	cgctgctgACACCTACTCAACTACTCTCCC
20	BMPR1A	GTGGTGATAATTATTTGTATTTTTTA	cgctgctgCAACAAAACTAAAAACAACCAAC
21	BSG	TGGGGTGATTTGTTTTTT	cgctgctgAACTTTAAATCTCCCTTCTCTAA
22	C10orf131	TTGGGTTTTGGTAGGTTAGG	cgctgctgCAAATAAATAATCACCACCC
23	C3orf64	GGAAGGAAAAAGGAAATAT	cgctgctgTTAAACTTTCCATTACCCACTAC
24	CASP2	TTGGGTGGTTTGGTGTGT	cgctgctgACTCCTTATACTAAAAATAAACCAAA
25	CBLN2	ATAATTTTGTAAAGATGATAAATGTTG	cgctgctgTTATTTTTTAAACCAACATAAACTATAC
26	CCDC5	GTTAGATTTAAATAAGGGGAGGTT	cgctgctgTCTCCCCTATTCCACACATC
27	CCDC76	GTAGGTGAAATGTAAGATTGTGAG	cgctgctgTCTTTCCCACTAACCTAACCC
28	CDC20	GAGAGGTTAATGGGTTAGGGT	cgctgctgACCACAAAATCAAAACCACC
29	CDC2L5	TTGTTGTTGTTTGGATTTTGT	cgctgctgCTCCAAAAACACTTATTCTCACTATA
30	CDC7	GGGAAGAAATTTTATTTTTTTG	cgctgctgTCTATAACTCCCAAAATACCTAAA
31	CDK5RAP2	GAGTTTGAATAAGAGTTGGGGT	cgctgctgCAAATCCATCATAACTACAAAAATAA
32	CDK6	GGAGGAATTAGGAAGGATTAAG	cgctgctgAAATTCCTCCAAACTCCCC
33	CDO1	AGAGATTTATTTTAGGTTTTTGG	cgctgctgACCCCAAAATCTAAACCTAAT
34	CNKS3	GAGGTTAGGGGTTTGGGG	cgctgctgCAACTACCACAATCCAACCTACAA
35	COL1A1	TTGAGATAGGAGGGAGTTTATTT	cgctgctgACTTTCCTCACTCTACACCCAA
36	COMMD9	GGGGGTTGTAGTTTTTTAGAGT	cgctgctgCCCTAATCCTTTAATTCTAAAAATCT
37	COPS4	AGAGAAATGTATATTTTGGGGTT	cgctgctgCACAAAAACAATCTAAATAATCTAAA
38	COX6C	GGGTGGTGGTTTTAATGTAGT	cgctgctgCCTCCTCCAATTTTCCAA
39	COX7C	GGTTTTGGGAAGGTTAGTGT	cgctgctgCAACCTAATTTCTAACTATCATCTCC
40	CREBL1	AGAGGGTTGTGGTAAATGTTT	cgctgctgCCTAACTTTTATATCCCCCTTAATA
41	CTAGE5	GGTAAGGTGTTATTTTATGTTTTTT	cgctgctgAACACTTATTAACCCAACTATCTTC

42	CTSL1	GGGAGGGTAGTTGAGGATTT	cgctgctgAAAACATAAACTTCCCTATCTAACC
43	CUTL1	GGGGGTGGTAGGTAGGTATT	cgctgctgAACTTCTACCCCTCTACAAAACC
44	CXCL12	TTTTATTGGAGAGATTGAGGATT	cgctgctgTTACTTTTTCATTAATTCTCATTCAA
45	CYB5D1	GAAAAGGATAATGGTTTTATGTTA	cgctgctgTCTTAATTACTCCTTTACTCCTCAA
46	CYP1B1	GGATTGGGTAGAAAGGAGGGT	cgctgctgCTCCATAAAAACCTACTAATAAAAAC
47	DLC1	GTGGGGGAAATATTTAGTTTT	cgctgctgCCCCATTCCCAAACCTCC
48	E2F1	GGGGAGGGGTTGATTGAG	cgctgctgAAAAACAAAACAACAAAACAAA
49	E4F1	GGGGAGGGTTAGGTTTAGGT	cgctgctgTCATCCCCCTCTCTAATATA
50	EDNRA	AGGTTATTAGATTTTTGGATTGG	cgctgctgTCTAAATTACTATCAAATTCACCTCC
51	EEF1A2	GGGGGTAGGGTAGGGAGG	cgctgctgCCAAACTACAACCCACCTACT
52	EFCAB2	GGGGGAGGAAGATTTTTG	cgctgctgACCTCTAATCTTCCCCCAA
53	ENDOGL1	GTGGTTGGGGTTGATGTTG	cgctgctgAACCACAAAACCTTACCATCC
54	ERCC5	TTTAGGGTTTTGGAAGTTGT	cgctgctgATCCCTACACCCCAATCC
55	ETS1	GGGTGTGTAGGTTGGGTGTAT	cgctgctgAATAACCAAAACCTCAAAAATAC
56	EVI1	TTTAAGGTTTGGATTTTGTAGGTA	cgctgctgACATACCTAAACTACAATATACCTTCC
57	FAM98B	TTTTTATGGTTTTTTGGTTAGAG	cgctgctgCTTCTTCAACTATACTCTCAAACAATT
58	FAT4	GTTATTGTTTTTTTTGAAAGTGATT	cgctgctgAACCCTATACACCACCTCCAC
59	FBLN1	GGAAGTTTGGGATTTAGGTTT	cgctgctgAATCTCCTAATCTCCTCC
60	FGFRL1	GAGTAGAAGGGAGAAGTAGGGTT	cgctgctgCCTTTAACCAAAAACACAAA
61	FLJ11151	GGAGGGGATTTTTGGGGTT	cgctgctgCCCTAAAAACAAAACCTTAATACAACT
62	FLJ13305	GTTAGGGTTTTAAGGGGTTTT	cgctgctgCTAATAACCTCCAATCTCCAAAC
63	FN1	TTGAATTATTTGTTGAGTTTGT	cgctgctgAAACTTAATAACAACCTTACCTCCC
64	FOXC1	GGTTTTATTATGTTTTGGGTTG	cgctgctgCAACTCCCTAAAAATAATACCTA
65	FOXF2	GATGGTTTAGTAGTGGTTTTTGT	cgctgctgAAATCTACCAATTCCTACAAAC
66	FSIP2	GATTTGATTAGGAATGGTTAGAGTT	cgctgctgTCAACTATAATCCTCTCAAATCAA
67	FST	GGTTTTTTAGTGTGTGGGGT	cgctgctgATATCACCTAATTCACACTAAACTTTTA
68	FZD1	GTAGTTTTTGTAGTTTTGGGTTATTT	cgctgctgTACTATACACTATACCAACCACCATC
69	GATA3	GGATTTGTTTTTAAAGTTGTTAGTT	cgctgctgAAACCCCTAAATTAATAAATAACAC
70	GEMIN7	GTTTTTATTAGGGATTGTTTATT	cgctgctgAAAAATTTTCTCCTTCTCCCTT
71	GNG4	GGTTTGGTGGGTAAATGAA	cgctgctgCAACAAACTACAATAAACCTACCA
72	GPR113	GGTGTGTGTGTTATAGTTTTGTAG	cgctgctgTTATACTTATCAAACCAACCAACTA
73	HMGA1	GGTTTAGGGGAGTTAAAAAGA	cgctgctgAACCCTAACCTCCACAC
74	HMGN3	TTAATTTTAGTGTTAATTAGGGTTGG	cgctgctgCCTAATAACCCCTAACCTTAAA
75	HNT	GGGTGGGTTTTATTTAGTTATTTAG	cgctgctgACTCCACTTCCATCTACTATTATT
76	HOXA9	GTGATGGTTATTATTGGGGTTT	cgctgctgAAAACATAACCCAAAATCCCC
77	ID1	TAGGGTGGGTATTAGTTTTTTGA	cgctgctgTTACCCATTCTATTTCAACCAA
78	ID3	TTTTTGATTTATTTTTTAGTATGAA	cgctgctgTCCACCTAACTAAACTAAATACCTCT
79	JMJD2D	GGTAAGAGGATAGGAGATTATTTTT	cgctgctgCTACTCCAAAACCTCCACC
80	JUN	GGGTATTTGTTGGGGTAGGT	cgctgctgCTCAACAACCTCAACCCAAA
81	KIAA0195	GGGATGGTTGTTAGGAGTTTT	cgctgctgCCTAAAAATCCTCATCCCC
82	KIAA1958	GTTTTAGAAGGATATTTGGAGATG	cgctgctgACAACATAAACTCAACAAAACAAA
83	KLF10	ATTTGAATGGGGAGGGGGT	cgctgctgCTAAACTACTAACTACTTAACCACAAA
84	KPNA2	GGGGTGGTAGTTGGGAGTAT	cgctgctgCCCTCCTTACAATTTACTATCTTTA
85	LIPE	AGGGTGGGGGATAGATAGAT	cgctgctgCCTCACCCACCATATCTCCTA
86	LRRC45	TGGGAGTAGAGGGTAGTTTTTT	cgctgctgCACCTACAACCCCTACCAA
87	LRRC51	TGAAAAGTTTTGAAGGTAGGAGT	cgctgctgAACCCTCAAAATTTCTACACAATC
88	LTK	TTTTTAAGTTATTTATTGGGAAAGG	cgctgctgTCAACCTAAAACCTACTACC
89	MAF	GAGTAGTTGGTATTATGTTTGTG	cgctgctgACTTACTACAACAATAATCTTCTCC
90	MAPK14	GTAGAAATTTTTAGGGATTGTTTT	cgctgctgCCACCACAAAACCAATATTTA
91	MAPKBP1	GTGTTATTATAGTTTTTTGTTGTTGTT	cgctgctgACCCAAACCTCACCAACCT
92	MDH1B	GGTTATGGGAGGTGAGTTGTT	cgctgctgATCCCTACCTCTAATCTCTCTC
93	MED13L	GGTGGTTGGAGATAAATAAGG	cgctgctgCCTTCCCTACTCCTCAACC
94	MEN1	GGGATTTTATGTTTTAGTAGGTTT	cgctgctgCCCAAAAAAATCCTAACCT
95	MKI67	GTATGGGATTAATAGGAAGGGA	cgctgctgATACACCCAAATTTTTCTCCTC
96	MLL	GAGGAGATATAGGTAAGTTTTAATTTT	cgctgctgACCATCTAAACCCCATCCTA

97	MLL5	TAAAATAAGTTTTTTGAAATGAGTT	cgctcgcgCCTCCCCACTCCTTTTA
98	MLYCD	AGGTTGTGTATTTTGAAAAATTG	cgctcgcgATAACACCTTCTATAAAACCCAAC
99	MMP9	GGGGAAGATGTTGTTGTTAG	cgctcgcgAAAATCCTCCTCAACCTCA
100	MRPS10	GGAATTTTATGGTTTGAGGA	cgctcgcgCCAATCCAATACCTACCAAAA
101	MSH3	AGGAGGTGGATTTTAGGTTTT	cgctcgcgACTACCATCCTTACCTACCATA
102	MTFR1	TTGATTGATTAGTTTGGTTTAGGT	cgctcgcgATTCCCACCCTACTCACCTC
103	MYC	TTAGATTTTGTAGGTATAAGTTGGAG	cgctcgcgAAAACTAACCTCCTACCAAACTA
104	NAP1L2	GGGAGATTAATTTTTATAGGAAA	cgctcgcgACCTCAACACCATCTTTTATCC
105	NCR1	TAGAGTAGGGTAGGGAGTGTGG	cgctcgcgCACTTCCTATATATCTATCTCCCTAA
106	NDUFA9	GAAAGGTAAGTTTTGATTTAGTTTAGT	cgctcgcgACTTCCAAAACCTTAAATCCC
107	NEUROD1	AGTATTATTAATTTGGGTTATATAATTTGA	cgctcgcgAACAATAAATCTCATAACCCCTAAAA
108	NFATC2	GGGAGGAAGGAGGTTGTT	cgctcgcgCAACTTTCTTATCTAAACCCCTAATTC
109	NFKB1	GGGGTTTTGGTTTTTAGTAG	cgctcgcgAACCTACCCTTAAAACTATAAACCC
110	NKX2-6	TGGTTTAGGTTTGGTTTAGATT	cgctcgcgCCTAAATTTATTTTATTATAATTCCA
111	NKX3-1	GGAGTTAGAGTTAGAGTTAGAGGGA	cgctcgcgCTTAAACTACCCCTTCC
112	NR2C1	GGTGAAGGGTATTTTTGGTT	cgctcgcgAAAAACCCAAACACAAAAAACT
113	NRF1	GGAATTTTAAAGTAATTTGGATGAG	cgctcgcgTCTAATCAACAACCATTTTAAACC
114	OPCML	GGAGGTGGGTGATTTTTATTTT	cgctcgcgAACTAACACTAACCCCTCCCTC
115	PABP5	TTAGATATTTAAGATGTTTATTGGGTA	cgctcgcgTCAAAAATAACCCACTCACTAC
116	PARP11	GTTGGATTAGAAATTTTTAAATTTTTT	cgctcgcgCCCTCCCTATCACAAACCA
117	PAX6	GGTTTTGATTTGGGGATAGTAG	cgctcgcgCTACCAAACCTCACCTACCTCC
118	PAX9	GGTTTTATTAGGTAGTTAGAATGGTAG	cgctcgcgAAAATAATCCACCTCCC
119	PCSK9	GTTGTTTTGTAGGATTGTATGGTT	cgctcgcgCAACTCAACAACCTCTCATCTA
120	PDGFD	TGTAGGAAGTTTGGGGAGAGT	cgctcgcgCAAATTTAAATATAACAAAAATAAACCC
121	PHLPP	GGGTGGGGGTAGTTTTT	cgctcgcgAAAACCACAACCTCCAAAATT
122	PHTF1	TGGAAAAGATAGGTGTAAGGTT	cgctcgcgACTCTAACCCAAATCTCAAAC
123	PIAS3	GATTTTGGGGTTATATATTTTTT	cgctcgcgAACAAACCCCAACCTAAACC
124	PIGM	TTTTATTAAGTAGAGGATTATTAGGATT	cgctcgcgCCCCTACCTATAACAATATCCAA
125	PMF1	GGTGGGAGTGTTTGTGGT	cgctcgcgAACTCCTAAAACTCAAATTTAACTAA
126	POLB	TTAGTTTGAAGGAGGTATTAGGATT	cgctcgcgTCATTCTAAATACCTATTTCCCC
127	POLR2B	GTAATTGTAGGTTAAGTTTGGGT	cgctcgcgAACTATCCTCTCAATCAACCC
128	POU2F1	GGGATATTATATAATTTGGTTTTGAGT	cgctcgcgCAATCAACCAACACCCTATAA
129	POU4F3	GGGGAATTTATATTTTTAGTTGTTT	cgctcgcgCCCTTTCCCTCCTCTAA
130	PPARA	TTTTTTGATTTTTATTGGTATTATTT	cgctcgcgATTCCCACTTTATACCCCAAC
131	PRDM16	TTTAGGATGGGTTTTAAGTTGG	cgctcgcgCTTCCCACCTAACAAAAATA
132	PRIM2	GGTAAGTTTTTATTGGTAGGTTTTA	cgctcgcgCTAATTCATTCCACAAATAATTCAA
133	PRKCQ	TTTTTTGGAGAGTGGGGT	cgctcgcgCTTAATATCAACCACTCTCCCTC
134	PRPSAP1	GGTTTATTGTGGTTGAGGTTATT	cgctcgcgCCTCCTTCTCCTCTTTCCATATA
135	PRR5	GGGGAGGGGATTTTTGA	cgctcgcgCTACTAAACTTTCTCCAAACC
136	PSMA3	GGTGTAATAGTTTAAATTTAAGGATTG	cgctcgcgAACTACAAATAACCCACCCAA
137	PTBP1	GGGTTTAGGAGTTTTGGAGTT	cgctcgcgCCCTAACTACAATAACTCTTAATAAAT
138	PTK7	GTTTTTTAAGTTTTGTGTTTTAATT	cgctcgcgCCTCAACTCCTTTTCTAAAC
139	PTN	GGGAAGAAAGAGATTAGTGAGTTAT	cgctcgcgCTCAATCTACCTTTATTACAAAAAAC
140	PTPRG	GTTTGGGGTAGGTAGGGAT	cgctcgcgCCTAAAAAAACTACCTACCTAAAA
141	RARA	GGTTTGTGTTATTGTTTGTGATATT	cgctcgcgCCCTCTACCTATATTTATACCAACA
142	RARA	TTTTTTGTTTTTATAGTTGTGAGAA	cgctcgcgCTCAATAAACTCCCCACC
143	RARB	GGGGGATTAGAATTTTTT	cgctcgcgATACCCAAACAACCCCTACTC
144	RELA	TTTGGTGATGTTATTTTGGGT	cgctcgcgTACTTCTAAACAACCACCACC
145	RHBG	GTAATTTTGGGGTTTTTGT	cgctcgcgACTTCCCCTACTATACCTCTTCC
146	RNF150	AATTTTAGAAGTAGGGGTTATTAT	cgctcgcgACAAATCACTCCACCCAAAA
147	ROPN1L	TGGTGAATTGTTTTAGGATGTT	cgctcgcgCACCAACCTAATCCCTTCTAC
148	RSBN1	GGAGTTTTTTAGTATTTGTTTTAAATT	cgctcgcgTTTTTAATACCCCACTACTAATCTA
149	RTN4RL2	GTGTGTGTATGTTTTTGTGATTTAT	cgctcgcgAACACATCATAACACAAAAAAC
150	RUNX1	GAGTTAAGTTTTAGGAATAGGGGT	cgctcgcgCCCAAACCCACTTAAACTAA
151	RUNX2	AGGGAAAGGAAGGAGTTTAGT	cgctcgcgATATAAATTCACAATCCAACCC

152	RXRA	GGTAGGAAATGTTTGGTGTAT	cgctgctgCAAACACAAATAATTTACATTATTAAC
153	SCAP	TTTTTGAGTGGGTTTATGATTTT	cgctgctgATTCCCATCTACACAACCTTCTATA
154	SEMA3E	TATTTAGGATTTTTTTTTAGGGT	cgctgctgATAACCAAATACAACCTAACAAATAA
155	SFI1	GGGAGGAGGAAATTTTTGA	cgctgctgAAACCTACCATCCTCTCCC
156	SFRP1	GGGAATTTGTTATATTTAAGTATTT	cgctgctgACACCCAAATCTTCTCTACTC
157	SFRS2IP	GATGGGTTTGGGTAGTTGTTT	cgctgctgACTCCAACCTTCTCCCAA
158	SGK3	TATATATTAGGTTATTTTTGTTGGGT	cgctgctgATCACAACCTCTAATATTTCCCTCTA
159	SH3RF2	AGTAAGATTGAGTGGTTAAAGTTTTT	cgctgctgTCTACTAAATCAACTCAACCCC
160	SLAH2	TAGGAGGTAGGATATAGTTAAAGTAGAT	cgctgctgCTAATAAACCCACACAAACAAC
161	SMOX	GGAGTAGTTTTTTTTTAAGGGTAAAT	cgctgctgACCCCTCCACAAAATAAA
162	SOX10	GGGTAAGGTTAAGAAGGAGTAGT	cgctgctgTACCTAAACCCACACCATAAAA
163	SP1	GATAAGTTTAAGGGGGTTTTGTT	cgctgctgTTACCCCCCTCCTCA
164	SPATA5L	GGATAGGTTATTAGGAGGAGG	cgctgctgACTCCTACCTCTACACTACCTAACCT
165	SPI1	TTTTATTGATAGTAAGTTAGGAGGGT	cgctgctgAACTCCTCCACCAACCCA
166	SPIN3	TGATTTTTTTTTTATAGGTTTATTG	cgctgctgCCCAACTCAATCTAACTAAATCTA
167	SRRM1	GTAGATAATTTGTTGGGATAATGTG	cgctgctgAAATTAATCACTCCACAACTAC
168	STARD4	GTTGGGTGTTTTTATGTTGGTT	cgctgctgTCTCAACAATACTACTCAACCTCC
169	SYK	GAAGTTGTTTAAATGAGGAAGAGT	cgctgctgCTCCTCTCCTTACCAAAAAAT
170	SYNJ2BP	TTTGGGTTAGTTGGAGTGTAGTAT	cgctgctgTTCCCAACATTCCCAATACT
171	TBP	GGTTATTGTAAAGATTATTATGGGTT	cgctgctgCCTATACTCACACTTCTCATAACCTC
172	TBX1	GTAAGGGAGTTTTTATGTTAGTTTTT	cgctgctgCCTCCCTCCCTCACCTAA
173	TBX5	GTTAAATAGAAGATTAGATGAAGAAAGTT	cgctgctgACCTAATCACTCCACAAAATACC
174	TCF7	GTAGAAAGTAGGGGAATATTTG	cgctgctgCAAACCTAAAAATAATCACCTT
175	TFAP2A	TTTAATAAGGGAAGAATGTTTGG	cgctgctgTTAAATATTACCCCTTCCCTATA
176	THRAP3	GAATTAGGTTAATGGGGATTG	cgctgctgACCCTCCCTACTCCTCCC
177	TMEM60	GTTTGGGGTTGGTTGTGTG	cgctgctgCAAATAAATCTAAACTCTACCCTAA
178	TNC	AGATTTAGGTTTTTGAAGAAGTATT	cgctgctgCACAACTACCTACTATCACCC
179	TNFRSF10A	GGTTATAGAAAGGTTGAGGTTAATT	cgctgctgAACCTAAACTTCTCTCTCTATA
180	TNK1	TTTTAGGTTGTTTGGGTTAAATT	cgctgctgCACCTTATCCCACTAAAAACTC
181	TOP1	TGGTTGTTTTTGTGGTTATTTT	cgctgctgTATCAACAACAACCACTTTAACC
182	TTBK2	TGGGGGATGGGTAGGTAGT	cgctgctgAAACTCTAATCCAACCTCAAAACC
183	TTRAP	ATGGAGTTGGGGAGTTGTTT	cgctgctgAACAACTCCACACAAAAAT
184	TUBB	GGTGTTTAGTTGGGGGAA	cgctgctgAACCCAACTTTCCCTACTCTAA
185	TUBB2A	GGGTATTGTTTTGATATGATGATATA	cgctgctgCCCACCCATACACCAAAC
186	USP3	GGAGGATATTGAATTTATGTGGT	cgctgctgCCCTTAACCTCCCAACTTA
187	VDR	GGGATTAGGTTGAGTTTTTTG	cgctgctgCTAAACTAACCAACCAAAACTT
188	VEGFA	AAGAGGAAAGAGGTAGTAAGAGTTTTT	cgctgctgACAAATCACTCACTTTACCCCTA
189	VENTX	GGTTGAGTAAAGAGGTTGGAGTT	cgctgctgCTCTCTATAACCCCAATAAA
190	WT1	TTTGGTTGTTGTAGGTATTTAGGT	cgctgctgCCTAAACTTCTCTTACTACAAAAC
191	WFOX	GTTGGGAGGAGAGAATTATTAAG	cgctgctgACTCCTTAACAATTACTTTTACTTTA
192	YTHDC2	ATTGTTTTGAAGAGATGGTTTTT	cgctgctgATAACCTCAACCAACACAAA
193	ZBTB16	GAGAGAGAAAAGTTTTTTTTAGGA	cgctgctgATAAACCAAAATACCAAAAAATCC
194	ZBTB2	GTTGGTAGTAAAAGAGGTAATAAAGAA	cgctgctgTATATCCCCAAAACATAATTAATAA
195	ZDHHHC5	GGATTTGAAGAGTTAATGTAGGG	cgctgctgCTCCTTAAACTTCCCTCTCAC
196	ZFH3	GGAAGGTTAATTTGAAATTTATAGTT	cgctgctgAAAAATCCTAACCCCAAAC
197	ZNF121	TTTTTGATTGGGATTTATTGAGT	cgctgctgTTTCACTCTCTTCTCAAAAACTA
198	ZNF204	TTTTAGAAGTTTTAGGTTTTTTTTATAG	cgctgctgCCACAACCAAAACCATACAA
199	ZNF3	GTGGTAGGAGAGGAAGTTTATTT	cgctgctgCAAACCAAAATCTAATACAATAAA
200	ZNF41	GAGATTTAAAGGTAAGGTTATGG	cgctgctgAAACAACATATCCACCCCTAATA
201	ZNF436	GGTAGGTTATGGGGTAGGTA	cgctgctgACAACCTACCTAACCAATCAAC
202	ZNF606	GAATGGATTTTTGGGTATGTG	cgctgctgCAAACCTAAATTAACAACCTCC

Tabelle 9: Sequenzen der Primer, die für die mPCR Voramplifikation und als Sequenzierprimer in Kapitel 3.1 verwendet wurden. Dargestellt die Namen der Gene und Sequenzen der Primer. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Deutschland) bezogen.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
PITX2 Region 1	GTAGGGGAGGGAAGTAGGATGTTAG	TTCTAATCCTCCTTTCCACAATAAAA
PITX2 Region 2	AGAGGGATAAAGAGTAAAGATTTAG	CCAATAACCTCTCCCTATAAC
PITX2 Region 3	TTTTGGAAAGTGGTTTTTAGTTTTG	CCAAACAACCCAACCTTCCAC
SFRP1	GGGAATTTGTTATATTTAAGTATTT	gACACCCAAATCTTCTCTACTC
TFF1	TTAATTTTTTTGTTTGTGGGGAT	AATTACACAACACTTCTCTCTCC
PLAU	TTGGAAGAAGTTTGTAGGGATT	ACAACCAAAATCCCAAAAAC
RASSF1A	AGTTGGTGATGTTGATTAGAGTTTT	CCCTCCCAATATACAAATAAAAACTACT
APC	AAGGAGGGAAGGAAGGGTAA	tCCCCAAAATCCAACTAAAC
BMP4	GGAGTTAGAGATGGGAAGAAAT	TCTCTCCATCCCTCCCTATA
NR5A1	GTTAGGTGtATGGGAGGAAGTA	ACTCCCTCCCCTATCTTACAAC
C20orf55	GTTTTGAAGGGGGTTGTTT	ACCTTAACCCATACAACCACTTA

Tabelle 10: Sequenzen der Primer, die zur Reamplifikation der mPCR in Kapitel 3.1 verwendet wurden. Alle Primer besitzen am 5'-Ende des Rückwärtsprimers eine Domäne (cgtcgctg) zur Generierung des Normalisierungssignals. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Deutschland) bezogen.

Gen	Vorwärtsprimer	Modifizierter Rückwärtsprimer
PITX2 Region 1	GTAGGGGAGGGAAGTAGGATGTTAG	cgtcgctgTTCTAATCCTCCTTTCCACAATAAAA
PITX2 Region 2	AGAGGGATAAAGAGTAAAGATTTAG	cgtcgctgCCAATAACCTCTCCCTATAAC
PITX2 Region 3	TTTTGGAAAGTGGTTTTTAGTTTTG	cgtcgctgCCAAACAACCCAACCTTCCAC
SFRP1	GGGAATTTGTTATATTTAAGTATTT	cgtcgctgACACCCAAATCTTCTCTACTC
TFF1	TTAATTTTTTTGTTTGTGGGGAT	cgtcgctgAATTACACAACACTTCTCTCTCC
PLAU	TTGGAAGAAGTTTGTAGGGATT	cgtcgctgACAACCAAAATCCCAAAAAC
RASSF1A	AGTTGGTGATGTTGATTAGAGTTTT	cgtcgctgCCCTCCCAATATACAAATAAAAACTACT
APC	AAGGAGGGAAGGAAGGGTAA	cgtcgctgtCCCCAAAATCCAACTAAAC
BMP4	GGAGTTAGAGATGGGAAGAAAT	cgtcgctgTCTCTCCATCCCTCCCTATA
NR5A1	GTTAGGTGtATGGGAGGAAGTA	cgtcgctgACTCCCTCCCCTATCTTACAAC
C20orf55	GTTTTGAAGGGGGTTGTTT	cgtcgctgACCTTAACCCATACAACCACTTA

Tabelle 11: Sequenzen der Primer, die für die mPCR Voramplifikation und als Sequenzierprimer in Kapitel 3.2 verwendet wurden. Dargestellt die Namen der Gene und Sequenzen der Primer. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Deutschland) bezogen.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Septin 9 Region 1	TGTGGAGGGGTTTAGGTGT	AATACCCCTTCTCAACACA
Septin 9 Region 2	TGGAGATTTTAAGGATATTTAAGTAGAGA	ACACCTATCCTACTACTTTTCTAATAATCA
Septin 9 Region 3	GTTGGGGTATAGGGTGAAGAA	CAACTCACAAAATCAAATTCCTAA
Septin 9 Region 4	TGGTGGGGGTGTTAGTTGT	ACAACCAAACAAAATTCTCTATCAC
Septin 9 Region 5	TTTATTTAGTTGAGTTAGGGGGTTTA	AACCCAACACCCACCTTC
Septin 9 Region 6	TATTTAGGTTTGGGGATATTTTATT	AAACCATTATATAAACTTCCCCTTC
Septin 9 Region 7	TTTGTGTTGTGAAGATTATATGGGTTA	AATTTCTCCCCACCTT
VIM	AAATCCAATCCTCTACCACTCT	GGATTTGGTGGATATGGTTG
RASSF2	CAATCTCCCTATAAAACCACTAACA	GGATTTTTAGAGGTAGGTTTTAGTTT
ALX4	CTCCCCTACCCACCCA	TGAAATAAGAAATGGAAATATATTGGT
SFRP1	GGGGAATTTGTTATATTTAAGTATTT	ACACCCAAATCTTCTCTACTC
APC	TTAATTTTTTTGTTTGTGGGGAT	AATTACACAACACTTCTCTCTCC
TFF1	CCCTCCAATATACAAATAAAAACTA	AGTTGGTGATGTTGATTAGAGTT

Tabelle 12: Tabelle 13: Sequenzen der Primer, die zur Reamplifikation der mPCR in Kapitel 3.2 verwendet wurden. Alle Primer besitzen am 5'-Ende des Rückwärtsprimers eine Domäne (cgctgctg) zur Generierung des Normalisierungssignals. Alle Primer wurden von MWG-Biotech (Deutschland) bezogen.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Septin 9 Region 1	TGTGGAGGGGTTTAGGTGT	cgctgctgAATACCCCTTCTCAACACA
Septin 9 Region 2	TGGAGATTTTAAGGATATTTAAGTAGAGA	cgctgctgACACCTATCCTACTACTTTTCTAATAATCA
Septin 9 Region 3	GTTGGGGTATAGGGTGAAGAA	cgctgctgCAACTCACAAAATCAAATTCCTAA
Septin 9 Region 4	TGGTGGGGGTGTTAGTTGT	cgctgctgACAACCAAACAAAATTCTCTATCAC
Septin 9 Region 5	TTTATTTAGTTGAGTTAGGGGGTTTA	cgctgctgAACCCAACACCCACCTTC
Septin 9 Region 6	TATTTAGGTTTGGGGATATTTTATT	cgctgctgAAACCATTATATAAACTTCCCCTTC
Septin 9 Region 7	TTTGTGTTGTGAAGATTATATGGGTTA	cgctgctgAATTTCTCCCCACCTT
VIM	AAATCCAATCCTCTACCACTCT	cgctgctgGGATTTGGTGGATATGGTTG
RASSF2	CAATCTCCCTATAAAACCACTAACA	cgctgctgGGATTTTTAGAGGTAGGTTTTAGTTT
ALX4	CTCCCCTACCCACCCA	cgctgctgTGAAATAAGAAATGGAAATATATTGGT
SFRP1	GGGGAATTTGTTATATTTAAGTATTT	cgctgctgACACCCAAATCTTCTCTACTC
APC	TTAATTTTTTTGTTTGTGGGGAT	cgctgctgAATTACACAACACTTCTCTCTCC
TFF1	CCCTCCAATATACAAATAAAAACTA	cgctgctgAGTTGGTGATGTTGATTAGAGTT

## 6.2. Veröffentlichungen

### Wissenschaftliche Publikationen :

- Dimo Dietrich\*, Manuel Krispin\*, Jörn Dietrich, Anne Fassbender, Jörn Lewin, Nadia Harbeck, Manfred Schmitt, Serenella Eppenberger-Castori, Vincent Vuaroqueaux, Frédérique Spyrtos, John A. Foekens, Ralf Lesche, John W. M. Martens

\*These authors contributed equally to this work

*CDO1 Promotor Methylation is a Prognostic Biomarker for Anthracycline Treated, Estrogen Receptor-Positive, Lymph Node-Positive Breast Cancer Patients. [Submitted to Molecular Cancer in 2009]*

- Dietrich D, Lesche R, Tetzner R, Krispin M, Dietrich J, Haedicke W, Schuster M, Kristiansen G.

*Analysis of DNA Methylation of Multiple Genes in Microdissected Cells From Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues.*

J Histochem Cytochem. 2009 Jan 19. [Epub ahead of print]

- Cortese R, Krispin M, Weiss G, Berlin K, Eckhardt F.

*DNA methylation profiling of pseudogene-parental gene pairs and two gene families.* Genomics. 2008 Jun;91(6):492-502.

### Veröffentlichte Patentanmeldungen :

- D.Dietrich, R.Lesche, A.Fassbender, M.Krispin, J.Dietrich  
*Methods and Nucleic Acids for Analyses of cell proliferative disorders*  
application no 08160382.1, 2008
- M. Krispin, J. Distler, E. Heiden  
*A method for the analysis of the methylation status of a nucleic acid*  
EP 1882747, US 2008-0176758 A1, 2007

## 7. Literaturverzeichnis

1. Egger, G., et al., *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. Nature, 2004. **429**(6990): p. 457-63.
2. Chang, S.C., et al., *Mechanisms of X-chromosome inactivation*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 852-66.
3. Panning, B. and R. Jaenisch, *RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation*. Cell, 1998. **93**(3): p. 305-8.
4. Li, E., C. Beard, and R. Jaenisch, *Role for DNA methylation in genomic imprinting*. Nature., 1993. **366**(6453): p. 362-5.
5. Dean, W., D. Lucifero, and F. Santos, *DNA methylation in mammalian development and disease*. Birth Defects Res C Embryo Today., 2005. **75**(2): p. 98-111.
6. Florl, A.R., et al., *DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas*. Br J Cancer, 1999. **80**(9): p. 1312-21.
7. Antequera, F. and A. Bird, *Number of CpG islands and genes in human and mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11995-9.
8. Paz, M.F., et al., *Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumors*. Cancer Res., 2002. **62**(15): p. 4519-24.
9. Eckhardt, F., et al., *DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22*. Nat Genet., 2006. **38**(12): p. 1378-85. Epub 2006 Oct 29.
10. Kudo, S., *Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leukosialin gene when the promoter is methylated*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(9): p. 5492-9.
11. Lopez-Serra, L., et al., *A profile of methyl-CpG binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter CpG islands of tumor suppressor genes in human cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8342-6.
12. Nan, X., et al., *Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex*. Nature, 1998. **393**(6683): p. 386-9.
13. Bacolla, A., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. II. Steady-state kinetics reveal allosteric activation by methylated dna*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33011-9.
14. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. Cell., 1999. **99**(3): p. 247-57.
15. Jeltsch, A., *Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases*. Curr Top Microbiol Immunol., 2006. **301**: p. 203-25.
16. Yoder, J.A., et al., *DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe*. J Mol Biol., 1997. **270**(3): p. 385-95.
17. Aaltonen, L.A., et al., *Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer*. Science, 1993. **260**(5109): p. 812-6.

18. Hahn, W.C., et al., *Creation of human tumour cells with defined genetic elements*. Nature, 1999. **400**(6743): p. 464-8.
19. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
20. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. **87**(2): p. 159-70.
21. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers*. Nature, 1997. **386**(6627): p. 761, 763.
22. Weisenberger, D.J., et al., *Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(21): p. 6823-36.
23. Suter, C.M., D.I. Martin, and R.L. Ward, *Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue*. Int J Colorectal Dis, 2004. **19**(2): p. 95-101.
24. Xu, G.L., et al., *Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene*. Nature, 1999. **402**(6758): p. 187-91.
25. Robertson, K.D., *DNA methylation and human disease*. Nat Rev Genet., 2005. **6**(8): p. 597-610.
26. Rodriguez, J., et al., *Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers*. Cancer Res, 2006. **66**(17): p. 8462-9468.
27. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet., 2002. **3**(6): p. 415-28.
28. Jones, P.A. and P.W. Laird, *Cancer epigenetics comes of age*. Nat Genet, 1999. **21**(2): p. 163-7.
29. Knudson, A.G., *Two genetic hits (more or less) to cancer*. Nat Rev Cancer., 2001. **1**(2): p. 157-62.
30. Braakhuis, B.J., et al., *A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications*. Cancer Res, 2003. **63**(8): p. 1727-30.
31. Garcia, S.B., et al., *Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets*. J Pathol, 1999. **187**(1): p. 61-81.
32. Bachman, K.E., et al., *Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene*. Cancer Cell, 2003. **3**(1): p. 89-95.
33. Myohanen, S.K., S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Hypermethylation can selectively silence individual p16ink4A alleles in neoplasia*. Cancer Res, 1998. **58**(4): p. 591-3.
34. Parsons, R., et al., *Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer*. Cancer Res, 1995. **55**(23): p. 5548-50.
35. Morin, P.J., et al., *Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC*. Science, 1997. **275**(5307): p. 1787-90.
36. Herman, J.G., et al., *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1998. **95**(12): p. 6870-5.
37. Suzuki, H., et al., *Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 417-22.

38. Akiyama, Y., et al., *GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(23): p. 8429-39.
39. Bachman, K.E., et al., *Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 798-802.
40. Issa, J.P., *CpG island methylator phenotype in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 988-93.
41. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer., 2004. **4**(2): p. 143-53.
42. Salem, C.E., et al., *PAX6 methylation and ectopic expression in human tumor cells*. Int J Cancer, 2000. **87**(2): p. 179-85.
43. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 793-7.
44. Bronner, C.E., et al., *Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer*. Nature, 1994. **368**(6468): p. 258-61.
45. Kane, M.F., et al., *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines*. Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 808-11.
46. Ahrendt, S.A., et al., *Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(4): p. 332-9.
47. Esteller, M., et al., *Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis*. Cancer Res, 2001. **61**(12): p. 4689-92.
48. Weinstein, I.B., *Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer*. Science, 2002. **297**(5578): p. 63-4.
49. Weinstein, I.B., *Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(5): p. 857-64.
50. Hao, X.P., et al., *Beta-catenin expression is altered in human colonic aberrant crypt foci*. Cancer Res, 2001. **61**(22): p. 8085-8.
51. Mori, H., et al., *Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis*. Mutat Res, 2004. **566**(3): p. 191-208.
52. Yuan, P., et al., *APC and K-ras gene mutation in aberrant crypt foci of human colon*. World J Gastroenterol, 2001. **7**(3): p. 352-6.
53. Finch, P.W., et al., *Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(13): p. 6770-5.
54. Melkonyan, H.S., et al., *SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(25): p. 13636-41.
55. Rattner, A., et al., *A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 2859-63.

56. Verma, M. and S. Srivastava, *Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention*. *Lancet Oncol*, 2002. **3**(12): p. 755-63.
57. Momparler, R.L., *Cancer epigenetics*. *Oncogene*, 2003. **22**(42): p. 6479-83.
58. Kurakawa, E., et al., *Hypermethylation of p16(INK4a) and p15(INK4b) genes in non-small cell lung cancer*. *Int J Oncol*, 2001. **19**(2): p. 277-81.
59. Krassenstein, R., et al., *Detection of breast cancer in nipple aspirate fluid by CpG island hypermethylation*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(1 Pt 1): p. 28-32.
60. Model, F., et al., *Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease*. *Mol Cancer Res*, 2007. **5**(2): p. 153-63.
61. Graziano, F., et al., *Prognostic analysis of E-cadherin gene promoter hypermethylation in patients with surgically resected, node-positive, diffuse gastric cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(8): p. 2784-9.
62. House, M.G., et al., *Tumor suppressor gene hypermethylation as a predictor of gastric stromal tumor behavior*. *J Gastrointest Surg*, 2003. **7**(8): p. 1004-14; discussion 1014.
63. Chang, H.W., et al., *Loss of E-cadherin expression resulting from promoter hypermethylation in oral tongue carcinoma and its prognostic significance*. *Cancer*, 2002. **94**(2): p. 386-92.
64. Sathyanarayana, U.G., et al., *Aberrant promoter methylation and silencing of laminin-5-encoding genes in breast carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(17): p. 6389-94.
65. Sathyanarayana, U.G., et al., *Molecular detection of noninvasive and invasive bladder tumor tissues and exfoliated cells by aberrant promoter methylation of laminin-5 encoding genes*. *Cancer Res*, 2004. **64**(4): p. 1425-30.
66. Gonzalez-Quevedo, R., et al., *Differential impact of p16 inactivation by promoter methylation in non-small cell lung and colorectal cancer: clinical implications*. *Int J Oncol*, 2004. **24**(2): p. 349-55.
67. Wang, J., et al., *Value of p16INK4a and RASSF1A promoter hypermethylation in prognosis of patients with resectable non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 6119-25.
68. Chang, Y.S., et al., *Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer*. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(12): p. 3669-75.
69. Brabender, J., et al., *Adenomatous polyposis coli gene promoter hypermethylation in non-small cell lung cancer is associated with survival*. *Oncogene*, 2001. **20**(27): p. 3528-32.
70. Chim, C.S., et al., *Methylation of p15 and p16 genes in acute promyelocytic leukemia: potential diagnostic and prognostic significance*. *J Clin Oncol*, 2001. **19**(7): p. 2033-40.
71. Roman, J., et al., *Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome*. *Br J Haematol*, 2001. **113**(2): p. 329-38.
72. Roman-Gomez, J., et al., *5' CpG island hypermethylation is associated with transcriptional silencing of the p21(CIP1/WAF1/SDI1) gene and confers poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia*. *Blood*, 2002. **99**(7): p. 2291-6.

73. Rosenbaum, E., et al., *Promoter hypermethylation as an independent prognostic factor for relapse in patients with prostate cancer following radical prostatectomy*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(23): p. 8321-5.
74. Maier, S., et al., *Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response*. Am J Pharmacogenomics, 2005. **5**(4): p. 223-32.
75. Kim, W.J., et al., *Aberrant methylation of the ATM promoter correlates with increased radiosensitivity in a human colorectal tumor cell line*. Oncogene, 2002. **21**(24): p. 3864-71.
76. Satoh, A., et al., *Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8606-13.
77. Martens, J.W., et al., *Association of DNA methylation of phosphoserine aminotransferase with response to endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4101-17.
78. Widschwendter, M., et al., *Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3807-13.
79. Fiegl, H., et al., *Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1141-5.
80. Maier, S., et al., *Identifying DNA methylation biomarkers of cancer drug response*. Am J Pharmacogenomics., 2005. **5**(4): p. 223-32.
81. Riggs, A.D., *X inactivation, differentiation, and DNA methylation*. Cytogenet Cell Genet., 1975. **14**(1): p. 9-25.
82. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
83. Nuovo, G.J., *Methylation-specific PCR in situ hybridization*. Methods Mol Biol, 2004. **287**: p. 261-72.
84. Emmert-Buck, M.R., et al., *Laser capture microdissection*. Science, 1996. **274**(5289): p. 998-1001.
85. Fuller, A.P., et al., *Laser capture microdissection and advanced molecular analysis of human breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2003. **8**(3): p. 335-45.
86. Jones, C., et al., *Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast*. Lab Invest, 2000. **80**(6): p. 831-6.
87. Bertheau, P., et al., *Allelic loss detection in inflammatory breast cancer: improvement with laser microdissection*. Lab Invest, 2001. **81**(10): p. 1397-402.
88. Hoang, M.P., et al., *Primary mammary small-cell carcinoma: a molecular analysis of 2 cases*. Hum Pathol, 2001. **32**(7): p. 753-7.
89. Kurose, K., et al., *Genetic model of multi-step breast carcinogenesis involving the epithelium and stroma: clues to tumour-microenvironment interactions*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(18): p. 1907-13.
90. Oesterreich, S., et al., *High rates of loss of heterozygosity on chromosome 19p13 in human breast cancer*. Br J Cancer, 2001. **84**(4): p. 493-8.
91. Charafe-Jauffret, E., et al., *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*, 2002. **21**(5): p. 989-96.
92. Bell, D.W., et al., *Selective loss of heterozygosity in multiple breast cancers from a carrier of mutations in both BRCA1 and BRCA2*. *Cancer Res*, 2002. **62**(10): p. 2741-3.
  93. Cavalli, L.R., et al., *Loss of heterozygosity in normal breast epithelial tissue and benign breast lesions in BRCA1/2 carriers with breast cancer*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004. **149**(1): p. 38-43.
  94. Daigo, Y., et al., *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*, 2001. **158**(5): p. 1623-31.
  95. Aubele, M., et al., *Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1999. **110**(2): p. 94-102.
  96. Schmidt-Kittler, O., et al., *From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(13): p. 7737-42.
  97. Li, T., et al., *Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status*. *Am J Pathol*, 2006. **168**(6): p. 1998-2013.
  98. Somiari, R.I., et al., *Proteomics of breast carcinoma*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005. **815**(1-2): p. 215-25.
  99. Wulfschlegel, J.D., et al., *New approaches to proteomic analysis of breast cancer*. *Proteomics*, 2001. **1**(10): p. 1205-15.
  100. Wulfschlegel, J.D., et al., *Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ*. *Cancer Res*, 2002. **62**(22): p. 6740-9.
  101. Bichsel, V.E., L.A. Liotta, and E.F. Petricoin, 3rd, *Cancer proteomics: from biomarker discovery to signal pathway profiling*. *Cancer J*, 2001. **7**(1): p. 69-78.
  102. Craven, R.A., et al., *Laser capture microdissection and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: evaluation of tissue preparation and sample limitations*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(3): p. 815-22.
  103. Hayes, A.J., et al., *Expression and function of angiopoietin-1 in breast cancer*. *Br J Cancer*, 2000. **83**(9): p. 1154-60.
  104. Glockner, S., et al., *Detection of gene amplification in intraductal and infiltrating breast cancer by laser-assisted microdissection and quantitative real-time PCR*. *Pathobiology*, 2000. **68**(4-5): p. 173-9.
  105. Lehmann, U., et al., *Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction*. *Am J Pathol*, 2000. **156**(6): p. 1855-64.
  106. Suzuki, T., et al., *Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2005. **12**(4): p. 701-20.
  107. Wang, E., et al., *High-fidelity mRNA amplification for gene profiling*. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(4): p. 457-9.
  108. Baugh, L.R., et al., *Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(5): p. E29.

109. Elkahloun, A.G., et al., *In situ gene expression analysis of cancer using laser capture microdissection, microarrays and real time quantitative PCR*. *Cancer Biol Ther*, 2002. **1**(4): p. 354-8.
110. Sgroi, D.C., et al., *In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression*. *Cancer Res*, 1999. **59**(22): p. 5656-61.
111. Luzzi, V., et al., *Accurate and reproducible gene expression profiles from laser capture microdissection, transcript amplification, and high density oligonucleotide microarray analysis*. *J Mol Diagn*, 2003. **5**(1): p. 9-14.
112. Zhu, G., et al., *Combination of microdissection and microarray analysis to identify gene expression changes between differentially located tumour cells in breast cancer*. *Oncogene*, 2003. **22**(24): p. 3742-8.
113. Sugiyama, Y., et al., *Microdissection is essential for gene expression profiling of clinically resected cancer tissues*. *Am J Clin Pathol*, 2002. **117**(1): p. 109-16.
114. Mimori, K., et al., *Identification of molecular markers for metastasis-related genes in primary breast cancer cells*. *Clin Exp Metastasis*, 2005. **22**(1): p. 59-67.
115. Yang, F., et al., *Laser microdissection and microarray analysis of breast tumors reveal ER-alpha related genes and pathways*. *Oncogene*, 2006. **25**(9): p. 1413-9.
116. Parkin, D.M., et al., *Global cancer statistics, 2002*. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(2): p. 74-108.
117. Klaus Giersiepen, C.H., Katrin Janhsen, and C. Lange, *Gesundheitsberichterstattung des Bundes; Heft 25; Brustkrebs*. 2005, Robert Koch-Institut. p. 33.
118. Mallon, E., et al., *The basic pathology of human breast cancer*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2000. **5**(2): p. 139-63.
119. Sobin, L.H., *TNM: principles, history, and relation to other prognostic factors*. *Cancer*, 2001. **91**(8 Suppl): p. 1589-92.
120. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *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*, 1991. **19**(5): p. 403-10.
121. Frank, T.S. and G.C. Critchfield, *Hereditary risk of women's cancers*. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2002. **16**(5): p. 703-13.
122. Rebbeck, T.R., *Inherited predisposition and breast cancer: modifiers of BRCA1/2-associated breast cancer risk*. *Environ Mol Mutagen*, 2002. **39**(2-3): p. 228-34.
123. de Jong, M.M., et al., *Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility*. *J Med Genet*, 2002. **39**(4): p. 225-42.
124. Couch, F.J. and L.C. Hartmann, *BRCA1 testing--advances and retreats*. *Jama*, 1998. **279**(12): p. 955-7.
125. Gotzsche, P.C. and M. Nielsen, *Screening for breast cancer with mammography*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2006(4): p. CD001877.
126. Osborne, C.K., *Steroid hormone receptors in breast cancer management*. *Breast Cancer Res Treat*, 1998. **51**(3): p. 227-38.
127. Harvey, J.M., et al., *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*, 1999. **17**(5): p. 1474-81.

128. Locker, G.Y., *Hormonal therapy of breast cancer*. Cancer Treat Rev, 1998. **24**(3): p. 221-40.
129. Bertucci, F., et al., *Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(20): p. 2981-91.
130. Fisher, B., et al., *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, 1988. **6**(7): p. 1076-87.
131. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
132. Murphy, N., E. Millar, and C.S. Lee, *Gene expression profiling in breast cancer: towards individualising patient management*. Pathology, 2005. **37**(4): p. 271-7.
133. Ross, J.S., et al., *The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy*. Oncologist, 2003. **8**(4): p. 307-25.
134. Cristofanilli, M., et al., *Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(7): p. 1420-30.
135. Riethdorf, S., et al., *Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(3): p. 920-8.
136. Gilbey, A.M., et al., *The detection of circulating breast cancer cells in blood*. J Clin Pathol, 2004. **57**(9): p. 903-11.
137. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
138. Weigelt, B., et al., *Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer*. Cancer Res, 2005. **65**(20): p. 9155-8.
139. Dammann, R., T. Takahashi, and G.P. Pfeifer, *The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas*. Oncogene., 2001. **20**(27): p. 3563-7.
140. Bae, Y.K., et al., *Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 5998-6005.
141. Janicke, F., et al., *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, 2001. **93**(12): p. 913-20.
142. Pakneshan, P., M. Szyf, and S.A. Rabbani, *Hypomethylation of urokinase (uPA) promoter in breast and prostate cancer: prognostic and therapeutic implications*. Curr Cancer Drug Targets, 2005. **5**(7): p. 471-88.
143. Pakneshan, P., B. Tetu, and S.A. Rabbani, *Demethylation of urokinase promoter as a prognostic marker in patients with breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(9): p. 3035-41.
144. Chen, C.M., et al., *Methylation target array for rapid analysis of CpG island hypermethylation in multiple tissue genomes*. Am J Pathol, 2003. **163**(1): p. 37-45.

145. Chow, L.W., et al., *Aberrant methylation of cyclooxygenase-2 in breast cancer patients*. Biomed Pharmacother, 2005. **59 Suppl 2**: p. S264-7.
146. Klopocki, E., et al., *Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors*. Int J Oncol, 2004. **25**(3): p. 641-9.
147. Maier, S., et al., *DNA-methylation of the homeodomain transcription factor PITX2 reliably predicts risk of distant disease recurrence in tamoxifen-treated, node-negative breast cancer patients--Technical and clinical validation in a multi-centre setting in collaboration with the European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC) PathoBiology group*. Eur J Cancer, 2007. **43**(11): p. 1679-86.
148. Amendt, B.A., E.V. Semina, and W.L. Alward, *Rieger syndrome: a clinical, molecular, and biochemical analysis*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(11): p. 1652-66.
149. Gage, P.J., H. Suh, and S.A. Camper, *Dosage requirement of Pitx2 for development of multiple organs*. Development, 1999. **126**(20): p. 4643-51.
150. Arakawa, H., et al., *Identification and characterization of the ARP1 gene, a target for the human acute leukemia ALL1 gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4573-8.
151. Semina, E.V., et al., *Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome*. Nat Genet, 1996. **14**(4): p. 392-9.
152. Kioussi, C., et al., *Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin --> Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development*. Cell, 2002. **111**(5): p. 673-85.
153. Shiratori, H., et al., *Two-step regulation of left-right asymmetric expression of Pitx2: initiation by nodal signaling and maintenance by Nkx2*. Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 137-49.
154. Schweickert, A., et al., *Pitx2 isoforms: involvement of Pitx2c but not Pitx2a or Pitx2b in vertebrate left-right asymmetry*. Mech Dev, 2000. **90**(1): p. 41-51.
155. Toyota, M., et al., *Methylation profiling in acute myeloid leukemia*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2823-9.
156. Li, Q., et al., *Estrogen receptor methylation is associated with improved survival in adult acute myeloid leukemia*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(5): p. 1077-84.
157. Leu, Y.W., et al., *Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8184-92.
158. Chang, H.G., et al., *Tamoxifen-resistant breast cancers show less frequent methylation of the estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha gene*. J Mol Med, 2005. **83**(2): p. 132-9.
159. Nunez, A.M., et al., *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, 1989. **8**(3): p. 823-9.
160. Ruibal, A., et al., *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, 1999. **14**(3): p. 186-8.

161. Foekens, J.A., et al., *Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status*. *Cancer Res*, 1990. **50**(13): p. 3832-7.
162. Foekens, J.A., et al., *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*, 1990. **37**(6): p. 815-21.
163. Schwartz, L.H., et al., *pS2 expression and response to hormonal therapy in patients with advanced breast cancer*. *Cancer Res*, 1991. **51**(2): p. 624-8.
164. Martin, V., et al., *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*, 1995. **157**(1-2): p. 261-4.
165. Martin, V., et al., *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*, 1997. **65**(1): p. 95-106.
166. Gowher, H., O. Leismann, and A. Jeltsch, *DNA of Drosophila melanogaster contains 5-methylcytosine*. *Embo J*, 2000. **19**(24): p. 6918-23.
167. Fraga, M.F., et al., *High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(11): p. 1677-81.
168. Stach, D., et al., *Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(2): p. E2.
169. Sano, H., H.D. Royer, and R. Sager, *Identification of 5-methylcytosine in DNA fragments immobilized on nitrocellulose paper*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(6): p. 3581-5.
170. Gonzalzo, M.L., et al., *Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR*. *Cancer Res.*, 1997. **57**(4): p. 594-9.
171. Toyota, M., et al., *Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification*. *Cancer Res.*, 1999. **59**(10): p. 2307-12.
172. Costello, J.F., D.J. Smiraglia, and C. Plass, *Restriction landmark genome scanning*. *Methods*, 2002. **27**(2): p. 144-9.
173. Huang, T.H., M.R. Perry, and D.E. Laux, *Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells*. *Hum Mol Genet.*, 1999. **8**(3): p. 459-70.
174. Feltus, F.A., et al., *Predicting aberrant CpG island methylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p. 12253-8.
175. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
176. Laird, P.W., *The power and the promise of DNA methylation markers*. *Nat Rev Cancer.*, 2003. **3**(4): p. 253-66.
177. Lewin, J., et al., *Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates*. *Bioinformatics.*, 2004. **20**(17): p. 3005-12. Epub 2004 Jul 9.

178. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
179. Dietrich, D., et al., *Analysis of DNA Methylation of Multiple Genes in Microdissected Cells From Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues*. J Histochem Cytochem, 2009.
180. Nimmrich, I., et al., *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, 2008. **111**(3): p. 429-37.
181. Warnecke, P.M., et al., *Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(21): p. 4422-6.
182. Shen, L., et al., *Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis*. Biotechniques, 2007. **42**(1): p. 48, 50, 52 passim.
183. Wojdacz, T.K. and L.L. Hansen, *Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay*. Biotechniques, 2006. **41**(3): p. 274, 276, 278.
184. Leipe, D.D., et al., *Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases*. J Mol Biol, 2002. **317**(1): p. 41-72.
185. Kremer, B.E., T. Haystead, and I.G. Macara, *Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(10): p. 4648-59.
186. Nagata, K., et al., *Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in human mammary epithelial cells depends on interactions with microtubules*. J Biol Chem, 2003. **278**(20): p. 18538-43.
187. Spiliotis, E.T. and W.J. Nelson, *Here come the septins: novel polymers that coordinate intracellular functions and organization*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 1): p. 4-10.
188. Surka, M.C., C.W. Tsang, and W.S. Trimble, *The mammalian septin MSF localizes with microtubules and is required for completion of cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3532-45.
189. Grutzmann, R., et al., *Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay*. PLoS ONE, 2008. **3**(11): p. e3759.
190. Scott, M., et al., *Multimodality expression profiling shows SEPT9 to be overexpressed in a wide range of human tumours*. Oncogene, 2005. **24**(29): p. 4688-700.
191. Scott, M., et al., *Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis*. Int J Cancer, 2006. **118**(5): p. 1325-9.
192. Amir, S., et al., *MSF-A interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha and augments hypoxia-inducible factor transcriptional activation to affect tumorigenicity and angiogenesis*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 856-66.
193. Gonzalez, M.E., et al., *High SEPT9\_v1 expression in human breast cancer cells is associated with oncogenic phenotypes*. Cancer Res, 2007. **67**(18): p. 8554-64.
194. Chen, W.D., et al., *Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(15): p. 1124-32.

195. Nabholz, J.M. and A. Riva, *Taxane/anthracycline combinations: setting a new standard in breast cancer?* *Oncologist*, 2001. **6 Suppl 3**: p. 5-12.
196. Jones, R.L., C. Swanton, and M.S. Ewer, *Anthracycline cardiotoxicity*. *Expert Opin Drug Saf*, 2006. **5**(6): p. 791-809.
197. Paska, C., et al., *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*, 2004. **13**(4): p. 234-40.
198. Srinivasan, M., D. Sedmak, and S. Jewell, *Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(6): p. 1961-71.
199. Banaschak, S., B. Rolf, and B. Brinkmann, *Influence of different staining techniques on the DNA analysis of histological sections*. *Int J Legal Med*, 2000. **113**(2): p. 114-6.
200. Bian, Y.S., et al., *Promoter methylation analysis on microdissected paraffin-embedded tissues using bisulfite treatment and PCR-SSCP*. *Biotechniques*, 2001. **30**(1): p. 66-72.
201. Millar, D.S., et al., *Methylation sequencing from limiting DNA: embryonic, fixed, and microdissected cells*. *Methods*, 2002. **27**(2): p. 108-13.
202. Uchida, T., et al., *Clonality analysis by methylation-specific PCR for the human androgen-receptor gene (HUMARA-MSP)*. *Leukemia*, 2000. **14**(1): p. 207-12.
203. Dietrich, D., et al., *[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 Pathol*, 2007. **91**: p. 197-207.
204. Veeck, J., et al., *Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis*. *Oncogene*, 2006. **25**(24): p. 3479-88.
205. Schwartz, D.R., et al., *Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas*. *Cancer Res*, 2003. **63**(11): p. 2913-22.
206. Kim, J.S., et al., *Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(10): p. 2744-8.
207. Liu, W., et al., *Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration*. *Development*, 2003. **130**(25): p. 6375-85.
208. Cushman, L.J., A.D. Showalter, and S.J. Rhodes, *Genetic defects in the development and function of the anterior pituitary gland*. *Ann Med*, 2002. **34**(3): p. 179-91.
209. Suh, H., et al., *Pitx2 is required at multiple stages of pituitary organogenesis: pituitary primordium formation and cell specification*. *Development*, 2002. **129**(2): p. 329-37.
210. Tremblay, J.J., C.G. Goodyer, and J. Drouin, *Transcriptional properties of Ptx1 and Ptx2 isoforms*. *Neuroendocrinology*, 2000. **71**(5): p. 277-86.
211. Hartmann, O., et al., *DNA methylation markers predict outcome in node-positive, estrogen receptor-positive breast cancer with adjuvant*

- anthracycline-based chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(1): p. 315-23.
212. Hauge, H., S. Patzke, and H.C. Aasheim, *Characterization of the FAM110 gene family*. Genomics, 2007. **90**(1): p. 14-27.
213. Pfeifer, G.P. and R. Dammann, *Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(5): p. 576-83.
214. Rabbani, S.A. and A.P. Mazar, *The role of the plasminogen activation system in angiogenesis and metastasis*. Surg Oncol Clin N Am, 2001. **10**(2): p. 393-415, x.
215. Carmeliet, P., et al., *Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation*. Nat Genet, 1997. **17**(4): p. 439-44.
216. Sidenius, N. and F. Blasi, *The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(2-3): p. 205-22.
217. Duffy, M.J., *The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy*. Curr Pharm Des, 2004. **10**(1): p. 39-49.
218. Pulukuri, S.M., et al., *Demethylation-linked activation of urokinase plasminogen activator is involved in progression of prostate cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(3): p. 930-9.
219. Jakowlew, S.B., et al., *Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7*. Nucleic Acids Res, 1984. **12**(6): p. 2861-78.
220. Marchbank, T., et al., *Dimerization of human pS2 (TFF1) plays a key role in its protective/healing effects*. J Pathol, 1998. **185**(2): p. 153-8.
221. Prest, S.J., F.E. May, and B.R. Westley, *The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells*. Faseb J, 2002. **16**(6): p. 592-4.
222. Burrows, J.F., et al., *Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia*. J Pathol, 2003. **201**(4): p. 581-8.
223. McDade, S.S., P.A. Hall, and S.E. Russell, *Translational control of SEPT9 isoforms is perturbed in disease*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(7): p. 742-52.
224. Lacroix, M. and G. Leclercq, *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update*. Breast Cancer Res Treat, 2004. **83**(3): p. 249-89.
225. Goldhirsch, A., et al., *Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007*. Ann Oncol, 2007. **18**(7): p. 1133-44.
226. Levine, M.N., et al., *A pilot study of intensive cyclophosphamide, epirubicin and fluorouracil in patients with axillary node positive or locally advanced breast cancer*. Eur J Cancer, 1992. **29A**(1): p. 37-43.
227. Kummel, S., et al., *Dose-dense chemotherapy for primary breast cancer*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2007. **19**(1): p. 75-81.
228. Pritchard, K.I., et al., *HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy*. N Engl J Med, 2006. **354**(20): p. 2103-11.
229. Satsu, H., et al., *Functional characterization and regulation of the taurine transporter and cysteine dioxygenase in human hepatoblastoma HepG2 cells*. Biochem J, 2003. **375**(Pt 2): p. 441-7.

230. Wu, Q.D., et al., *Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. C1229-38.
231. Condron, C., et al., *Taurine attenuates calcium-dependent, Fas-mediated neutrophil apoptosis*. Shock, 2003. **19**(6): p. 564-9.
232. Takatani, T., et al., *Taurine inhibits apoptosis by preventing formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome*. Am J Physiol Cell Physiol, 2004. **287**(4): p. C949-53.
233. Warskulat, U., et al., *Taurine deficiency and apoptosis: findings from the taurine transporter knockout mouse*. Arch Biochem Biophys, 2007. **462**(2): p. 202-9.
234. Oien, D.B. and J. Moskovitz, *Ablation of the mammalian methionine sulfoxide reductase A affects the expression level of cysteine deoxygenase*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(2): p. 556-9.
235. Staub, E., et al., *A genome-wide map of aberrantly expressed chromosomal islands in colorectal cancer*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 37.
236. Ueki, I. and M.H. Stipanuk, *Enzymes of the taurine biosynthetic pathway are expressed in rat mammary gland*. J Nutr, 2007. **137**(8): p. 1887-94.
237. Namba, R., et al., *Molecular characterization of the transition to malignancy in a genetically engineered mouse-based model of ductal carcinoma in situ*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(8): p. 453-63.
238. Piccart-Gebhart, M.J., *Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(20): p. 2177-9.
239. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1350-4.