

**Quantifizierung von zirkulierenden
mikroRNAs im Blut von
Mammakarzinom-Patientinnen und ihre
Evaluierung als neuer Blut-basierter
Tumormarker**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Corinna Eichelser
aus Heidelberg

Hamburg 2013

**Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. H. SCHWARZENBACH
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. U. WIENAND
Tag der Disputation: 10. Januar 2014**

Hamburg, den 16. Dezember 2013



**Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie**

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Tumorbiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in der Zeit von Mai 2010 bis November 2013 unter der wissenschaftlichen Anleitung von Frau PD Dr. Schwarzenbach ausgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schwarzenbach H, Eichelser C, Kropidlowski J, Janni W, Rack B and Pantel K. (2012). “Loss of heterozygosity at tumor suppressor genes detectable on fractionated circulating cell-free tumor DNA as indicator of breast cancer progression.“ **Clin Cancer Res.** 18 (20): 5719-30.

Eichelser C, Flesch-Janys D, Chang-Claude J, Pantel K and Schwarzenbach H. (2013). “Deregulated Serum Concentrations of Circulating Cell-Free MicroRNAs miR-17, miR-34a, miR-155, and miR-373 in Human Breast Cancer Development and Progression.“ **Clin Chem.** 59 (10): 1489-96.

Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Udo Wienand
PD. Dr. Heidi Schwarzenbach
Gutachter der Disputation: Prof. Dr. Stefan Hoth
Prof. Dr. Klaus Pantel

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ac-pre-miR	<i>Ago2-cleaved-pre-miR</i>
Ago2	<i>Argonaute-2</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	<i>Area under the Curve</i>
BAG1	<i>BCL2 associated Athano-Gene 1</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BORIS	<i>Brother of Regulator of Imprinted Sites</i>
bp	Basenpaar
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCR4	<i>Chemokine (C-C motif) Receptor 4</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CI	<i>Confidence Interval</i>
cm	Zentimeter
CT	<i>Cycle Treshold</i>
CTA	<i>Cancer-Testis Antigen</i>
cTNM	klinischer TNM
Da	Dalton
DGCR8	<i>DiGeorge Critical Region 8</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzungsverzeichnis

DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	<i>Desoxynucleoside Triphosphate Set</i>
ds	Doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eIF	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor</i>
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
EpCAM	<i>Epithelial Cell Adhesion Molecule</i>
ER	Estrogen-Rezeptor
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required For Transport</i>
et al.	<i>et alii/at aliae</i>
EtOH	Ethanol
FCS	<i>Fetal Calf Sera</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GLIPR1	<i>Glioma Pathogenesis-related Protein 1</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSTM1	<i>Glutathione S-transferase Mu 1</i>
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HBP1	<i>HMG Box-containing Protein 1</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HER2	<i>Human Epiderman Growth Factor Receptor 2</i>
HMG	<i>High Mobility Group</i>
IF γ	Interferon γ
IHC	Immunhistochemie
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>
IRS	<i>Immunoreactive Score</i>
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
LINE1	<i>Long Interspersed Element 1</i>
LOH	Verlust der Heterozygotität (<i>Loss of Heterozygosity</i>)
μ	micro = 10^{-6}

Abkürzungsverzeichnis

µg	Microgramm
µl	Microliter
µm	Micrometer
µM	Micromolar
m	milli = 10^{-3}
M	Molar, Fernmetastasen
M0	Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom
M1	Patientinnen mit Fernmetastasen
MAGE-A	Melanoma Antigen Family A
MAGI-2	<i>Membran-Associated Guanylate Kinase</i>
MARIE	Mammakarzinom-Risikofaktoren-Erhebung
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
miR	mikroRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MVBs	<i>Multivesicular Bodies</i>
MW	Molekulargewicht
n	nano = 10^{-9}
N	Regionäre Lymphknotenmetastasen
nm	Nanometer
NOS	Karzinom sonst nicht spezifiziert
OD	Optische Dichte
p	Pico = 10^{-12}
PABPC	<i>Cytoplasmic Poly(A) Binding Protein</i>
PACT	<i>Protein Activator of PKR</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKR	<i>Protein Kinase RNA-activated</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteron-Rezeptor
pre-miR	<i>Precursor-miR</i>
pri-miR	Primäre-miR
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>

Abkürzungsverzeichnis

pTNM	pathologischer TNM
qPCR	quantitative PCR
Ran	<i>Ras-Related Nuclear Protein</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
RBP	<i>RNA-binding Protein</i>
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RLC	<i>RISC Loading Complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNA Pol	RNA Polymerase
RNase	Ribonuklease
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Sec	Sekunde
SOCS1	<i>Supressor of Cytokine Signaling 1</i>
Std	Stunde
T	Primärtumor
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIG1	<i>Tazarotene Induced Gene 1</i>
TNM	Tumor, Nodal, Metastasen
TOPO 2A	Topoisomerase II α
TRBP	<i>Tar RNA Binding Protein</i>
U	<i>Unit</i> = definierte Enzymeinheit
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UTR	<i>Untranslated Region</i>
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol	Volumen
WHO	<i>World Health Organisation</i>
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

1.1 Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien bei der Brustdrüsenentwicklung.	4
1.2 Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade.	13
1.3 Schematische Darstellung der miR Biogenese.	16
1.4 Mechanismen der miR-vermittelten Repression der Genexpression.	18
1.5 Schematische Darstellung der zellfreien Nukleinsäuren im Blut.	24
1.6 Schematische Darstellung Biogenese der Exosomen.	29
4.1 Quantifizierung der zirkulierenden Gesamt-RNA im Serum von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen.	85
4.2 Quantifizierung der relativen miR-Konzentrationen im Serum von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen.	87
4.3 Quantifizierung der relativen miR-Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit einem ER ⁺ /PR ⁺ Mammakarzinom vor und nach einer Chemotherapie.	89
4.4 Quantifizierung der relativen miR-Konzentrationen im Serum von Mammakarzinompatientinnen.	91
4.5 Die miR-155 Expression in basalen und mit TSA und 5'-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen.	93
4.6 Repression der CD44 Proteinexpression durch miR-373 Überexpression.	95
4.7 Quantifizierung der zellfreien miR-101, miR-372 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom oder benigner Brustkrankung und von gesunden Frauen.	97
4.8 Quantifizierung der zellfreien miR-101 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit luminalem, HER2 ⁺ und basal-ähnlichen Mammakarzinom, sowie von gesunden Frauen.	98
4.9 Inverse Assoziation der zellfreien miR-101 Konzentrationen mit dem Lymphknotenstatus bei präoperativen Mammakarzinompatientinnen.	99
4.10 Nachweis des Exosomen-spezifischen CD63 Proteins im Serum.	104

4.11 Quantifizierung der exosomalen miR-101, miR-372 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom und gesunden Frauen.	105
4.12 Quantifizierung der exosomalen miR-373 Konzentrationen im präoperativen Serum von Patientinnen mit unterschiedlichen Subtypen und Rezeptorstatus. . . .	106
4.13 Estrogen-Rezeptor mRNA- und Proteinexpression nach miR-373 Überexpression.	108
4.14 Inhibierung der durch Camptothecin vermittelten Apoptose durch eine miR-373 Überexpression.	109
4.15 MiR-373 hat keine Auswirkungen auf die Proliferation von Mammakarzinomzellen.	110
4.16 Übersicht der aus der SUCCESS-Studie ausgewählten und analysierten Patientinnen.	112
4.17 Agarosegelelektrophorese der hoch- und niedrigmolekularen DNA-Fraktion aus Plasma.	114
4.18 Fluoreszenz-markierte PCR-Produkte, die durch kapillare Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.	115
4.19 Verdünnungsreihe der Plasma-DNA mit Wildtyp-DNA aus Leukozyten.	116
4.20 Vergleich der LOH-Häufigkeiten in Mammakarzinompatientinnen an acht verschiedenen Mikrosatellitenmarkern in den hoch- und niedrigmolekularen, sowie den beiden kombinierten Plasma-DNA-Fractionen.	117
4.21 Vergleich der LOH-Häufigkeit an acht verschiedenen Mikrosatellitenmarkern in den hoch- und niedrigmolekularen Plasma-DNA-Fractionen in Mammakarzinompatientinnen vor und nach einer Chemotherapie.	118
4.22 LOH im Plasma von Mammakarzinompatientinnen an dem Marker D12S1725 korreliert mit dem Gesamtüberleben.	121
4.23 Durchflusszytometrische Analyse der Boris-Expression in MCF-7 Zellen.	122
4.24 Epigenetischer Effekt von Boris auf den MAGE-A1 Promotor.	123

Tabellenverzeichnis

1.1 Überblick über die klinische TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms.	6
1.2 Überblick über die molekulare Klassifikation.	9
1.3 Behandlungsempfehlungen für die Subtypen des Mammakarzinoms.	11
4.1 Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und ihre Korrelation mit den relativen miR-Konzentrationen im postoperativen Serum.	84
4.2 Sensitivität und Spezifität (%) der relativen miR-Konzentrationen.	88
4.3 Zusammenfassung der signifikanten Unterschiede zwischen den Serumkonzentrationen der miRs und den klinischen und pathologischen Risikofaktoren der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms.	92
4.4 Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und ihre Korrelationen mit den relativen miR-Konzentrationen im präoperativen Serum.	100
4.5 Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und ihre Korrelationen mit den relativen exosomalen miR-Serumkonzentrationen.	102
4.6 Beziehung zwischen dem Verlust der Heterozygotität an acht verschiedenen Markern in den beiden Plasma DNA-Fraktionen und den klinischen und histopathologischen Parametern.	113
4.7 Zusammenfassung der Korrelationen zwischen den Marker-spezifischen Verlusten der Heterozygotität und den klinisch-pathologischen Parametern der Patientinnen, die durch den Mann-Whitney <i>U</i> Test ermittelt wurden.	119

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Mammakarzinom	3
1.1.1 Die Mamma - Aufbau und Entwicklung	3
1.1.2 Das Mammakarzinom	5
1.1.3 Behandlung des Mammakarzinoms	10
1.1.4 Metastasierung des Mammakarzinoms	12
1.2 mikroRNAs (miRs) - Biogenese und Funktion	14
1.2.1 Biogenese der mikroRNAs	14
1.2.2 MikroRNA-vermittelte Repression der Genexpression	17
1.2.3 Analysierte mikroRNAs und ihre Rolle in der Karzinogenese des Mammakarzinoms	19
1.2.4 MikroRNAs in der Therapie des Mammakarzinoms	22
1.3 Zirkulierende Nukleinsäuren als potenzielle Tumormarker	23
1.3.1 Zirkulierende DNA	24
1.3.2 Zirkulierende mikroRNAs	26
1.4 Exosomen	27
1.4.1 Biogenese der Exosomen	28
1.4.2 Exosomen in der Karzinogenese	30
1.5 Fragestellung	32

2	Material	34
2.1	Patientenmaterial	34
2.1.1	SUCCESS-Studie: Kollektiv für die LOH-Analysen	34
2.1.2	Kollektive für die mikroRNA-Analysen	35
2.2	Chemikalien und Reagenzien	36
2.2.1	Enzyme und Längenstandards	36
2.2.2	Chemikalien	37
2.2.3	Kits	39
2.3	Verbrauchsmaterialien	40
2.4	Geräte	41
2.5	Lösungen	43
2.6	Medien, Agarplatten und verwendete Antibiotika	46
2.6.1	Medien für Bakterien	46
2.6.2	Agarplatten	46
2.6.3	Medien und Zusätze für die Zellkultur	46
2.7	Biologische Materialien	47
2.7.1	Bakterienstämme	47
2.7.2	Humane Zelllinien	47
2.7.3	Synthetische DNA-Oligonukleotide	48
2.7.4	Antikörper	53
2.7.5	Plasmide und Vektoren	54
2.7.6	Restriktionsenzyme	55
2.7.7	Datenbanken und Software	55
3	Methoden	56
3.1	Zellkultur	56
3.1.1	Kultivierung von Zelllinien	56
3.1.2	Behandlung der Zellen mit Trichostatin A und 5-Aza-2'-Deoxycytidin	57
3.1.3	Transfektion von Zelllinien	57
3.1.4	Behandlung der Zellen mit Camptothecin	58
3.1.5	Zellernte	59
3.1.6	Proliferationsassay	59
3.1.7	Mykoplasmentest	60
3.2	Isolierung von Leukozyten aus Vollblut	60
3.3	Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren	61
3.3.1	Isolierung genomischer DNA	61

3.3.2	Isolierung der Gesamt-RNA	62
3.3.3	Minipräparation von Plasmid-DNA	62
3.3.4	Maxipräparation von Plasmid-DNA	63
3.3.5	Konzentrationsbestimmung und Reinheitsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren	63
3.4	Isolierung und Reinigung von Proteinen	64
3.4.1	Proteinbestimmung mit dem DC Protein Assay Kit	64
3.5	Klonierungstechniken	64
3.5.1	Hybridisierung von Oligonukleotiden und Auffüllen der Überhänge	65
3.5.2	Restriktionsverdau	65
3.5.3	Ligation	67
3.5.4	Hitzetransformation kompetenter Bakterien	67
3.5.5	TOPO® TA Klonierung	68
3.6	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	68
3.6.1	Reverse Transkription	68
3.6.2	Preamplifikation	69
3.6.3	PCR	70
3.6.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	72
3.6.5	Sequenzierung	75
3.7	Gelelektrophorese	76
3.7.1	Agarosegele	76
3.7.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	76
3.8	Western Blot	77
3.8.1	Transfer eines SDS-Polyacrylamidgels auf eine Membran	77
3.8.2	Immundetektion	77
3.8.3	Strippen	78
3.9	Durchflusszytometrie	78
3.9.1	Durchflusszytometrische Messung der Apoptose	79
3.9.2	Durchflusszytometrische Sortierung	79
3.10	Natriumbisulfit-Behandlung der DNA	80
3.11	Präzipitation der Exosomen	81
3.12	Luciferase-Assay	81
3.13	Statistische Auswertung	82

4 Ergebnisse	83
4.1 Differenzielle Serumkonzentrationen der miR-17, miR-34a, miR-155 und miR-373 während der Entwicklung und Progression des Mammakarzinoms	83
4.1.1 Quantifizierung der zirkulierenden RNA in Mammakarzinompatientinnen	83
4.1.2 MiR-16 als endogene Kontrolle für das Kollektiv der MARIE-Studie	86
4.1.3 Quantifizierung der zirkulierenden miRs im Serum von Patientinnen mit primärem und metastatisiertem Mammakarzinom	86
4.1.4 Quantifizierung der zirkulierenden miRs bei ER- und PR-positiven Mammakarzinompatientinnen vor und nach einer Chemotherapie	88
4.1.5 Korrelationen der miRs mit den klinischen und pathologischen Risikofaktoren	89
4.1.6 Die miR-155 Expression kann durch DNA-Demethylierung induziert werden	92
4.1.7 MiR-373 reprimiert die CD44-Proteinexpression	94
4.2 Die zirkulierenden zellfreien und exosomalen miR-101, miR-371, miR-372 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Mammakarzinompatientinnen	95
4.2.1 MiR-16 und miR-484 als endogene Kontrollen und cel-39 als <i>spike-in</i> Kontrolle	96
4.2.2 Quantifizierung der zellfreien miR-101, miR-371, miR-372 und miR-373 im präoperativen Serum von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom oder gutartigen Brusterkrankungen	96
4.2.3 Quantifizierung der exosomalen miR-101, miR-372 und miR-373 im Serum von Mammakarzinompatientinnen	101
4.2.4 MiR-373 inhibiert die Estrogen-Rezeptor-Proteinexpression	107
4.2.5 MiR-373 inhibiert die Camptothecin induzierte Apoptose	108
4.3 Detektion des Verlustes der Heterozygotität von Tumorsuppressorgenen in fraktionierter, zirkulierender Tumor-DNA	111
4.3.1 Patientenkollektiv der SUCCESS Studie	111
4.3.2 Quantifizierung zellfreier DNA im Plasma	114
4.3.3 Der Verlust der Heterozygotität in der niedrigmolekularen DNA-Fraktion und der hochmolekularen Fraktion im Plasma	115
4.3.4 Häufigkeit des Verlustes der Heterozygotität vor und nach der Chemotherapie	118

4.3.5	Assoziation des Verlustes der Heterozygotität mit den Risikofaktoren der Mammakarzinompatientinnen	119
4.3.6	Prognostischer Nutzen der Detektion des Verlustes der Heterozygotität in zirkulierender, zellfreier DNA	120
4.4	Epigenetische Untersuchung des MAGE-A1 Promotors	121
5	Diskussion	124
5.1	Die Serumkonzentrationen der zirkulierenden, zellfreien mikroRNAs miR-17, miR-34a, miR-155 und miR-373 sind in der Mammakarzinomentwicklung und -Progression verändert	125
5.2	Die exosomalen miR-373 Serumkonzentrationen sind in basal-ähnlichen sowie Estrogen- und Progesteron- Rezeptor-negativen Mammakarzinompatientinnen erhöht	130
5.3	Der Verlust der Heterozygotität von Tumorsuppressorgenen in fraktionierter, zirkulierender Tumor-DNA als Indikator für die Mammakarzinomprogression	134
5.4	BORIS ist ein epigenetischer Regulator von MAGE-A1	138
5.5	Fazit und Ausblick	139
	Literaturverzeichnis	141
	Danksagung	167

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist trotz Fortschritten in der Früherkennung und Behandlung, die Hauptursache für den krebsbedingten Tod von Frauen weltweit. Dabei ist eine optimale, individuelle Therapie für die Patientinnen wichtig, die momentan hauptsächlich auf der molekularen Klassifikation des Mammakarzinoms beruht. Um invasive Gewebebiopsien und Feinnadelaspirationen zu vermeiden, ist es von Interesse, einen Blut-basierenden Marker, der sich als „flüssige Biopsie“ eignen könnte, zu etablieren. Die Konzentrationen von zirkulierenden Nukleinsäuren, wie DNA und RNA, im Blut von Tumorpatienten können durch passive (nekrotische und apoptotische) und aktive (Sekretion) Prozesse der Tumorzellen beeinflusst werden. Auf Grund ihrer Stabilität im Blut und ihrer vielfältigen Aufgaben in der Karzinogenese, wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation zirkulierende mikroRNAs (miRs) im Serum von Mammakarzinompatientinnen quantifiziert.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die relativen Serumkonzentrationen von sechs mikroRNAs (miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373) mittels Real-Time PCR bei gesunden Frauen und postoperativen Mammakarzinompatientinnen quantifiziert. Die Analysen zeigten einen signifikanten Anstieg der zirkulierenden miR-34a und miR-93 im Serum von postoperativen Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen und eine Verringerung der Konzentrationen der miR-17 und miR-155 in metastasierten Patientinnen. Die Serumkonzentrationen der miR-373 waren signifikant höher bei Patientinnen mit einem primären oder metastasierten Mammakarzinom als bei gesunden Frauen und signifikant mit dem HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor) Status der Mammakarzinome assoziiert. In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Proteinexpression des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 durch miR-373 inhibiert wurde, was die beschriebene Assoziation des Verlustes von CD44 mit der Induktion von Lungenmetastasen erklären könnte.

Auf Grund dieser interessanten Aspekte wurden die Konzentrationen der zirkulierenden miR-373 in präoperativen Serumproben von Patientinnen mit einer benignen Brustkrankung und von Patientinnen mit einem invasiven Mammakarzinom quantifiziert. MiR-373 liegt mit miR-371 und miR-372 in einem chromosomalen Cluster. Um mehr über die Expression des Clusters zu erfahren, wurden miR-371, miR-372, miR-373 und zusätzlich miR-101 untersucht. MiR-101 wurde wegen ihrer Rolle im Estrogen-unabhängigen Wachstum von Mammakarzinomzelllinien ausgewählt. Die miR-101 und miR-373 Serumkonzentrationen waren signifikant unterschiedlich zwischen Patientinnen mit einem Mammakarzinom und einer gutartigen Brustkrankung.

kung. Obwohl miR-371, miR-372 und miR-373 im gleichen Cluster liegen, konnte die zirkulierende miR-371 im Serum nicht nachgewiesen werden, während sich die Serumkonzentrationen der miR-372 zwischen den Patientinnen mit einer benignen und malignen Krankheit nicht unterschieden.

Die Konzentrationen dieser mikroRNAs wurden zudem in Exosomen untersucht, da mikroRNAs auch durch aktive Sekretion der Zellen ins Blut ausgeschüttet werden. Interessant sind die hohen exosomalen Serumkonzentrationen der miR-101, miR-372 und miR-373, die vermuten lassen, dass miR-101, miR-372 und miR-373 vorwiegend in Exosomen im Blut zirkulieren. In den Exosomen waren die Mengen der miR-101 und miR-372 tumorspezifisch bei Mammakarzinompatientinnen erhöht. Die zirkulierenden, exosomalen Konzentrationen der miR-373 waren höher bei Estrogen-Rezeptor- und Progesteron-Rezeptor-negativen Tumoren als bei den entsprechenden Rezeptor-positiven Patientinnen. In funktionellen Studien konnte miR-373 zudem die Proteinexpression des Estrogen-Rezeptors inhibieren. Die Assoziation der exosomalen miR-373 mit den aggressiveren Rezeptor-negativen Mammakarzinomen konnte durch funktionelle Analysen unterstützt werden, in denen die miR-373 die durch den Topoisomerase Inhibitor Camptothecin induzierte Apoptose inhibieren konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die zellfreien miR-101 und miR-373 auf Grund ihrer Unterschiede in Patientinnen mit benignen Brustkrankungen und Mammakarzinomen als Mammakarzinom-spezifische Marker dienen könnten. Außerdem sind die Konzentrationen der miR-373 in Exosomen, wegen ihrer Assoziation mit den aggressiveren Subtypen des Mammakarzinoms, interessant. Exosomen werden als Transportvehikel beschrieben, die möglicherweise mikroRNAs in andere Zellen transferieren. Folglich könnte der horizontale Transfer von miR-373 die Expression des Estrogen-Rezeptors in der Empfängerzelle inhibieren und die Zellen unempfindlich gegen die Estrogen-Rezeptor-gerichteten Therapien machen.

Neben diesen Studien wurden in einem Teilprojekt PCR-basierte Mikrosatellitenanalysen im Plasma von Mammakarzinompatientinnen durchgeführt. In diesen Analysen wurde der Verlust der Heterozygotität (LOH) an zirkulierenden Tumorsuppressoren untersucht und signifikante Korrelationen von LOH an den Markern TIG1, PTEN, Cyclin D2, RB1 und BRCA1 mit HER2-negativen Mammakarzinomen, Lymphknotenmetastasen und einem kürzeren Gesamtüberleben der Mammakarzinompatientinnen entdeckt. Demzufolge spielen nicht nur deregulierte mikroRNAs sondern auch LOH, die beide die Expression von Tumor-spezifischen Genen beeinflussen, in der Pathologie des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle.

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Die Mamma - Aufbau und Entwicklung

Die Brustdrüse besteht aus zwei Geweben, dem Epithelium mit Milchgängen und Milch-produzierenden lobulären Zellen, sowie dem Stroma, auch als Brustfettkörper bezeichnet. Die epithelialen Zellen bilden Ducti (Milchgänge) und Lobuli mit einem zentralen Lumen, das mit der Brustwarze verbunden ist [101].

Während der Embryogenese entstehen zunächst Milchgänge aus dem darüberliegenden Ektoderm, sowie einem Plakoden Paar, das durch Invagination Knospen bildet. Daraufhin wird die Bildung des Mesenchyms induziert und ein kleiner Kanal wächst in das dermale Mesenchym um die Brustwarze zu bilden [292, 101]. Die weitere Entwicklung der Brustdrüse beim Mann wird durch Androgene inhibiert. Bei der Frau wachsen die Knospen, verzweigen sich und werden in das subdermale Fettgewebe eingebunden [102].

Bis zur Pubertät wächst die Brustdrüse dem Körperwachstum entsprechend, was als allometrisches Wachstum bezeichnet wird. Es bilden sich zudem terminale Endknospen an den Spitzen der Milchgänge, die in das Fettgewebe eindringen. Diese bestehen aus einer äußeren Schicht von *cap*-Zellen, aus denen die Basalzellen hervorgehen und den zentral liegenden *body*-Zellen, aus denen die luminalen Zellen entstehen [101]. Mit Einsetzen der Pubertät steigen die Estrogen und Progesteron Serumkonzentrationen. Damit endet das allometrische Wachstum und die Proliferation innerhalb der terminalen Endknospen wird induziert (Abb. 1.1A). Dies führt zu einer dukталen Ausdehnung sowie einer Verzweigung der Milchgänge durch Teilung der Endknospen [304]. Estrogen und der Estrogen-Rezeptor α (ER α) regulieren entscheidend die Verzweigungsvorgänge [21]. Nach dem Erreichen des Endes des Fettkörpers verschwin-

den die terminalen Endknospen [304]. Zu diesem Zeitpunkt ist der Fettkörper mit primären und sekundären Gängen durchzogen, wobei die sekundären Milchgänge bei jedem Zyklus Seitenzweige entfernen und Neue bilden [101].

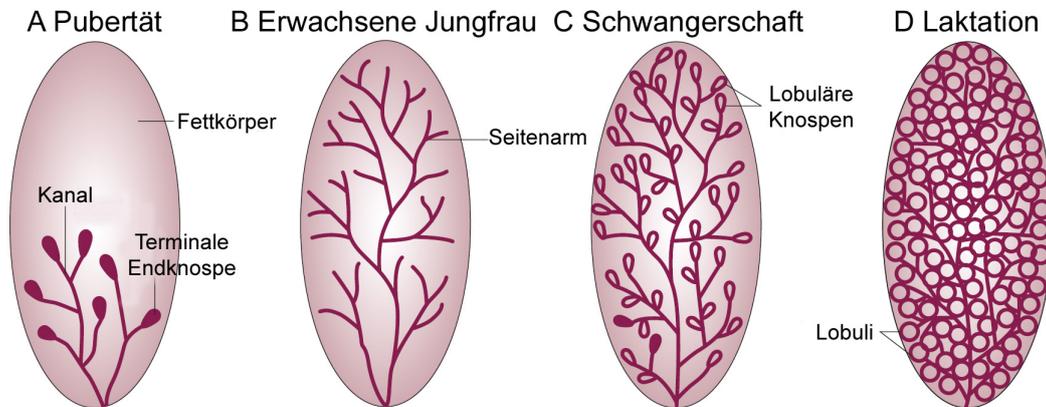


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien bei der Brustdrüsenentwicklung. Während der Pubertät entstehen terminale Endknospen, die zur Verzweigung und Ausdehnung der Kanäle führen (A). Die terminalen Endknospen verschwinden, sobald der Rand des Fettkörpers erreicht ist. In der erwachsenen Jungfrau wird der Fettkörper von primären und sekundären Kanälen ausgefüllt, sowie den Seitenarmen, die mit jedem Zyklus entfernt und neu gebildet werden (B). Mit Beginn der Schwangerschaft erhöht sich die Zellproliferation und es kommt zur Entstehung der lobulären Knospen (C). Mit Beginn der Laktation wachsen und differenzieren sie zu Milch-bildenden Lobuli (D). Modifiziert nach Hennighausen und Robinson (2005) [101].

Nach der Pubertät bilden sich aus den Knospen unter dem Einfluss von Progesteron und Prolaktin rudimentäre lobuläre Strukturen (Abb. 1.1B), die aber erst während der Schwangerschaft vollständig reifen [169, 190]. Während der Schwangerschaft induziert Progesteron die extensive Neubildung von Seitenzweigen sowie die Lobulogenese. In Kombination mit Prolaktin wird die Differenzierung der Lobuli gefördert (Abb. 1.1C). Sie differenzieren zu lobulären Strukturen, die in der Lage sind Milch zu produzieren (Abb. 1.1D) [199, 304]. Dabei sind luminale, sekretorische von myoepithelialen Zellen umgeben, die wiederum mit der Basalmembran verbunden sind [182]. Am Ende der Schwangerschaft füllt sich der luminale Raum, durch die schwangerschaftsbedingten erhöhten Progesteron Konzentrationen, mit Fett- und Milchproteinen zur Versorgung des Kindes. Nach der Laktation werden die nun überflüssigen lobulären Zellen durch Apoptose entfernt. Dieser Prozess, auch Involution genannt, bei dem ungefähr 80%

des Epitheliums in wenigen Tagen apoptotisch entfernt wird, ist das dramatischste Beispiel einer physiologisch regulierten Apoptose im erwachsenen Gewebe [51, 304]. Anschließend wird die einfache duktale Struktur wiederhergestellt [101].

1.1.2 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Obwohl intensive Forschung zur Verbesserung der Überlebensrate führte, bedingt das Mammakarzinom immer noch den häufigsten krebsverursachten Tod bei Frauen [122]. Eine der größten Herausforderungen für Ärzte und Forscher stellt die Heterogenität des Mammakarzinoms dar, bei der verschiedene Subtypen ein unterschiedliches klinisches und biologisches Verhalten zeigen [52]. Momentan existieren drei geläufige Taxonomien des Mammakarzinoms, die Einteilung nach dem TNM (Tumor-, Nodal-, Metastasen-) -Status [259], die histopathologische und die molekulare Klassifizierung [307]. Außerdem ist der Tumorgrad, der die Differenzierung des Karzinoms und die Proliferationsrate beschreibt, eine klinisch nützliche Messung, wobei eine starke Variabilität innerhalb des Tumors beobachtet werden kann [307].

Einteilung nach dem TNM-Status

Die ersten Richtlinien für eine Einteilung nach dem TNM-Status wurden 1959 von der UICC (*Union International Contre le Cancer*) publiziert. Es handelte sich dabei um eine klinische Stadieneinteilung [8]. Mittlerweile wurde die Klassifikation mehrfach überarbeitet und eine Beschreibung der Ausbreitung eines Mammakarzinoms hinzugefügt. Die drei charakterisierten Merkmalen sind die Größe des Mammakarzinoms (T), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) sowie von Fernmetastasen (M). In klinischen Studien wird der TNM-Status gemeinsam mit der molekularen Einteilung bei der Prognoseabschätzung herangezogen. Allerdings wird die Entscheidung einer adjuvanten Therapie zumeist unabhängig davon getroffen [259].

Es wird zwischen der klinischen (cTNM)- und der pathologischen (pTNM)-Klassifikation unterschieden. Zur Bestimmung des cTNM-Status wird das Mammakarzinom biopsiert und histologisch untersucht und/oder es liegen Befunde der klinischen Untersuchung sowie bildgebender Verfahren vor. Um den pTNM-Status zu ermitteln, muss

das Mammakarzinom operiert und das Gewebe, wie der Primärtumor, die Lymphknoten und mögliche Fernmetastasen histologisch untersucht werden. In Tabelle 1.1 ist die klinische Einteilung dargestellt [60].

Tabelle 1.1: Überblick über die klinische TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms.

Primärtumor (T)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Primärtumor nachweisbar
Tis	Karzinom <i>in situ</i>
Tis (DCIS)	Duktales Karzinom <i>in situ</i>
Tis (LCIS)	Lobuläres Karzinom <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Isolierter M. Paget der Mamille
T1	Mammakarzinom $\leq 20\text{mm}$
T1mi	$\leq 1\text{mm}$ (Mikroinvasion)
T1a	$> 1\text{mm} \leq 5\text{mm}$
T1b	$> 5\text{mm} \leq 10\text{mm}$
T1c	$> 10\text{mm} \leq 20\text{mm}$
T2	$> 20\text{mm} \leq 50\text{mm}$
T3	$> 50\text{mm}$
T4	Mammakarzinom jeder Größe mit Infiltration in die Brustwand und/oder Haut
T4a	Infiltration in die Brustwand und Befall der Rippen und/oder der Interkostalmuskulatur
T4b	Ödem oder Ulzerationen der Brusthaut oder kutane Tumorsatelliten
T4c	Kriterien für 4a und 4b zutreffend
T4d	Inflammatorisches Mammakarzinom
<hr/>	
Regionäre Lymphknotenmetastasen (N) ^a	
Nx	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Bewegliche Lymphknotenmetastasen in der unteren oder mittleren Achselhöhle
N2	Aneinander oder an anderen Strukturen fixierte Lymphknotenmetastasen in der unteren oder mittleren Achselhöhle; oder ausschließlich interne Lymphknotenmetastasen
N2a	Aneinander oder an anderen Strukturen fixierte Lymphknotenmetastasen in der unteren oder mittleren Achselhöhle

N2b	Ausschließlich interne Lymphknotenmetastasen
N3	Apikale Lymphknotenmetastase unterhalb des Schlüsselbeins
N3a	Lymphknotenmetastasen unterhalb des Schlüsselbeins
N3b	Interne Lymphknotenmetastasen der Mamma sowie axilläre Lymphknotenmetastasen
N3c	Lymphknotenmetastasen oberhalb des Schlüsselbeins
<hr/>	
Fernmetastasen (M)	
M0	Keine Fernmetastasen
cM0(i+)	Keine Fernmetastasen aber zirkulierende oder disseminierte Tumorzellen nachweisbar
M1	Fernmetastasen

a: Regionäre Lymphknoten filtern zuerst die Lymphe aus dem Organ. In der Mamma sind es die Lymphknoten unter- und oberhalb des Schlüsselbeins der gleichen Seite und der Achselhöhle.

Histologische Klassifizierung

In der aktuellen Auflage der WHO (*World Health Organisation*) werden mindestens 18 histologisch eindeutig unterscheidbare Arten des invasiven Mammakarzinoms beschrieben [307]. Das invasive, duktales Karzinom, sonst nicht spezifiziert (duktales NOS) umfasst mit 70-80% die größte Gruppe, die auf Grund ihrer Heterogenität nicht einheitlich klassifiziert werden kann. Die verbleibenden 25% sind histologisch spezielle Typen, die auch auf molekularer Ebene homogen sind [52, 305]. Allerdings sind die einzelnen Typen selten und konnten noch nicht in großen Studien untersucht werden. Zudem gilt der Tumor nur als rein, wenn über 90% seiner Masse einheitliche morphologische Eigenschaften zeigt, sonst handelt es sich um gemischte Typen. Die am häufigsten auftretenden histologischen Typen sind lobuläre, tubuläre, medulläre und metaplastische Karzinome.

Es wurde lange vermutet, dass verschiedene histologische Typen aus unterschiedlichen Strukturen der Mamma entstehen, wodurch die Begriffe des lobulären und duktales Mammakarzinoms geprägt wurden [307]. Es stellte sich später heraus, dass der Großteil der invasiven Brusttumore und ihre *in situ* Vorläufer aus derselben terminal, duktales und lobulären Einheit entstehen [309, 308]. Die Bedeutung des duktales bzw. lobulären Mammakarzinoms sagt nichts über den Ort der Entstehung aus, sondern wird auf Grund der speziellen Form, zytologischen Besonderheiten und immunhistochemischen Profilen festgelegt. Ein interessanter Subtyp ist das metaplastische

Mammakarzinom, bei dem häufig *BRCA1* (*Breast Cancer 1*), *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homolog*) und *TOPO 2A* (*Topoisomerase IIa*) herunterreguliert sind und der schlecht auf Chemotherapie anspricht. Allerdings wird die histologische Klassifizierung bei der Entscheidung über die Art der Therapie selten mit einbezogen [307].

Molekulare Klassifizierung

Die molekulare Einteilung des Mammakarzinoms basiert auf der Expression von ER (*Estrogen-Receptor*), PR (*Progesteron-Receptor*) und HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*), sowie dem Proliferationsmarker Ki-67. ER, PR und HER2 werden gewöhnlich mittels IHC (Immunhistochemie) bestimmt. Bei einer unklaren Expression von HER2, wird zusätzlich eine FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)-Analyse durchgeführt, bei der die Amplifikation des *HER2*-Gens detektiert wird. Rund 75-80% der Mammakarzinome sind ER⁺ und PR⁺ [52] und 10-15% exprimieren HER2 über, von denen die Hälfte einen der Hormonrezeptoren koexprimieren [137]. Die Therapie, die gegen diese Rezeptoren gerichtet ist, basiert auf dieser Klassifizierung. Die Tabelle 1.2 stellt die Kriterien für die in der Klinik geläufigen Subtypen dar.

Unterschiedliche Effizienzen der adjuvanten cytotoxischen Therapie führte zur Unterteilung des ER⁺ (ER-positiven), luminalen Tumors in luminal A und luminal B. Der luminal A Subtyp ist sensitiver für endokrine Wirkstoffe, zudem indolent und hat eine bessere Prognose. Der luminal B Typ ist weniger sensitiv für endokrine Therapien, aggressiver und hat eine schlechtere Prognose [82]. Der HER2 Subtyp wird in erster Linie durch die Überexpression oder Amplifikation des *HER2*-Gens definiert. Zudem ist er negativ für ER und PR [267]. Die basal-ähnlichen Mammakarzinome werden durch die Expression von Zytokeratinen charakterisiert, die in der Basalmembran der gesunden Mamma detektiert werden können [267]. Außerdem ist dieser Subtyp positiv für EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). Die meisten basal-ähnlichen Tumore sind invasiv-duktral, mit einer hohen mitotischen Rate, stromal lymphozytisch infiltrierend und haben nekrotische Zonen [244]. Ungefähr 80% der basal-ähnlichen Tumore sind negativ für die drei Rezeptoren, ER, PR und HER2 (*triple negative*) [82]. In aktuellen Studien wurde gezeigt, dass der basal-ähnliche Subtyp heterogen ist und nicht alle Patienten eine einheitlich schlechte Prognose haben [143, 75, 187].

Tabelle 1.2: Überblick über die molekulare Klassifikation des Mammakarzinoms (nach [82]).

Subtyp	Expression
Luminal A	ER ⁺ und PR ⁺ HER2 ⁻ Ki-67 niedrig (Schwellenwert bei 20% [219]) Rezidivrisiko gering ^a
Luminal B (HER2 ⁻)	ER ⁺ HER2 ⁻ und mindestens eine Aussage zutreffend: Ki-67 hoch PR ⁻ oder gering Rezidivrisiko hoch ^a laut Multigenexpressions-Assay
Luminal B (HER2 ⁺)	ER ⁺ HER2 ⁺ Ki-67 gering oder hoch PR ⁻ oder PR ⁺
HER2-überexprimierend	ER ⁻ und PR ⁻ HER2 ⁺
Basal-ähnlich (<i>Triple negative</i> ^b)	ER ⁻ und PR ⁻ HER2 ⁻

a: Laut Multigenexpressions-Assay, nach dem „St. Gallen International Expert Consensus“ [82].

b: Die Überlappung zwischen dem Basal-ähnlichen- und *triple negative*-Subtyp beträgt ca. 80%.

Zur genaueren Klassifizierung werden immer neue Genexpressionsprofile entwickelt. Der OncotypeDX oder 21-Gen Rezidivrisiko-Assay liefert vielversprechende prognostische und prädiktive Hinweise bezüglich einer zytotoxischen Therapie, ergänzend zu einer endokrinen Therapie, für Patientinnen mit einem luminalen Karzinom [82]. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der mittels RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) die Expression von 16 Tumor-assoziierten Genen und 5 Referenzgenen quantifiziert wird. Bei den Tumor-assoziierten Genen handelt es sich um *ER*, *PR*, *BCL2* (B-Cell Lymphoma 2), *SCUBE2* (*Signal Peptide-CUB-Epidermal Growth Factor-like Domain-containing Protein 2*), *Ki-67*, *MYBL2* (*v-Myb Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog (Avian)-like 2*), *Survivin*, *Cyclin B1*, *STK15*, *HER2*, *GRB7* (*Human Growth Factor Receptor Bound Protein 7*), *Stromelysin 3*, *Cathepsin L2*, *GSTM1* (*Glutathione S-transferase Mu 1*), *BAG1* (*BCL2 associated Athano-Gene 1*) und *CD68* [264].

BRCA1 und BRCA2

Wenn eine Frau Trägerin einer Mutation im *BRCA1* oder *BRCA2* (Breast Cancer 1 und 2) Gen ist, dann beträgt das Risiko für ein Mammakarzinom 60-80% [132, 6]. Interessanterweise liegen ungefähr 80% der *BRCA1* assoziierten Brusttumore innerhalb der basal-ähnlichen Subtypen, und viele sporadische basal-ähnliche Karzinome zeigen eine Störung des *BRCA1*-Gens [283, 226]. Die *BRCA1* und *BRCA2* Proteine sind an der DNA Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt und somit als Tumorsuppressoren wichtig bei der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität einer Zelle. In der Signalkaskade ist *BRCA1* *BRCA2* vorgeschaltet. *BRCA2* ein zentraler Bestandteil der homologen Rekombination [88]. *BRCA1* kann in einem Komplex mit anderen Proteinen als Sensor von abnormalen DNA Strukturen fungieren [303].

Eine Besonderheit der *BRCA1* und/oder *BRCA2* mutierten Mammakarzinome ist eine häufige Überexpression der *MAGE-A* (*Melanoma Antigen Family A*) Antigene [1]. Diese gehören zu den *CT* (*Cancer Testis*) Antigenen, die mit Ausnahme der Plazenta und des Testis nur in Tumoren exprimiert werden [53] und besonders für die Therapie interessant sind. Ihre Genexpression wird durch DNA-Demethylierung aktiviert. Die *MAGE-A* Expression konnte in 50% der *BRCA1/2*-mutierten Mammakarzinome, aber weder in benignen noch gesunden Frauen, die Träger der Mutation sind, nachgewiesen werden [1]. Im Vergleich konnte in einer Studie, in der nicht speziell auf den *BRCA1/2* Status eingegangen wurde, nur in 27% der Gewebeproben eine *MAGE A* Expression nachgewiesen werden. Auch hier waren gesunde Proben negativ für die Antigene [201].

1.1.3 Behandlung des Mammakarzinoms

Die Behandlung des primären Mammakarzinoms kann neben einer Operation auch eine neoadjuvante (unterstützend vor der Operation) und/oder adjuvante (unterstützend nach der Operation) Therapie beinhalten. Ob es sich dabei um eine endokrine Therapie, eine zytotoxische Chemotherapie, eine HER2-gerichtete Therapie oder eine Strahlentherapie handelt, bzw. um eine kombinierte Therapie wird anhand der Charakteristiken des Tumors entschieden (Tabelle 1.3).

Die endokrine Therapie kann adjuvant und neoadjuvant bei Patientinnen mit einem ER⁺-Mammakarzinom angewandt werden. Diese Tumore sind noch Hormonabhängig und können daher durch Blockierung des ER oder Verhinderung der Estro-

genproduktion behandelt werden. Premenopausale Patientinnen können mit GnRH (*Gonadotropin-Releasing-Hormon*)-Agonisten behandelt werden, die die Estrogen Produktion in den Ovarien inhibieren, sowie mit kompetitiven Hemmern des ER, wie Tamoxifen. Die Behandlung der postmenopausalen Patientinnen kann mit Aromataseinhibitoren, die die Bildung von Estrogen über die Aromatase verhindern, sowie ER-Modulatoren erfolgen [167].

Auch die zytotoxische Chemotherapie kann neoadjuvant und adjuvant, vor allem bei schnell proliferierenden, aggressiven Tumoren, durchgeführt werden [82]. Anthrazykline inhibieren die Topoisomerase II α , interkalieren mit der DNA und verhindern dadurch die Nukleinsäuresynthese und die DNA Reparatur, was zum Zelltod führt [212, 188]. Taxane verhindern durch Bindung an die Mikrotubuli den Abbau des Spindelapparates der sich teilenden Zellen [13]. Allerdings hat diese Form der Therapie viele akute und langfristige Nebeneffekte, die die Lebensqualität der Patientinnen beeinträchtigt [61].

HER2-überexprimierende Karzinome können mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab behandelt werden, der kompetitiv an den HER2-Rezeptor bindet und dadurch die Bindung von HER2 verhindert [110].

Tabelle 1.3: Behandlungsempfehlungen für die Subtypen des Mammakarzinoms, nach [82].

Subtyp	Therapie
Luminal A	Oft alleinige endokrine Therapie Chemotherapeutika nur in ausgewählten Patientinnen
Luminal B (HER2 ⁻)	Immer endokrine Therapie Oft Chemotherapie
Luminal B (HER2 ⁺)	Chemotherapie anti-HER2 Antikörper Endokrine Therapie
HER2-überexprimierend	Chemotherapie anti-HER2 Antikörper
<i>Triple negative</i>	Chemotherapie

Die Standardtherapie nach einer brusterhaltenden Operation ist zumeist eine Bestrahlung der ganzen Brust, um das Risiko eines Rezidivs zu verringern [45, 295]. Bei einer Mastektomie sollte ab vier Lymphknotenmetastasen eine Strahlentherapie

durchgeführt werden [82]. Als neues Verfahren wird die beschleunigte partielle Brustbestrahlung in klinischen Studien getestet, die eine kürzere Behandlungszeit und geringere Strahlenbelastung aufweist, aber versteckte Tumorherde nicht behandelt [261].

1.1.4 Metastasierung des Mammakarzinoms

Rund 10-15% der Patientinnen mit einem Mammakarzinom entwickeln innerhalb von 3 Jahren Fernmetastasen. In 20% der krankheitsfreien Patientinnen entsteht ein Rezidiv 7-25 Jahre nach einer Mastektomie und in diesem Zusammenhang wird von der klinischen Krebs-Dormanz gesprochen [284]. Es sind hauptsächlich Fernmetastasen, die den Tod der Patientinnen verursachen [306].

Die Angiogenese (Bildung von Blutgefäßen aus vorhandenen Blutgefäßen) unterstützt den Prozess der Disseminierung von Tumorzellen. Um eine Masse von 1-2mm zu überschreiten [74] benötigt der Tumor Angiogenese. Der Tumor wird über Blutgefäße mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt und metabolische Abfälle sowie CO₂ werden über die Blutbahn entsorgt. Die Blutgefäßbildung begünstigt auch die lokale Invasion der Tumorzellen, durch die dünnwandigen Venen und lymphatischen Kanäle [161]. Die Zellen lösen sich von dem Primärtumor, indem die Zelladhäsion oft durch einen Verlust der Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin aufgelöst wird und zirkulieren dann als sogenannte zirkulierende Tumorzellen im Blut oder der Lymphe [70] (Abb. 1.2 Überlebende Zellen können sich durch Ausbildung von Adhäsionsmolekülen am Kapillarbett festsetzen und durch Extravasation in das Parenchym eines Organs eindringen. Beginnen die Karzinomzellen nun zu proliferieren und Blutgefäße zu bilden entsteht eine Fernmetastase, aus der wiederum neue Metastasen hervorgehen können [273].

Lunge, Leber und Knochen sind die Organe, in denen das Mammakarzinom am häufigsten Metastasen bildet. Dabei können mehrere Organen befallen sein [306]. Nur wenige Zellen des Primärtumors sind tatsächlich in der Lage, alle Schritte der metastatischen Kaskade zu beenden [273]. Daher muss der Nachweis zirkulierender Tumorzellen nicht die Ausbildung von Metastasen zur Folge haben [71]. Allerdings hat sich die Detektion von Mikrometastasen im Knochenmark als prognostisch relevant erwiesen, deren Vorhandensein auf ein schlechtes Gesamtüberleben und erhöhtes Risiko für ein Rezidiv hinweist [25].

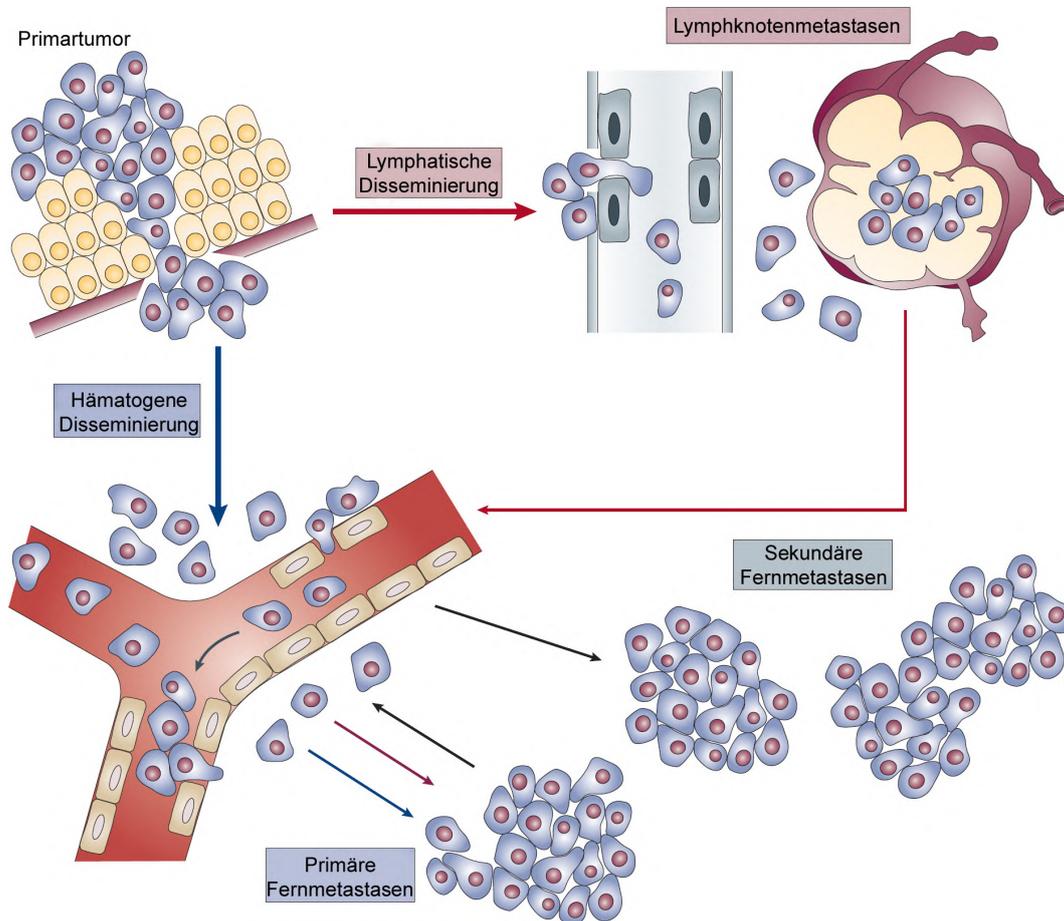


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Metastasierungskaskade. Tumorzellen, die sich vom Primärtumor lösen, migrieren in die Blutgefäße (hämatogene Disseminierung, blaue Pfeile) oder das Lymphsystem (lymphogene Disseminierung, rote Pfeile). Eine sekundäre hämatogene Disseminierung erfolgt von Fernmetastasen aus (schwarze Pfeile). Die lymphogen disseminierten Tumorzellen können in umliegende Lymphknoten eindringen und dort Lymphknotenmetastasen bilden. Die Tumorzellen der Lymphknotenmetastase können wiederum hämatogen disseminieren und sekundäre Fernmetastasen bilden. Die aus dem Primärtumor hämatogen disseminierten Tumorzellen können dagegen zu primären Fernmetastasen führen. Modifiziert nach Pantel und Brakenhoff (2004) [172].

1.2 mikroRNAs (miRs) - Biogenese und Funktion

MikroRNAs (miRs) sind kurze (20-23 Nukleotide), einzelsträngige, nicht kodierende, RNA Moleküle, die an der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression beteiligt sind [11]. Bei Säugetieren wird angenommen, dass ungefähr 50% der Proteinkodierenden Gene durch miRs reguliert werden. Funktionelle Studien zeigen zudem, dass miRs an fast jedem zellulären Prozess beteiligt sind [140]. Die erste miR, lin-4, wurde in *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*) entdeckt [152]. Erst sieben Jahre später, im Jahr 2000 wurde die zweite miR, let-7, wiederum in *C. elegans* gefunden [231]. Mittlerweile sind 30.424 reife miRs in 206 Arten bekannt, davon entfallen 1.707 auf den Menschen [197]. Zur Unterscheidung der verschiedenen miRs gibt es eine genaue Nomenklatur. Die drei vorangestellten Buchstaben deuten immer auf die Spezies hin, im Menschen wird die Abkürzung hsa (*Homo Sapiens*) verwendet. Bei paralogen Sequenzen, in denen sich die reifen miRs nur an einer oder zwei Stellen unterscheiden, wird ein Buchstabe angehängt, wie für hsa-miR-10a und hsa-miR-10b. Verschiedene Haarnadel *Loc*i, die zu identischen miRs führen erhalten Zahlen als Anhang, wie für hsa-mir-550b-1, hsa-mir-550b-2 und hsa-mir-550b-3. Wenn hingegen zwei unterschiedliche, reife miRs aus den entgegengesetzten Armen eines Haarnadelvorläufers prozessiert werden, erhalten sie den Anhang 3p (3' Arm) oder 5p (5' Arm), wie bei hsa-miR-17-3p und hsa-miR-17-5p [85].

1.2.1 Biogenese der mikroRNAs

Die miR Biogenese beginnt mit der durch die RNA Polymerase II-vermittelten Transkription [154], mit wenigen Ausnahmen, wie dem miR-Cluster C19MC, das durch die RNA Polymerase III transkribiert wird [23] (Abb. 1.3). MiRs die in einem Cluster liegen, können jedoch unabhängig voneinander transkribiert und reguliert werden [263]. Die miR-Gene können entweder eigenständig, oder in Introns proteinkodierender Gene, den sogenannten Mirtrons, vorliegen [15]. In einigen Fällen können miRs mit unterschiedlichen Bindesequenzen durch das mögliche Ablesen beider DNA-Stränge des Gens entstehen [140].

Relevant für die weitere Prozessierung der miRs ist das Editieren durch ADAR1 und ADAR2 (*Adenosine Deaminases Acting on RNA*). Die Desaminierung des Adenosins führt zu der Konversion in ein Inosin, das bei der Basenpaarung Guanosin-ähnliche

Eigenschaften hat. Dies kann Auswirkungen auf die Sequenz und damit verbundenen Bindeeigenschaften haben, was zu einer erhöhten miR Vielfalt führt. Durch den Basenaustausch ist es auch möglich, dass die strukturellen Eigenschaften der pre (Precursor)- bzw. pri (primären)-miRs verändert werden und damit die weitere Prozessierung entweder effizienter oder aber inhibiert wird [166, 320, 125].

Die erste endonukleolytische Spaltung erfolgt durch den Komplex aus der RNaseIII Drosha und DGCR8 (*DiGeorge Critical Region 8*) (Abb. 1.3) [54, 147]. Die aus der Transkription hervorgehende pri-miR besteht aus einem Stamm mit 33 Nukleotiden, einer Schlaufe und zwei ungepaarten flankierenden Regionen. Bei der Spaltung sind vor allem der Stamm und die flankierenden Regionen von Bedeutung [91, 325, 327]. Drosha spaltet den Strang am 5' und 3' Arm, DGCR8 bestimmt den Ort der Spaltung und stabilisiert die pri-miR [91]. Aus der Spaltung geht die 70 Nukleotide umfassende, pre-miR hervor. Bei den Mirtrons kann die Spaltung mit Drosha umgangen werden, wenn das aus dem Spleißen entstehende Intron die richtige Größe hat, um eine der pre-miR entsprechenden Haarnadelstruktur zu bilden [15, 198].

Die pre-miR wird durch Exportin, im Komplex mit Ran (*RAS-Related Nuclear Protein*)-GTP (*Guanosine Triphosphate*), aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert [322] (Abb. 1.3). Für den Export wird eine definierte Länge des Stamms und des 3' Überhangs benötigt, um nur den Transport von richtig prozessierten pre-miRs zu gewährleisten [168, 326].

Im Zytoplasma wird die Prozessierung und der Zusammenbau des RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*) durch den RLC (*RISC Loading Complex*) vermittelt. Der RLC besteht aus der RNase Dicer, den doppelsträngigen RNA Bindeproteinen TRBP (*Tar RNA Binding Protein*) und PACT (*Protein Activator of PKR (Protein Kinase RNA-Activated)*), sowie dem Ago2 (*Argonaute-2*) Protein [84, 37, 153]. MiRs, deren Stamm eine hohe Komplementarität aufweist, werden vor der Prozessierung durch Dicer endonukleolytisch mittels Ago2 gespalten. Ago2 schneidet aus dem zukünftigen Begleitstrang in der Mitte ein Nukleotid heraus, und bildet so die ac (*Ago2-cleaved*)-pre-miR [56]. Dicer trennt die Schlaufe ab und generiert damit einen ungefähr 22 Nukleotide langen miR-Duplex, mit einem 2 Nukleotide langen Überhang am 3' Ende [115, 16] (Abb. 1.3).

Nach Entstehung des miR-Duplexes dissoziieren Dicer und TRBP bzw. PACT von der miR. Der miR-Doppelstrang wird nun in den funktionellen, zur Ziel mRNA komplementären Leitstrang und den Begleitstrang, der abgebaut wird, getrennt [140]. Die

funktionelle Asymmetrie ist von der thermodynamischen Stabilität der Basenpaare an den Enden abhängig. Der Strang mit der weniger stabilen Basenpaarung an seinem 5' Ende wird in den RISC geladen [127]. Das Verhältnis von Leitstrang zu Begleitstrang kann in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien, durch die Eigenschaften der pre-miR oder des miR-Duplexes, sowie die beteiligten Faktoren, variieren [141, 234].

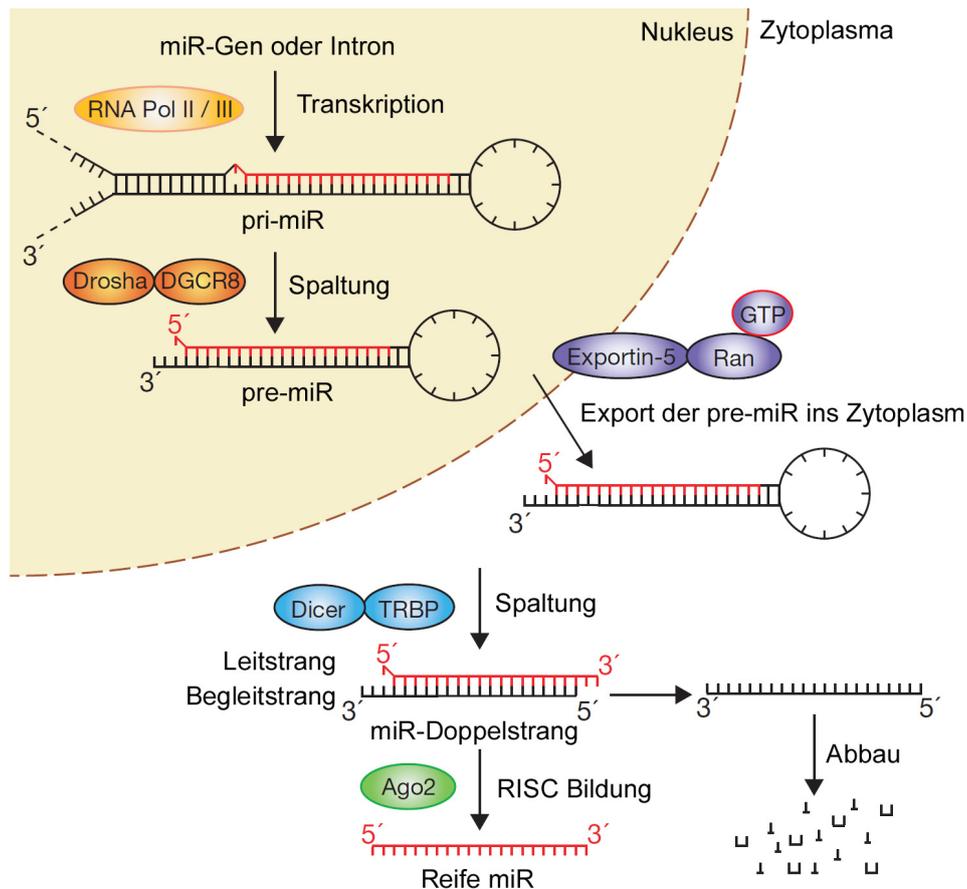


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der miR Biogenese. Dargestellt ist der lineare Prozessierungsmechanismus der miR Biogenese. Zunächst entsteht das primäre miR-Transkript (pri-miR) durch die RNA Polymerase (RNA Pol) II oder III, aus dem nach Spaltung mittels Drosha-DGCR8 die pre-miR hervorgeht. Exportin-5 und Ran-GTP transportieren die pre-miR aus dem Kern. Im Zytoplasma erfolgt eine zweite Spaltung durch einen Komplex aus Dicer und TRBP, aus dem der miR-Doppelstrang aus Leit- und Begleitstrang entsteht. Der Begleitstrang wird abgebaut und der Leitstrang in den RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), in dem Ago2 ein wichtiger Bestandteil ist, eingebaut. Modifiziert nach Winter et al. (2009) [312].

Über den Abbau der miRs ist bisher wenig bekannt. Die reifen miRs sind generell eher stabil, mit einer Halbwertszeit von Stunden bis Tagen [288]. Die Stabilität kann durch Modifikationen am 3' Ende beeinflusst werden. So führt das Anhängen eines einzelnen Adenosins an das 3' Ende der miR-122 in Leberzellen dazu, dass sie gegen einen endonukleolytischen Abbau geschützt wird [124]. Eine weitere Modifikation ist ein spezielles Hexanukleotid Endmotiv, das zu einer vorwiegend nuklearen Lokalisation der miR-29b führt. Daraus lässt sich einerseits schließen, dass miRs cis-agierende regulatorische Motive besitzen können [116] und andererseits bedeutet ein Rücktransport in den Nukleus, eine potenzielle miR-vermittelte Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene [128, 215].

1.2.2 MikroRNA-vermittelte Repression der Genexpression

Der genaue Mechanismus, der miR-vermittelten Regulation wird kontrovers diskutiert, da es Hinweise auf mRNA Destabilisierung, translationale Repression und auch Aktivierung der Genexpression gibt. Vorhersagen darüber zu treffen, welche mRNAs durch eine miR reguliert werden, ist schwierig, da viele Faktoren die Bindung des RISC beeinflussen [207]. Die geringe Länge der miRs und die Tatsache, dass oft eine partielle Bindung mit Fehlpaarungen und Nukleotidauswölbungen ausreicht, erschwert die Prognose potenzieller Ziele weiter [12, 233]. Einen guten Indikator für mögliche miR-Bindestellen liefert das geläufigste Motiv, die sogenannte *seed*-Region, bei der eine perfekte Bindung zwischen den Nukleotiden 2 bis 7 der 5' Seite der miR mit der mRNA vorliegt. Unstrukturierte und AU-reiche Regionen, in denen konservierte *seed*-Regionen liegen sind weitere gute Anhaltspunkte [12]. Dennoch sind Ergebnisse der meisten Algorithmen unterschiedlich und das Ausmaß der falsch-positiven und falsch-negativen Ziele ist schwer einzuschätzen [185]. Neuere Ergebnisse lassen zudem auf eine häufigere Interaktion mit kodierenden Exonen schließen, als bisher vermutet [38, 90] und es wurden Bindestellen nachgewiesen, die von den Prognoseregeln abweichen [207].

Die Repression der Genexpression durch miRs kann durch die häufiger vorkommende Degradation der mRNA [89], oder die Inhibierung der Translation erreicht werden [113] (Abb. 1.4). Für die Translation benötigen mRNAs eine 5'-Cap Struktur sowie einen *Poly-A* Schwanz die mit den Proteinen PABPC (*Cytoplasmic Poly(A) Binding Protein*) und eIF4G, eIF4E und eIF4A (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G, E, A*) interagieren, die zur Ausbildung einer zirkulären, vor Abbau geschützten mRNA-Struktur

führen [177]. Neben Ago ist GW182, das mit Ago und PABPC interagiert, essentiell bei der Inhibierung der Proteinexpression [113]. Mehrere Studien sprechen für die *Cap*-abhängige translationale Repression [214, 111], bei der miRs in *in vitro* Versuchen die Translation nicht inhibieren konnten, wenn diese durch IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) vermittelt wurde [178, 298]. Bei IRES handelt es sich um Sequenzen, die sofern vorhanden, in der 5'UTR (*Untranslated Region*) der mRNA vorliegen und eine Initiation ohne 5'-*Cap* und *Poly-A* Schwanz ermöglichen [97]. In seltenen Fällen kommt es bei voller Komplementarität zwischen miR und Ziel-mRNA zu einem endonukleolytischen Abbau [321]. Bei der häufiger vorkommenden partiellen Komplementarität wird die Ziel-mRNA dem 5'-zu-3' mRNA-Abbau-Stoffwechselweg zugeführt [230, 14, 317, 68], bei dem die mRNA zunächst deadenyliert und anschließend die 5'-*Cap* Struktur entfernt wird [113]. Durch die Deadenylierung kann PABPC nicht binden, und somit keine zirkuläre mRNA-Struktur ausbilden [298].

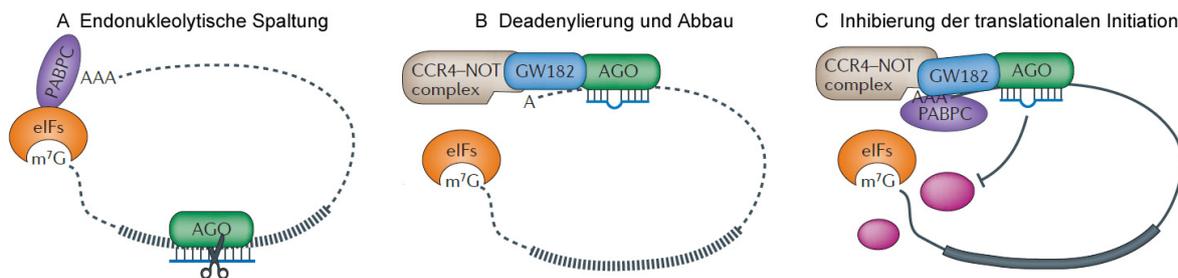


Abbildung 1.4: Mechanismen der miR-vermittelten Repression der Genexpression. Dargestellt ist eine typische mRNA mit 5'-*Cap*-Struktur, an die ein Komplex aus eIFs (*Eukaryotic Translation Initiation Factor*) bindet, und Poly-A Schwanz, der durch PABPC (*Cytoplasmic Poly(A) Binding Protein*) erkannt wird; sowie drei mögliche Wege, wie die Proteinexpression durch miRs verhindert wird. Bei der endonukleolytischen Spaltung durch AGO (*Argonaute*) liegt eine vollkommene Komplementarität zwischen miR und Ziel-mRNA vor. In diesem Fall wird GW182 nicht benötigt (A). Eine partielle Bindung der miR an die 3'UTR der mRNA kann zu einer Deadenylierung mittels CCR4 (Chemokine (C-C motif) Receptor 4)-NOT Komplex führen, der durch GW182 rekrutiert wird. Daraufhin dissoziiert PABPC und die mRNA wird abgebaut (B). CCR4-NOT kann nach Rekrutierung durch GW182, das im Komplex mit AGO vorliegt, auch ohne Dissoziation von PABPC zu einer Blockierung der Initiation führen.(C). Modifiziert nach Pasquinelli (2012) [207].

Die Funktion des RISC kann durch RBPs (*RNA-binding Proteins*), die an die Ziel-mRNA binden, wie ELAV1 (*Embryonic Lethal, Abnormal Vision, Drosophila-like 1*), beeinflusst werden. ELAV1 bindet AU-reiche Sequenzen der mRNAs und schützt sie gewöhnlich vor Degradation [183]. Im Fall des miR-vermittelten Abbaus kann ELAV1, je nach miR, mRNA und Gewebe, dem entgegenwirken [17] oder ihn fördern [189, 150]. Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung des RISC ist die Modifikation von Ago. Ago kann ubiquitiniert werden, was zu einem Abbau des Proteins führt [238], phosphoryliert werden, was vermutlich seine Bindung an eine miR erschwert [236] oder durch Prolyl-4-Hydroxylierung stabilisiert werden [222]. Es wird zudem eine Regulation über kompetierende endogene RNAs vermutet [29]. Jede RNA mit miR Bindestellen, und somit auch mRNAs der Pseudogene, können als Köder für die jeweilige miR fungieren [216].

1.2.3 Analytierte mikroRNAs und ihre Rolle in der Karzinogenese des Mammakarzinoms

Im Jahr 2002 wurde erstmals ein Bezug zwischen der veränderten Expression von miRs und der B-Zell chronisch lymphatischen Leukämie hergestellt [26]. Drei Jahre später wurden miRs entdeckt, die im Mammakarzinom stark veränderte Expressionslevel aufwiesen. Diese Unterschiede in Karzinomen kann durch die Lage der miR-Gene erklärt werden. Über 50% liegen in fragilen chromosomalen Regionen, die häufig durch Deletion oder Amplifikation in Tumoren verändert sind [117]. Auch eine erhöhte Ago2 konnte in Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden [19].

MiRs können als Onkogene, sogenannte Onkomirs, wirken, die die Expression von Tumorsupressorgenen inhibieren [328, 176]. Wenn die Expression einer miR in den Karzinomzellen im Vergleich zu normalen Zellen verringert ist, wird von einer Tumorsupressor-miR gesprochen, deren Ziele Onkogene sind [328]. MiRs die ausschließlich in der Metastasierung eine Rolle spielen, werden getrennt betrachtet. Auch hier gibt es miRs die die Metastasierung fördern, sogenannte Metastamirs und solche, die sie supprimieren [47]. Die folgenden miRs wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht:

Tumorsupressor-miRs

MiR-34a

Ein Beispiel für eine putative Tumorsupressor-miR ist miR-34a, deren Transkription durch den Tumorsupressor p53 aktiviert wird und Seneszenz sowie Apoptose induzieren kann [94, 275, 32, 228]. Die Überexpression von miR-34a in Mammakarzinomzelllinien bewirkte eine verringerte Proliferation und Invasion. Entsprechend wurde eine niedrigere Expression in Brustkarzinomproben im Vergleich zum angrenzenden nicht-malignen Gewebe gefunden [160]. In einer anderen Studie korrelierte eine erhöhte Expression von miR-34a zwar mit aggressiveren Mammakarzinom-Subtypen, aber das Rezidiv-freie und Gesamtüberleben war in diesen Patientinnen besser bei erhöhter miR-34a Expression. Dadurch wird die Eigenschaft von miR-34a als Tumorsupressor bestätigt [211].

MiR-101

Auch miR-101 ist eine potenzielle Tumorsupressor-miR, die wie in *in vitro* Versuchen mit Mammakarzinomzelllinien gezeigt wurde, die Zellproliferation, Migration und Invasion inhibiert, und die Apoptose induziert. In dieser Studie wurde auch eine verringerte miR-101 Expression im Brustkarzinomgewebe, im Vergleich zum angrenzenden normalen Brustgewebe, detektiert [302]. Allerdings zeigte eine andere Studie, dass die miR-101 Überexpression das Zellwachstum in Estrogen-haltigem Medium zwar inhibiert, in Estrogen-freiem Medium aber fördert. Des Weiteren wurde festgestellt, dass miR-101 durch eine direkte Inhibierung der MAGI-2 (*Membran-Associated Guanylate Kinase*), die zur Aktivierung von PTEN benötigt wird, folglich die PTEN Aktivität reduziert und Akt aktiviert [239]. Akt ist eines der wichtigsten Ziele des Phosphatidylinositol-3-Kinasen Signalweges als Antwort auf Wachstumsfaktoren und Zytokine, und steht in Zusammenhang mit einer Tamoxifen Resistenz [133].

Oncomirs

MiR-17

MiR-17, oft auch als miR-17-5p bezeichnet, liegt in dem miR-17-92 Cluster, mit 5 weiteren miRs [184]. Der erste Anhaltspunkt für das onkogene Potential des Clusters war dessen c-Myc-vermittelte transkriptionelle Induktion [196]. Weitere *in vitro*

Studien zeigten, dass miR-17 die Migration und Invasion durch Inhibierung des Tumorsuppressors HBP1 (*HMG (High Mobility Group) Box-containing Protein 1*) induzieren kann [159]. Widersprüchlich dazu sind Ergebnisse, die eine Deletion des Clusters in 21,9% der untersuchten Mammakarzinomgeweben [330] und eine verringerte Proliferationsrate in Brustkarzinomzelllinien [105] zeigen. Diese Diskrepanzen weisen auf die komplexe Beteiligung der miRs an der Regulation zahlreicher Gene und Signalkaskaden hin.

MiR-93

Zu den Oncomirs wird auch miR-93 gezählt, da sie in *in vitro* Versuchen die Apoptose herunterreguliert, die Anzahl an Kolonien und Mammosphären steigert und die Zellproliferation erhöht. Außerdem konnte die Expression von miR-93 durch Estrogen induziert werden [257]. Ihre onkogene Rolle wird auch durch Studien bestätigt, in denen eine Steigerung der miR-93 Konzentration in Gewebe der Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu Patientinnen mit benignen Brustkrankungen detektiert wurde. *In vivo* Maus-Versuche weisen zudem auf einen pro-angiogenetischen Effekt, sowie die Förderung von Lungenmetastasen in miR-93 überexprimierenden Mammatumoren hin [69].

MiR-155

In vitro Studien konnten zeigen, dass miR-155 die Caspase 3-mRNA bindet und somit die Apoptose inhibieren kann [202]. Durch die Inhibierung von SOCS1 (*Supressor of Cytokine Signaling 1*), die zur Aktivierung von Interferon γ , Interleukin 6 und Lipopolysacchariden führt, stellt miR-155 eine Vernetzung von Inflammation und Brustkrebs dar [121]. Des Weiteren kann in Brustkrebszelllinien die Proliferation durch miR-155 Überexpression erhöht werden [121, 34]. Die Rolle als Oncomir wird in mehreren Studien durch eine erhöhte Expression der miR in Mammakarzinomgewebe im Vergleich zu gesundem Brustgewebe belegt [117, 296, 300]. Besonders in *BRCA1*-Mutanten Tumoren wurden erhöhte miR-155 Konzentrationen gemessen und gezeigt, dass *BRCA1* an den miR-155 Promotor bindet und zu dessen Azetylierung und somit Repression führt [31].

Metastamirs

MiR-10b

MiR-10b wurde als eine der ersten Metastamirs entdeckt, auf Grund ihrer höheren Expression in metastasierenden im Vergleich zu nicht metastasierenden Brustkarzinomzelllinien. Zudem konnte sie in Xenotransplantationsmodellen die Invasion und Metastasierung in sonst nicht metastasierenden Mammakarzinomen induzieren [171]. In einem Maus-Mammakarzinommodell konnte eine miR-10b Antagomir, eine chemisch hergestelltes, cholesterol-konjugiertes Antisense RNA Oligonukleotid, die Metastasierung unterdrücken [170]. Allerdings wurde in einer anderen Studie eine geringere miR-10b Konzentration in Gewebe von Patientinnen mit Mammakarzinom-Metastasen im Vergleich zu normalem Brustgewebe detektiert [80]. Um diese Widersprüche zu klären sind weitere Studien mit einer größeren Anzahl von Patienten notwendig.

MiR-373

Eine weitere Metastamir, die im Mammakarzinom eine Rolle spielt ist miR-373. In testikulären Keimzelltumoren wurde bereits die onkogene Eigenschaft der miR-373 und der im gleichen Cluster liegenden miR-372, die den p53 Signalweg inhibieren, gezeigt [297]. In *in vivo* und *in vitro* Studien konnte miR-373 die Migration und Ivasion von Mammakarzinomzelllinien induzieren [108]. In diesem Fall war CD44, das den Oberflächen-Rezeptor für Hyaluronsäure kodiert und Zell-Zell Kontakte vermittelt, die Ziel-mRNA [218]. CD44 wurde sowohl im Prostatakarzinom und Kolonkarzinom als Metastasensupressor nachgewiesen [119, 42] und der Verlust des Gens ist im Mammakarzinom mit der Metastasierung in die Lunge assoziiert [164].

1.2.4 MikroRNAs in der Therapie des Mammakarzinoms

MiRs sind auch als Ziele in der Therapie des Mammakarzinoms von Interesse. So ist das Ziel eines miR-Ersatzes das verminderte Vorkommen ihrer endogenen Gegenstücke zu erhöhen und die damit verbundene Reaktivierung zellulärer Signalwege. Dabei muss zum Einen die Halbwertszeit der miRs erhöht werden und zum Anderen der Tumor-spezifischen Transports gewährleistet werden [138]. Die Substitution des Phosphodiesters durch Phosphorothioate im Rückrat des miR-Analagon vermittelt eine gewisse Resistenz gegenüber Nukleasen [120]. Auch die Verwendung von LNAs

(Locked Nucleic Acid), als miR-Ersatz, bei denen der 2' Sauerstoff und der 4' Kohlenstoff miteinander verbunden sind, erhöht die Thermostabilität des RNA-LNA Duplexes und schützt vor dem Abbau durch Exo- und Endonukleasen [293]. Um die Stabilität während der Blutzirkulation, durch die die miR ihren Zielort erreicht, zu verbessern kann sie mit einer Cholesterolgegruppe konjugiert werden [290]. Zum Schutz der LNA oder miR können sie in Nanopartikel eingeschlossen werden, die Mizellenartige Strukturen bilden [138]. An die Nanopartikel können tumorspezifische Liganden gekoppelt werden, um den Transport zu einem spezifischen Gewebe zu leiten. Bei der passiven Ziel-Anvisierung wird die Größe der Nanopartikel (15-100 nm) an die der großporigen (200 nm-1,2 µm) Tumorblutgefäße angepasst [173, 24].

Bisher werden noch keine miRs in der klinischen Routine angewandt. MiRs können im Mammakarzinom allerdings diagnostisches, prognostisches und therapeutisches Potential haben. Vor allem in der therapeutischen Anwendung ist es jedoch zunächst wichtig die exakten Ziel-mRNAs einer miR zu kennen, um mögliche Auswirkungen auf andere Signalwege auszuschließen.

1.3 Zirkulierende Nukleinsäuren als potenzielle Tumormarker

Bereits im Jahr 1948 entdeckten Mandel und Métais das Vorkommen von zellfreien Nukleinsäuren im menschlichen Blut [175]. Aber erst wesentlich später wurden weitere Studien zur zellfreien DNA durchgeführt, bei denen erhöhte DNA Konzentration im Blut von Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses, mittels Antikörper gegen die DNA [135, 274], nachgewiesen wurden. Untersuchungen der zirkulierenden DNA aus Karzinompatienten zeigten, dass ein Teil der DNA direkt vom Primärtumor stammt [269]. Daher besteht das Interesse, durch eine Blutentnahme und die anschließende Quantifizierung der zirkulierenden, zellfreien Nukleinsäuren („flüssige Biopsie“) die Anzahl der Gewebebiopsien zu verringern. Durch die regelmäßige Entnahme von Blutproben könnte so der Verlauf der Krankheit, bzw. der Behandlung genau verfolgt werden [249].

Während der Karzinogenese kommt es zu einem erhöhten Zellumsatz im Primärtumor und damit der verbundenen Freisetzung von zirkulierenden Nukleinsäuren [249]. Aber auch durch zirkulierende Tumorzellen im Blut, sowie Mikrometastasen werden Nukleinsäuren freigesetzt [247]. Zellfreie Nukleinsäuren stammen daher sowohl aus

gesunden-, wie auch aus Tumorzellen. Ihre Konzentration wird durch die filternden, abbauenden und reinigenden Abläufe des Blutes und der Lymphe, mit Hilfe der Leber und Nieren beeinflusst [249, 73]. Mögliche Quellen der zirkulierenden Nukleinsäuren sind a) der Abbau von Blutzellen; b) Bakterien und Viren, c) die Oberflächen-DNA der Leukozyten, d) Zell- und Gewebe-Nekrose, e) Apoptose, f) zelluläre Sekretion von Exosomen und g) Transposons sowie Retrotransposons [77].

1.3.1 Zirkulierende DNA

DNA kann in Form von Nukleosomen, an der Oberfläche von Blutzellen mit speziellen Nukleinsäure-Bindeeigenschaften oder ungebunden [145, 249] im Blut vorliegen. Die zirkulierende DNA weist epigenetische Merkmale, wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen auf, und umfasst genomische, mitochondriale und virale DNA (Abb. 1.5). Die mitochondriale DNA liegt entweder frei oder Partikel-assoziiert, in einer wesentlich höheren Kopienzahl als die genomische DNA, vor [40].

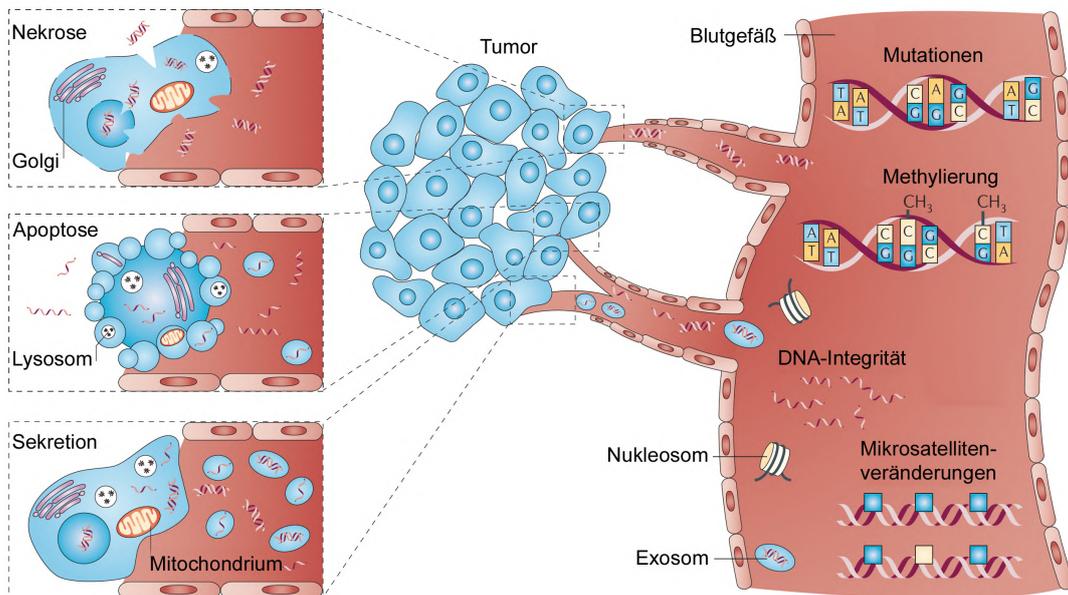


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der zellfreien Nukleinsäuren im Blut. Die zirkulierende Tumor-DNA von Karzinompatienten wird von den Tumorzellen in unterschiedlichen Formen ins Blut abgegeben. Die Abgabe der zirkulierenden DNA kann durch Apoptose, Nekrose oder Sekretion erfolgen. Mutationen, Methylierung, DNA-Integrität und Mikrosatellitenveränderungen können in der zellfreien DNA im Blut detektiert werden. Modifiziert nach Schwarzenbach et al. (2011) [249].

DNA zirkuliert im Blut häufig in Form von Nukleosomen. Nukleosomen bestehen aus einem Histon-Oktamer, mit einem zweimal umwickelten ca. 260 bp-langen DNA-Strang. Unter physiologischen Bedingungen werden Nukleosomen in apoptotische Vesikel verpackt und von Makrophagen aufgenommen [266]. Durch den hohen Zellumsatz im Tumor oder nach einer Chemotherapie können nicht alle Vesikel aufgenommen werden, was zu einer Steigerung der Nukleosomenkonzentration führt. Im Brustkrebs ist diese Erhöhung mit der Tumorprogression assoziiert [157]. Auf Grund der durch Apoptose freigesetzten Nukleosomen könnte deren Quantifizierung besonders bei der Feststellung der Wirksamkeit von zytotoxischen Krebstherapien helfen [104]. Stoetzer et al. [265] konnten diesbezüglich zeigen, dass bei einer neoadjuvanten Chemotherapie von Mammakarzinompatientinnen die höchsten Nukleosomenkonzentrationen bei nicht Anschlägen der Therapie vorliegt.

Die Menge und Integrität der zirkulierenden DNA, ihr DNA-Methylierungsmuster und ihre genomischen Aberrationen können Auskunft über eine Erkrankung geben. Die Konzentrationen variieren in Plasma und Serum von gesunden Personen und Karzinompatienten von 0 bis > 1.000 ng DNA pro ml Blut, wobei die Werte in Karzinompatienten höher sind [311, 22, 123, 251, 43]. Auf Grund der Unterschiede in den Konzentrationen der verschiedenen Studien und der allgemeinen Erhöhung der DNA-Konzentrationen bei gut- und bösartigen Erkrankungen, sind diese Werte alleine nicht aussagekräftig, könnten aber ergänzend mit anderen Markern eingesetzt werden [249].

Der Nachweis von Mutationen in der zirkulierenden Tumor-DNA ist vor allem therapeutisch interessant, da viele Therapeutika unter anderem den EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) oder p53 Signalweg anvisieren [59, 158]. Analysen über zirkulierende, mutierte Gene, deren Proteine in der Signalkaskade involviert sind, können einen Hinweis über Behandlungsstrategien geben. Allerdings ist der Anteil der Tumor-DNA im Blut im Vergleich zur Wildtyp-DNA sehr gering, was leicht zu verfälschten Ergebnissen führen kann [249]. Dieses Problem stellt sich auch bei der Detektion des Verlustes der Heterozygotität (LOH, *Loss of Heterozygosity*) [57, 48, 103]. LOH ist die häufigste genetische Veränderung in humanen Karzinomen, da vor allem der DNA-Verlust von Tumorsuppressorgenen die Karzinogenese begünstigt [279]. Die Detektion von LOH in der zirkulierenden Tumor-DNA wird dadurch erschwert, dass eine

erhöhte Proliferation von benignen Zellen durch Inflammations- oder Reparaturprozesse zu einer gesteigerten apoptotischen Zellrate und somit zur Verschleierung des LOH führt [245, 249].

Besonders vielversprechend ist die Detektion demethylierter, zellfreier DNA. Die Inaktivierung des Promotors von Tumorsuppressorgenen durch Methylierung der CpG Regionen spielt vermutlich eine entscheidende Rolle in der malignen Transformation [67]. Die epigenetischen Veränderungen sind zwar nicht einzigartig für eine einzelne Tumorart, aber die häufige Methylierung spezieller Tumorsuppressorgene ist typisch für gewisse Karzinome [65, 272]. Es ist außerdem möglich, Histonmodifikationen im Blut zu untersuchen, die mit der Karzinogenese in Zusammenhang stehen. Gemeinsam mit der DNA-Methylierung könnte dies zu einem genaueren Bild über die epigenetisch regulierten Gene im Tumor führen [249, 148, 27].

Die Integrität der DNA kann anhand der Retrotransposons ALU und LINE1 (*Long Interspersed Element 1*) gemessen werden [249], die fast 50% des humanen Genoms ausmachen. Da diese Elemente in allen Chromosomen vorkommen ist die Spezifität für ein spezielles Karzinom gering, aber die Sensitivität erhöht [285]. Zur Berechnung der DNA-Integrität wird das Verhältnis von langen zu kurzen DNA-Fragmenten gebildet. Durch Tumornekrose, die häufig in Karzinomen vorkommt, entstehen DNA-Stücke mit variierender Länge. Der Zelltod im gesunden Gewebe, wird hauptsächlich durch Apoptose vermittelt und führt zu einheitlichen, kurzen DNA-Fragmenten [299].

1.3.2 Zirkulierende mikroRNAs

Bei der Suche nach weiteren zirkulierenden Markern sind auch die zellfreien RNAs von Interesse. Chen et al. [36] konnten zeigen, dass miRs sehr stabil im Blut sind, und auch nach einer dreistündigen Inkubation mit RNasen, im Gegensatz zu mRNAs wie GAPDH (*Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*) oder β -Aktin, nicht abgebaut werden. Ihre Stabilität und Rolle in der Karzinogenese stellt die miRs in den Fokus der Tumorforschung.

In einer nicht malignen Umgebung stammen die meisten miRs im Blut von den zirkulierenden Blutzellen [36]. In Karzinompatienten werden erhöhte Konzentrationen in Mikropartikeln, wie den Exosomen, detektiert, die die miRs vor einer Degradation durch RNasen schützen [260, 286]. Werden die miRs nicht von Exosomen eingeschlossen,

sind sie häufig mit HDL (*High Density Lipoprotein*) [294] oder Argonaut Proteinen [7, 282] assoziiert, die den Schutz der miRs gewährleisten. Dadurch kann die hohe Stabilität der miRs im Serum und Plasma erklärt werden, deren Konzentrationen auch durch extreme pH-Werte, wiederholtes Einfrieren und Auftauen, Erhitzen, Inkubation mit RNasen oder Aufbewahrung der Plasmaproben bei Raumtemperatur konstant bleiben [36, 186, 39].

Obwohl für einige miRs eine gute Korrelation zwischen Serum und Plasma gezeigt werden konnte [186, 139], wurden zwischen den miR Profilen im Plasma oder Serum und Primärtumor Diskrepanzen entdeckt [281, 30]. Vor allem sind nicht alle stark exprimierten miRs des Tumorgewebes auch in der Zirkulation nachweisbar [213]. Dies lässt auf eine selektive Abgabe der miRs schließen, wobei diese Unterschiede auch durch die Heterogenität des Primärtumors bedingt sein können [95].

Bei Mammakarzinompatientinnen wurde unter anderem eine signifikant erhöhte Expression der zirkulierenden miR-155 im Vergleich zu gesunden Frauen entdeckt, sowie eine Korrelation der miR-10b, miR-34a und miR-155 Werte mit dem Vorhandensein von Metastasen [235]. Auch andere Studien haben sich mit der Quantifizierung zirkulierender miRs befasst, aber die Vergleichbarkeit der Daten ist auf Grund unterschiedlicher Ausgangsmaterialien (Serum, Plasma), Referenzgene und Blutabnahmezeitpunkte schwierig [270, 331, 332, 99, 100].

Um zirkulierende Tumormarker finden und validieren zu können ist es notwendig, preanalytische und analytische Verfahren zu standardisieren. Preanalytische Verfahren sind die Entnahme, Aufarbeitung und Lagerung der Plasma- bzw. Serumproben. Zu den analytischen Verfahren gehören die Isolation der Nukleinsäuren, Techniken der Quantifizierung, sowie die Validierung der Qualität und Konzentration mittels definierter endogener Kontrollgene [134].

1.4 Exosomen

Exosomen haben einen Durchmesser von 40-100nm und gehören neben Mikrovesikeln und apoptotischen Körpern zu der Klasse der extrazellulären Vesikel. Ihre Gemeinsamkeiten sind die Lipid-Doppelschicht und die Abstammung von Zellen [63]. Bereits vor 30 Jahren wurde entdeckt, dass Exosomen durch die Fusion von MVBs (*Multivesicular Bodies*) mit der Plasmamembran entstehen [203]. Allerdings richtete

sich die Aufmerksamkeit auf diese extrazellulären Vesikel, erst mit der Beobachtung, dass sie eine adaptive Immunantwort hervorrufen können [227]. Mittlerweile konnten Exosomen von vielen Zelltypen, darunter auch Karzinomzelllinien [319, 131, 142] und aus den meisten Körperflüssigkeiten isoliert werden [63]. Von besonderem Interesse sind Exosomen seit der Entdeckung, dass sie neben Proteinen auch mRNA und miRs transportieren [286]. Es wurde zudem nachgewiesen, dass Exosomen eine spezifische Zusammenstellung an Proteinen und RNA enthalten, was auf eine aktive Sekretion schließen lässt [278].

1.4.1 Biogenese der Exosomen

Die Biogenese der Exosomen beginnt in den MVBs. MVBs gehen aus Endosomen hervor und werden daher oft als multivesikuläre Endosomen bezeichnet. Die frühen Endosomen entstehen vermutlich durch Fusion verschiedener endozytischer Vesikel [114] (Abb. 1.6A, B). Bei der Endozytose können Zelloberflächen-Rezeptoren und ihre Liganden internalisiert werden, wodurch der Rezeptor nicht mehr in der Lage ist seine Signale weiterzuleiten [194]. Die frühen Endosomen sind das Hauptsortierungskompartiment in der Zelle [114], und nehmen für ungefähr 10 min Vesikel auf. Deren gelöste Bestandteile, Makromoleküle und Membranbestandteile können an die Membran zurückgeführt werden oder in den Endosomen akkumulieren [179]. Bereits im frühen Endosom beginnt die Bildung von internen luminalen Vesikeln an speziellen *Plaques*, die Clathrin und Komponenten des ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required For Transport*) enthalten [224, 240] (Abb. 1.6C, D). Bei dem ESCRT handelt sich um einen Multikomponenten Komplex. Er wählt die Proteine, meistens auf Grund einer Ubiquitinierung, zur Internalisierung aus und wirkt beim Abschnüren der Vesikel mit. Der genaue Mechanismus dahinter ist allerdings noch nicht bekannt [93].

Nachdem die Aufnahme der Vesikel beendet ist, findet die Umwandlung in das späte Endosom statt. Dieser Prozess umfasst die Bewegung der Endosomen mittels Mikrotubuli in den perinukleären Bereich der Zelle [114]. Außerdem werden Membranbestandteile ausgetauscht, der pH-Wert verringert (6,0-4,9 [180]), lysosomale Komponenten aufgenommen, zusätzliche interluminale Vesikel gebildet und die Morphologie verändert. In den Endosomen sorgt neben dem ESCRT Komplex [93] auch das Zelloberflächen-Glykoprotein CD63, das ein wichtiger exosomaler Marker ist [287], für die Entstehung intraluminaler Vesikel. Die MVBs sind spherisch und haben eine variierende Anzahl intraluminaler Vesikel [87] (Abb. 1.6E).

Im letzten Schritt können MVBs entweder mit Lysosomen fusionieren, um die intraluminalen Vesikel zu degradieren oder mit der Plasmamembran, was zur Entlassung von Exosomen in den extrazellulären Raum führt [114] (Abb. 1.6F). Die genauen Signale, die die Fusion mit der Plasmamembran bewirkt, sind noch nicht bekannt. Aber es konnte gezeigt werden, dass abhängig von der Art der Zelle, unterschiedliche Rab (*Ras-related Proteins in Brain*) GTPasen beteiligt sind [200, 106].

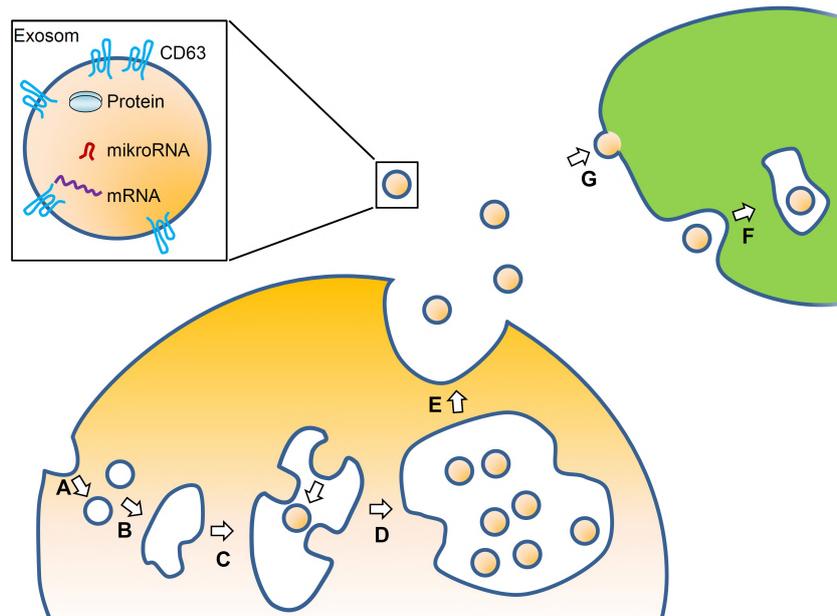


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung Biogenese der Exosomen. Die Biogenese der Exosomen beginnt mit der Endozytose von Vesikeln (A), die zu einem frühen Endosom fusionieren (B). Im frühen Endosom beginnt bereits die Bildung von internen luminalen Vesikeln (C). Bei der Entstehung des späten Endosoms, die auch als MVBs (Multivesicular Bodies) bezeichnet werden, entstehen zusätzliche intraluminalen Vesikel (D). Zur Freisetzung der Exosomen in den extrazellulären Raum muss der MVB mit der Plasmamembran verschmelzen (E). Die Exosomen können von anderen Zellen aufgenommen werden und in endozytischen Kompartimenten akkumulieren (F) oder mit der Membran einer Empfängerzelle fusionieren (G). Die vergrößerte Darstellung des Exosoms zeigt CD63, das sich als Marker zum Nachweise von Exosomen eignet, sowie die möglichen Bestandteile eines Exosoms, die Proteine, mRNA oder mikroRNAs umfassen.

Rab GTPasen sind kleine (20-25 kDa) Proteine, die als molekulare Schalter zwischen einem aktiven (GTP-gebundenen) und inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand zirkulieren [246]. Aktivierte Rab Proteine interagieren mit unterschiedlichen Effektorproteinen um drei verschiedene Prozesse zu koordinieren: Abschnüren von Vesikeln,

Zytoskeletttransport, und gezieltes Andocken und Fusionieren [86, 246]. Sind die Exosomen einmal im extrazellulären Raum, werden sie von anderen Zellen, häufig phagozytischen Zellen, wie den Makrophagen, aufgenommen und in endozytischen oder phagozytischen Kompartimenten akkumuliert [278] (Abb. 1.6G). Neue Studien zeigen, dass Exosomen mit der Membran einer Empfängerzelle fusionieren können, wobei RNAs und Proteine in diese Zelle entladen werden (Abb. 1.6F). Dort sind die übertragenen Moleküle vermutlich funktionell [206].

1.4.2 Exosomen in der Karzinogenese

Die genaue Rolle der Exosomen in der Karzinogenese wird kontrovers diskutiert. Bereits früh wurde entdeckt, dass Exosomen MHC (*Major Histocompatibility Complex*) I und II-Antigen Komplexe tragen und sie den T-Lymphozyten präsentieren, was zu einer adaptiven Immunantwort führen kann [227, 333]. Auf Grund dieser Beobachtungen wird vermutet, dass Exosomen in der intrazellulären Kommunikation eine Rolle spielen und in der Anti-Tumor Therapie eingesetzt werden können [33]. Mittlerweile konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Exosomen in der Lage sind, CD4+ und CD8+ T-Zellen zu aktivieren [227, 2, 195]. Exosomen tragen außerdem Antigene der Zelle, von der sie stammen. Diese Exosomen können von dendritischen Zellen gefangen werden. Werden die von den Exosomen stammenden Antigene in den dendritischen Zellen abgebaut, können die Antigene an MHC-Moleküle der dendritischen Zelle gelangen und T-Lymphozyten präsentiert werden. Die T-Lymphozyten wären somit gegen die Ursprungszelle der Exosomen gerichtet [315, 49].

Andererseits können Exosomen mancher Karzinome auch immunsuppressive Moleküle enthalten, die *in vitro* die CD4 und CD8 T-Zellen inaktivieren [277, 109], die Proliferation der natürlichen Killerzellen inhibieren [162] oder zur Differenzierung von immunsuppressiven Zellen führen können [271]. Daneben enthalten manche Exosomen auch angiogenetische Proteine, die auf eine Interaktion zwischen Mesotheliomzellen und der Tumor-Mikroumgebung hinweisen [96]. Außerdem wurden in Patienten mit großen Tumoren erhöhte Mengen an Exosomen mit Tumormarkern detektiert [276], was sowohl auf die Tumorausdehnung als auch auf einen Effekt der Exosomen auf die Tumorprogression zurückgeführt werden kann [20].

Interessant ist vor allem der Nachweis Tumor-assoziiertes Proteine, wie HER2 in Exosomen von Mammakarzinomzelllinien [136] oder EGFR in Exosomen von Gliomazelllinien [256]. Durch das Vorhandensein von HER2 in Exosomen aus Mammakarzinomzelllinien konnte der HER2-spezifische Antikörper Trastuzumab sequestriert werden. Auf diese Weise erlangten die Mammakarzinomzelllinien eine gewisse Resistenz, da die Hemmung des Zellwachstums durch Trastuzumab gestoppt wurde [44]. Eine andere Art der Resistenz gegenüber einer Therapie wurde in Ovarialkarzinomzelllinien entdeckt. In Exosomen der chemoresistenten Zellen wurde nach einer Behandlung mit cis-Platin eine deutlich höhere Platin Konzentration gemessen als in Exosomen sensibler Zellen [241].

Obwohl die Anzahl der Publikationen über Exosomen in den letzten Jahren stark zugenommen hat, ist wenig über die physiologische Wirkungsweise bekannt. Viele Experimente sind *in vitro* durchgeführt worden. Es ist unklar, ob die bei den Versuchen eingesetzte Konzentration der Exosomen, die aus biologischen Flüssigkeiten (wie Serum, Plasma und Urin) extrahiert wurden, auch der Menge entspricht, die *in vivo* ausgeschüttet wird. Daher sind weitere Untersuchungen über die Funktionen der Exosomen notwendig. [20]. Da gezeigt wurde, dass Tumore Exosomen mit spezifischem Inhalt ausschütten, eignen sie sich möglicherweise als diagnostische Biomarker. Beim Ovarialkarzinom wies das miR-Expressionsprofil von Exosomen, die über den Tumormarker EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) isoliert wurden, eine hohe Korrelation mit dem des Primärtumors auf [276]. Im Mammakarzinom wird EpCAM durch Metalloproteinasen von den Exosomen abgespalten [237]. Die Ursache der Diskrepanz bezüglich EpCAM zwischen dem Mammakarzinom und dem Ovarialkarzinom ist noch nicht bekannt. Allerdings zeigt dies, dass ein Marker für die vom Mammakarzinom-stammenden Exosomen fehlt und bei Untersuchungen der Exosomen von Brustkarzinompatientinnen mit der gesamten Exosomenfraktion gearbeitet werden sollte.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollen zunächst miRs im Blutserum von Mammakarzinompatientinnen untersucht werden, um die verschiedenen Subtypen des Mammakarzinoms zu charakterisieren, die ein unterschiedliches klinisches und biologisches Verhalten zeigen. Funktionelle Analysen sollen durchgeführt werden, um die Tumorsuppressorgene zu identifizieren, die durch die differenziell exprimierten miRs herunterreguliert werden. Zusätzlich sollen die Tumorsuppressorgene auch auf DNA-Verluste, wie den Verlust der Heterozygotität (LOH, *Loss of Heterozygosity*) untersucht werden.

Auf Grund der aktuellen Erkenntnisse zur Stabilität der mikroRNAs (miRs) im Blut und ihrer Involvierung in der Karzinogenese und Tumorprogression sollen sechs im Mammakarzinom relevante miRs ausgewählt und untersucht werden. Die miRs sollen im postoperativem Serum von Frauen mit einem primären Mammakarzinom vor und nach einer Chemotherapie, sowie von Patientinnen mit Metastasen mittels Real-Time PCR quantifiziert und mit den Expressionsniveaus im Serum von gesunden Frauen verglichen werden. Anschließend sollen die miR-Konzentrationen mit den klinisch-pathologischen Daten, wie dem TNM (Tumor-, Nodal-, Metastasen-) und Rezeptorstatus korreliert werden. Des Weiteren sollen die Änderungen in den Expressionsniveaus der miRs durch eine Chemotherapie betrachtet werden. Anschließend sollen die differenziell exprimierten miRs funktionell weiter analysiert werden. Beispielsweise sollen putative Ziele oder der Einfluss auf die Proliferation und Apoptose durch Überexpression oder Inhibierung der miRs in Mammakarzinomzelllinien bestimmt werden. Falls die untersuchten miRs im Mammakarzinom herunterreguliert sind, soll untersucht werden, welchen Einfluss die DNA-Methylierung und die Chromatinstruktur auf die Repression der Genexpression dieser miRs hat.

Ein Set von vier miRs, das auch die klinisch-relevanten miRs der ersten Studie enthalten wird, soll in einem weiteren Kollektiv validiert werden, das Serumproben von Patientinnen mit einem präoperativen Mammakarzinom, oder mit benignen Brustkrankungen und von gesunden Frauen umfasst. In diesem Kollektiv soll zudem ermittelt werden, ob die untersuchten miRs vorwiegend in Exosomen oder außerhalb der Vesikel zirkulieren, und inwiefern die beiden Formen der miRs mit den klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen korrelieren.

Neben diesen Studien über miRs, sollen in einem Teilprojekt PCR-basierte Mikrosatellitenanalysen im Plasma von Mammakarzinompatientinnen durchgeführt werden. Dabei soll das Vorkommen von LOH an zirkulierenden Tumorsuppressoren untersucht werden und mit den klinischen Daten korreliert werden.

Zusammenfassend soll aus diesen experimentellen Ansätzen ein Blut-basierter Tumormarker entwickelt werden, der mehr Spezifität in der Diagnostik des Mammakarzinoms leistet bzw. geeignet ist, die Patientinnen zu identifizieren, die ein erhöhtes Tumor- und Rezidivrisiko haben.

2 Material

2.1 Patientenmaterial

2.1.1 SUCCESS-Studie: Kollektiv für die LOH-Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurden für die LOH (Verlust der Heterozygotität)-Analysen postoperative Plasmaproben von Mammakarzinompatientinnen aus der SUCCESS Studie untersucht. Dabei handelt es sich um eine multizentrische, prospektiv, randomisierte Phase III Studie, die den Unterschied einer FEC (Fluorouracil, Epirubicin, Cyclophosphamide)-Docetaxel-Chemotherapie mit einer FEC-Docetaxel+Gemcitabine-Chemotherapie, sowie einer 2 mit einer 5 Jahre langen Zoledronattherapie vergleicht. Die Plasmaproben wurden zwischen 2005 und 2010 an 251 deutschen Zentren gesammelt. Die Studie wurde von den Ethik-Kommissionen genehmigt. Die Bestimmung des Tumorstatus zum Zeitpunkt der ersten Diagnose erfolgte nach der überarbeiteten AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) TNM (Tumor, Nodal, Metastasen)-Klassifikation [258]. Die Einstufung der primären Tumore (*Grading*) erfolgte nach den Vorgaben von Bloom und Richardson [149]. Zur Diagnose von Lymphknotenmetastasen wurden bis zu drei einzelne Lymphknotenareale untersucht. Die Bestimmung des Estrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus, sowie des HER2-Status erfolgte mittels IHC (Immunohistochemische)-Färbung. Für den HER2-Status wurde zusätzlich eine FISH (Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung)-Analyse durchgeführt, wenn die IHC-Färbung nicht eindeutig war. Die Patientinnen und gesunden Blutspenderinnen gaben vor Durchführung der Studie ihr schriftliches Einverständnis.

Aus dieser Studie wurden 388 Patientinnen, basierend auf ihrem HER2 Status, ausgewählt und eine gleichmäßige Verteilung der Risikofaktoren, wie Hormonrezeptor- und TNM-Status, berücksichtigt. Die klinischen Parameter sind in Tabelle 4.6 (Ergebnis-

se) zusammengefasst. Im Rahmen dieser Doktorarbeit war ich an den Analysen von 72 Patientinnen beteiligt. Die restlichen Plasmaproben wurden von Frau Jolanthe Kropidlowski (Medizinisch-technische Assistentin) bearbeitet.

2.1.2 Kollektive für die mikroRNA-Analysen

Zur Bestimmung der relativen miR-Konzentrationen wurden Serumproben von Brustkrebspatientinnen aus zwei Kollektiven untersucht.

MARIE-Studie: Kollektiv für die miR-Analysen

Für die miR-Analysen wurden zuerst Serumproben der MARIE (Mammakarzinom-Risikofaktoren-Erhebung) Studie verwendet. Dabei handelt es sich um eine bevölkerungsbezogene Studie zur Ermittlung möglicher Risikofaktoren, die die Entstehung von Brustkrebs nach den Wechseljahren beeinflussen. Eingeschlossen wurden deutschsprachige Frauen, zwischen 50 und 74 Jahren, im Zeitraum von 2002 bis 2005, aus den Regionen Rhein-Neckar-Karlsruhe und Hamburg, mit einem nach der „*International Classification of Diseases 10 pos. C50 or D05*“ histologisch bestätigtem primär invasivem oder *in situ* Brustkarzinom. Die Studie wurde von den Ethik-Kommissionen der Universität Heidelberg und der Ärztekammer Hamburg genehmigt und in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki durchgeführt. Alle Studienteilnehmer gaben vor Durchführung ihr schriftliches Einverständnis. Die histologische Einteilung der Tumore erfolgte in duktal, lobulär und aus statistischen Gründen wurden die anderen Formen in der vorliegende Arbeit unter „alle anderen“ zusammengefasst. Das Grading erfolgte nach einer Modifikation von Bloom und Richardson, die von Elston und Ellis [66] empfohlen wurde. Größe und Nodalstatus wurden anhand der Daten des TNM-Status extrahiert. Der Estrogen- und Progesteron-Rezeptorstatus wurde durch IHC-Färbungen und die „*Remmele Score*“ (IRS, *Immunoreactive Score*) nach Remmele und Stegner [232] bestimmt. IHC-Färbungen wurden auch angewandt, um die Expression des HER2-Rezeptors zu ermitteln. Im Falle einer schwachen positiven Reaktion erfolgte zusätzlich eine FISH.

Aus diesem Kollektiv wurde randomisiert Serum von 120 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom (M0) nach einer Operation und vor einer Chemotherapie untersucht. Es erfolgte eine Unterteilung in drei Untergruppen von jeweils 40 Patientinnen, mit einem ER⁺ (ER-positiven) und PR⁺ (PR-positiven) Karzinom, mit einem

HER2⁺ (HER2-positiven) Tumor oder mit einem für die drei Rezeptoren negativen Mammakarzinom. Des Weiteren wurde Serum von 40 Patientinnen mit einem primären ER⁺ und PR⁺ Mammakarzinom nach einer Operation und nach einer Chemotherapie und von 32 Patientinnen mit Fernmetastasen (M1) aufgearbeitet. Aus der Studie wurde zusätzlich Serum von gleichaltrigen gesunden Frauen, die als Kontrollgruppe dienen, untersucht. Eine Zusammenfassung der klinischen Parameter der Patientinnen ist in Tabelle 4.1 (Ergebnisse) dargestellt.

Kollektiv aus der Gynäkologie (UKE):

Die Serumproben des zweiten Kollektivs stammen aus der Serumbank der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie des UKE und wurden in den Jahren von 1999 bis 2007 gesammelt. Ausgewählt wurden Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, vor einer Operation und Therapie. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt, in Übereinstimmung mit der Erklärung von Helsinki und mit einer schriftlichen Einverständniserklärung der Teilnehmer durchgeführt. Die Erhebung der klinischen Daten erfolgte entsprechend den Angaben in der MARIE Studie.

Für diesen Teil der Arbeit wurden 168 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom, 19 Patientinnen mit einer benignen Brustkrankung und 28 gesunde Frauen analysiert. In Tabelle 4.4 (Ergebnisse) sind die klinischen Parameter zusammengefasst.

2.2 Chemikalien und Reagenzien

2.2.1 Enzyme und Längenstandards

Substanz	Firma, Ort
AmpliAq Gold® DNA Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
BigDye® Terminator	Life Technologies, Darmstadt
v3.1 Ready Reaction Mix	
DNA Marker, HyperLadder™ 100 bp	Bioline, Luckenwalde

Substanz	Firma, Ort
DNA Marker, VII	Roche, Mannheim
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fisher Scientific, Schwerte
Klenow Fragment	Fisher Scientific, Schwerte
Proteinmarker, PageRuler Plus prestained	Fisher Scientific, Schwerte
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Fisher Scientific, Schwerte
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Life Technologies, Darmstadt
T4-DNA Ligase	Fisher Scientific, Schwerte

2.2.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma, Ort
Aceton	J.T. Baker, Deventer, NL
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich, München
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
APS (Ammoniumpersulfat)	AppliChem, Darmstadt
5'-Aza-2'-Deoxycytidin	Sigma-Aldrich, München
Borsäure	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Bovines Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, München
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Merck, Darmstadt
Camptothecin	BioVision, Inc., Milpitas, USA
Chloroform p.a.	Merck, Darmstadt
cOmplete ULTRA Tablets, EDTA-free	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protease Inhibitoren Tabletten	
DMEM High Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Life Technologies, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxyd)	Sigma-Aldrich, München
dNTPs (Desoxynucleoside Triphosphate Set)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DTT (1,4-Dithiothreitol)	Carl Roth, Karlsruhe
ε-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, München
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma-Aldrich, München
EGF (Epidermal Growth Factor)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EtOH (Ethanol, 100% pa)	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Firma, Ort
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
ExoQuick-TC™	BioCat, Heidelberg
FcR Blocking Reagent mouse	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FGF (Fibroblast Growth Factor)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
GeneAmp™ 10X PCR Gold Buffer	Life Technologies, Darmstadt
GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard	Life Technologies, Darmstadt
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidin-Thiocyanat	Sigma-Aldrich, München
H ₂ O ₂ (Wasserstoffperoxid) 30%	Carl Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure) 2N	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich, München
Hi-Di™ Formamide	Life Technologies, Darmstadt
IC Fixation Buffer	eBioscience, Frankfurt
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich, München
Insulin-Transferrin-Selenium A	Life Technologies, Darmstadt
IPTG	Fisher Scientific, Schwerte
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma-Aldrich, München
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Sigma-Aldrich, München
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
LB (Luria Miller)-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
LB (Luria Miller)-Medium	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamine 200 mM	Life Technologies, Darmstadt
Loading Buffer (6x)	Fisher Scientific, Schwerte
Luminol	Sigma-Aldrich, München
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) 25 mM	Life Technologies, Darmstadt
MetaPhor™ Agarose	Lonza, Köln
Methanol	J.T. Baker, Deventer, NL
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue)	Sigma-Aldrich, München
NaCl (Natriumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
NaOH (Natriumhydroxid)	Carl Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Firma, Ort
<i>Nuclease-Free Water</i> (Nuklease freies Wasser)	Qiagen, Hilden
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, München
peqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen
Permeabilization Buffer (10x)	eBioscience, Frankfurt
POP-7™ Polymer	Life Technologies, Darmstadt
ProtoGel® 30%	National Diagnostics, Atlanta, USA
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, München
Roentoroll 25	Tetenal, Norderstedt
Roti®-Safe Gelstain	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	Life Technologies, Darmstadt
SeaKem® LE Agarose	Lonza, Köln
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	Affymetrix USB, Santa Clara, USA
S.O.C. Medium	Sigma-Aldrich, München
Streptomycin/Penicillin (200 U/ml)	Life Technologies, Darmstadt
Superfix 25	Tetenal, Norderstedt
TaqMan® microRNA Assays	Life Technologies, Darmstadt
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma-Aldrich, München
TMAC (Tetramethylammoniumchlorid)	Carl Roth, Karlsruhe
Trizma Base	Sigma-Aldrich, München
Triton X100	Sigma-Aldrich, München
Trypanblaulösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/ EDTA (25%)	Life Technologies, Darmstad
TSA (Trichostatin A)	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Merck, Darmstadt
X-Gal	Fisher Scientific, Schwerte
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.2.3 Kits

Kit	Firma, Ort
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega, Mannheim
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
DNA Clean & Concentrator™ Kit	Zymo Research, Freiburg

Kit	Firma, Ort
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fisher Scientific, Schwerte
Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
miRVana™ PARIS™ Kit	Life Technologies, Darmstadt
NucleoSpin® Tissue XS	Macherey-Nagel, Düren
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Darmstadt
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing	Life Technologies, Darmstadt
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Quiaprep Spin Mini Prep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Venor®GeM-OneStep	Minerva Biolabs GmbH, Berlin
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Mannheim

2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma, Ort
Aqua Stabil	Julabo, Seelbach
Aluminiumfolie	Universal, Bristol, England
Agarplatte	BD Biosciences, Heidelberg
Antifect N Liquid	Schülke und Mayr, Norderstedt
Cassettes 1.0mm	Life Technologies, Darmstadt
Centriplus Filter	Amicon, Millipore, Bedford, USA
ok Combitips Plus® (0,1 ml; 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckglas	Carl Roth, Karlsruhe
Drigalski-Spatel, Einweg	VWR, Darmstadt
Fermacidal D2	IC Products SA, Minusio, Schweiz
Filterspitzen (0,1-10 µl; 20-200 µl; 1ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Verbrauchsmaterial	Firma, Ort
Fuji MEDical X-Ray Film	Fujifilm, Düsseldorf
Glasobjektträger	R.Langenbrink, Emmendingen
ok Immobilon-P Membrane, PVDF	Merck Millipore, Schwalbach
Kimtech Science*, Satin Plus	Kimberley-Clark PROFESSIONAL, Koblenz-Rheinhafen
Kimtech Science*, Green Nitrile	Kimberley-Clark PROFESSIONAL, Koblenz-Rheinhafen
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Life Technologies, Darmstadt
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Darmstadt
Nunc IVF 1,8 mL CryoTube	Fisher Scientific, Schwerte
Whatman-Filter	VWR, Darmstadt
Multiply®-µStripPro	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm	Pechiney, Chicago, USA
Pipettenspitzen (0,1-10 µl; 20-200 µl; 1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylen-Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Raucotupf Stieltupfer	Lohmann & Rauscher, Neuwied
Reaktionsgefäße, 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
RNAse Zap™	Sigma-Aldrich, München
Serologische Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
twin.tec® real-time PCR plate	Eppendorf, Hamburg
6-Well-Platte (9,4 cm ²)	BD Biosciences, Heidelberg
96-Well Microplate	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflasche T25, T75	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.4 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Analysenwaage CPA224S-OCE	Sartorius, Göttingen
Automatic-Sarpette®	Sarstedt, Nümbrecht
Bakterienschüttler Certomat®	B. Braun Biotech, Melsungen

Gerät	Firma, Ort
Brutschrank, HeraCell® 15	Fisher Scientific, Schwerte
Brutschrank, HeraCell® 150	Fisher Scientific, Schwerte
Brutschrank, Heraeus Function Line	Kendro, Langenselbold
Durchlichtmikroskop, Wilovert S	Helmut Hund, Wetzlar
Eisbereiter FM-120 DE	Hoshizaki, Amsterdam, Niederlande
Elektrophoresekammer ComPor L Mini/Midi	Bioplastics, Landgraaf, Niederlande
FACS Aria III	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
7500 Fast Real-Time PCR System	Life Technologies, Darmstadt
Feinwaage, BP 610	Sartorius, Göttingen
Gefriertruhe, -80°C	Kryotec-Kryosafe, Hamburg
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Kirchdorf
Geldokumentation, Gene Genius	Syngene, Cambridge, UK
Genetic Analyzer 3130 Hitachi	Life Technologies, Darmstadt
Inverses Mikroskop, Axiovert 200	Carl Zeiss, Heidelberg
Klein-Zentrifuge, Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Klein-Zentrifuge, MC 6	Sarstedt, Nümbrecht
Kühl-Gefrierschrank	Liebherr, Ludwigshafen
Kühlzentrifuge, Heraeus Megafuge 40R	Fisher Scientific, Schwerte
Kühlzentrifuge, Heraeus 3S-R	Kendro, Langenselbold
Inkubator HERAcCell® 150	Fisher Scientific, Schwerte
Luminometer, GloMax® 20/20	Promega, Mannheim
Magnetrührer MR300	Heidolph, Schwabach
Mikroplattenlesegerät Sunrise™	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mikrowelle 800	Severin, Sundern
pH-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Proteinelektrophoresekammer XCell SureLock™	Life Technologies, Darmstadt
Realplex Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Roller, SRT 6	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Röntgenfilmentwickler Curix60	AGFA, Mortsels, Belgien
Scanner Epson 1680	Epson, Meerbusch

Gerät	Firma, Ort
Schüttler, Rotamax 120	Heidolph, Schwabach
Schüttler, Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Sonicator UP50H	Hielscher Ultrasonics, Teltow
Spannungsgerät, E143	Sigma-Aldrich, München
Spannungsgerät, EV202	Sigma-Aldrich, München
Spektralphotometer, NanoDrop ND-1000	Peqlab, Erlangen
Sterilwerkbank, HeraSafe® KS12	Kendro, Langenselbold
Stickstofftank, Taylor Wharton LS 4800	Tec-lab, Mönchengladbach
Thermocycler, peqStar 96 Universal Gradient	Peqlab, Erlangen
Thermocycler, PTC-200	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer HTM 130	HLC, Bocholt
Timer	Carl Roth, Karlsruhe
Tischzentrifuge, Heraeus Biofuge pico	Kendro, Langenselbold
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage BP 610	Sartorius, Göttingen
Objektträger Schnelltrockner TDO 66	Mettler-Toledo, Giessen
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
XCell II™ Blot Module	Life Technologies, Darmstadt
Zählkammer, Neubauer improved	Optik Labor, Fried

2.5 Lösungen

Für die Lösungen wurde, falls nicht anders vermerkt, gefiltertes Wasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (0,2 µm Filtergröße, MembraPURE GmbH, Bodenheim) verwendet.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
10x Annexin-FITC Bindepuffer	0,1 M Hepes/NaOH, pH 7,4 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ x2H ₂ O

2 Material

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Blockingpuffer	5% Milchpulver oder 5% BSA in 1x TBST
Boris Färbepuffer	0,1% BSA 0,1% Natriumazid in 1x PBS
6x DNA Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylenecyanol FF 30% Glycerin
ECL-Lösung 1	0,2mM p-Cumarsäure 1,25mM Luminol 100 mM Tris pH 8.5
Lösung 2	0.0009% (v/v) H ₂ O ₂ 100 mM Tris pH 8.5
5x Laemmli Laufpuffer	125 mM Tris 17 mM SDS 960 mM Glycin
Leukozyten-Lysepuffer	0,3 M Sucrose 10 mM Tris/HCl (ph 7,5) 5 mM Magnesiumchlorid 1% Triton X100
1x PBS (pH 7,2- 7,4)	128 mM NaCl 2 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Proteinlösungspffer	30 mM Tris/HCl (pH 8,8) 2% SDS
MTT-Lysepuffer	4 mM HCl 0,1% IGEPAL CA-630 in Isopropanol
Promega Waschpuffer	162,8 mM Kaliumacetat 22,6 mM Tris/HCl (ph 7,5) 0,109 mM EDTA (pH 8)

2 Material

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
RIPA Puffer	150 mM NaCl 1% IGEPAL CA-630 0,5% (w/v) Natrium Deoxycholat 0,1% (w/v) SDS 50 mM Tris/HCl (pH 8)
5x RNA Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylenecyanol FF 1 mM EDTA (pH 8) 50% Glycerin
4x SDS Probenpuffer	240 mM Tris (pH 6,8) 40% (v/v) Glycerol 0,03% (w/v) Bromphenolblau 4 (w/v) SDS
1x Strippuffer (pH9,5)	62 mM Tris 0,8% (v/v) β -Mercaptoethanol 69 mM SDS 0,5 mM DTT frisch zugeben
1x TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA 1% (v/v) Essigsäure
5x TBE	445 mM Tris/HCl (pH 8) 455 mM Borsäure 10 mM EDTA
1x TBS (verschiedenen pH-Werte)	7,7 mM Tris/HCl (pH 8) 150 M NaCl
10x TBST (pH 7.6)	200 mM Tris 1,37 M NaCl 0,1% Tween 20
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8) 1 mM EDTA
1x Transferpuffer	48 mM Trisbase 39 mM Glycin 0,037% (v/v) SDS 20% MeOH

2.6 Medien, Agarplatten und verwendete Antibiotika

2.6.1 Medien für Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium:

Das Medium wurde durch Zugabe von 12,5 g LB (Luria Miller)-Medium zu 500 ml bidestilliertem Wasser hergestellt, und anschließend autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, München).

2.6.2 Agarplatten

Zur Herstellung von Agarplatten wurden 500ml bidestilliertem Wasser vor dem Autoklavieren 20g LB (Luria Miller)-Agar (Carl Roth, Karlsruhe) zugefügt. Anschließend wurde das Medium auf 55°C abgekühlt, und kurz vor dem Gießen der Platten mit 100µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, München) versetzt. Die Platten wurden nach dem Aushärten bei 4°C aufbewahrt.

2.6.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Die für die Zellkultur genutzten Medien wurden vor Gebrauch mit den unten genannten Lösungen versetzt.

Medium für die Zelllinien MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, GI-101:

90% (v/v) DMEM	Life Technologies, Darmstadt
10% (v/v) FCS (Fetal Calf Serum)	PAA, Cölbe
2 mM L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt
200 U/ml Streptomycin /Penicillin	Life Technologies, Darmstadt

Medium für die Zelllinie BC-M1:

90% (v/v) RPMI	Life Technologies, Darmstadt
10% (v/v) FCS	PAA, Cölbe
2 mM L-Glutamin	Life Technologies, Darmstadt
200 U/ml Streptomycin /Penicillin	Life Technologies, Darmstadt
10 mg/ml Insulin-Transferrin-Selenium-A	Life Technologies, Darmstadt
50 ng/ml EGF	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
10 ng/ml FGF	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.7 Biologische Materialien

2.7.1 Bakterienstämme

Für die Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterienstämme wurde der Bakterienstamm Escherichia coli DH5α von Life Technologies, Darmstadt verwendet.

2.7.2 Humane Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
MCF-7	duktales Mammakarzinom	ATCC ^a , Wesel
MDA-MB-231	duktales Mammakarzinom	ATCC, Wesel
MDA-MB-468	Adenokarzinom der Mamma	ATCC, Wesel
GI-101	duktales Mammakarzinom	ATCC, Wesel
BC-M1	mikrometastatische Brustkarzinom-zelllinie	Pantel et al. 1995

American Type Culture Collection (www.lgcstandards-atcc.org)

2.7.3 Synthetische DNA-Oligonukleotide

Für den Knock-down der miRs:

Die Inhibierung der miRs in Zelllinien erfolgte mittels der miScript miRNA Inhibitoren von Qiagen, Hilden. Dabei handelt es sich um chemisch synthetisierte, einzelstängige und modifizierte RNAs, die die endogenen miRs spezifisch inhibieren. Die folgenden Inhibitoren wurden verwendet: Anti-hsa-miR-34a, Anti-hsa-miR-93, hsa-miR-155, hsa-miR-373.

Für die Überexpression der miRs:

Eine Überexpression der miRs in Zellen erfolgte zum Einen durch chemisch synthetisierten doppelsträngigen RNA Moleküle, sogenannte miScript miRNA Mimics (miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373) der Firma Qiagen und zum Anderen durch selbsthergestellte Expressionsvektoren.

Für die Expressionsplasmide, die für miR-34a, miR-155 und miR-373 kodieren, wurden die folgenden einzelstängigen DNA Stücke von Sigma-Aldrich (München) bestellt. Die XhoI Schnittstelle ist fett gedruckt.

miR-34a sense: 5'- TCA TAC **TCG AGA** TCT GGC CAG CTG
TGA GTG TTT CTT TGG CAGT GTC TTA GCT
GGT TGT TGT GAG CAA TAG TAA GGA AG - 3'

antisense: 5'- AAC CGC **TCG AGG** ATC CGG GCC CCA CAA
CGT GCA GCA CTT CTA GGG CAG TAT ACT
TGC TGA TTG CTT CCT TAC TAT TGC TCA CA - 3'

miR-155 sense: 5'- TCA TAC **TCG AGA** TCT CTG TTA ATG CTA
ATC GTG ATA GGG GTT TTT GCC TCC AAC TGA - 3'

antisense: 5'- AAC CGC **TCG AGG** ACT GTT AAT GCT AAT
ATG TAG GAG TCA GTT GGA GGC AAA A - 3'

miR-373 sense: 5'- TCA TAC **TCG AGA** TCT GGG ATA CTC AAA ATG
GGG GCG CTT TCC TTT TTG TCT GTA CTG G - 3'

antinsense: 5'- AAC CGC **TCG AGG** ATC CGG GAC ACC CCA AAA
TCG AAG CAC TTC CCA GTA CAG ACA AAA A - 3'

Für die Luciferase-Analysen:

Um tumorrelevante mRNA-Ziele der miRs zu ermitteln, wurden potenzielle, in der 3' UTR ihrer Ziel-mRNA liegende, miR-Bindestellen kloniert. Die putativen Bindestellen sind grau unterlegt.

Ziel	miR		Sequenz
PU1	miR-34a	sense:	5'- CTA GCG CAA CCT TGC AG A GGA CGA CCC GGG GTA CTG CC T TGG GAG TCT CAT - 3'
		antisense:	5'- CTA GAT GAG ACT CCC AAG GCA GTA CCC CGG GTC GTC CTC TGC AAG GTT GCG - 3'
KRAS	miR-155	sense:	5'- CTA GCT ACA CTA AAT T AT TAG CAT TTG TTT TAG CAT TAC CTA ATT TTT TTT - 3'
		antisense:	5'- CTA GAA AAA AAA TTA GGT AAT GCT AAA ACA AAT GCT AAT AAT TTA GTG TAG - 3'
SP1	miR-155	sense:	5'- CTA GCA AGA GAC ATG G AA GAG AGA GCC ATG AAG CAT TAA AAT GCA TGG TGT - 3'
		antisense:	5'- CTA GAC ACC ATG CAT TTT AAT GCT TCA TGG CTC TCT CTT CCA TGT CTC TTG - 3'
MLH1	miR-373	sense:	5'- CTA GCA CAA AGT GTA C CA ACA TAA GTG TTG GTA GCA CTT AAG ACT TAT ACT - 3'
		antisense:	5'- CTA GAG TAT AAG TCT TAA GTG CTA CCA ACA CTT ATG TTG GTA CAC TTT GTG - 3'

Für die qPCR:

Für die Amplifikation der mikroRNAs aus den Serumproben wurden die folgenden TaqMan® MicroRNA Assays von Life Technologies, Darmstadt verwendet:

MARIE Studie:

hsa-miR-16	endogene Kontrolle, beide Kollektive
hsa-miR-10b	zu untersuchende miR
hsa-miR-17	zu untersuchende miR
hsa-miR-34a	zu untersuchende miR
mmu-miR-93	zu untersuchende miR
hsa-miR-155	zu untersuchende miR
hsa-miR-373	zu untersuchende miR

UKE-Gynäkologie Studie:

cel-39	spike-in Kontrolle
hsa-miR-16	endogene Kontrolle
hsa-miR-484	endogene Kontrolle
hsa-miR-101	zu untersuchende miR
hsa-miR-371	zu untersuchende miR
hsa-miR-372	zu untersuchende miR
hsa-miR-373	zu untersuchende miR

Um die Ziel-mRNAs für die miRs zu bestimmen werden die nachfolgenden qPCR-Primer für die Funktionsanalysen verwendet. Alle Primer sind intronüberspannend, um bei möglicher Verunreinigung der cDNA mit genomischer DNA verfälschte Ergebnisse zu vermeiden.

Bax (97bp) sense:	5'- ATG GAG CTG CAG AGG ATG ATT - 3'
antisense:	5'- TGA AGT TGC CGT CAG AAA ACA - 3'
BRCA1 (99bp) sense:	5'- TAA GCC AGA ATC CAG AAG GC - 3'
antisense:	5'- GGG ATG ACC TTT CCA CTC CT - 3'
CD44 (113bp) sense:	5'- CCC AGA TGG AGA AAG CTC TG - 3'
antisense:	5'- GTT GTT TGC TGC ACA GAT GG - 3'
E-Cadherin (172bp) sense:	5'- TGC CCA GAA AAT GAA AAA GG - 3'
antisense:	5'- GTG TAT GTG GCA ATG CGT TC - 3'
ESR1 (101bp) sense:	5'- GCA TTC TAC AGG CCA AAT TCA - 3'
antisense:	5'- TCC TTG GCA GAT TCC ATA GC - 3'
ETS1 (197bp) sense:	5'- TGT ATT TTG CAT CCC TGG TT - 3'
antisense:	5'- AAC GAC ATG CAT TCA GGA CT - 3'
GAPDH (90bp) sense:	5'- CCT GCA CCA CCA ACT GCT TAG - 3'
antisense:	5'- TGG CAT GGA CTG TGG TCA TG - 3'
MAGE D2 (199bp) sense:	5'- CGA GCA GGC TAT TCC TTG G - 3'
antisense:	5'- CCT CAC TGG ACC GAT TTC - 3'
MBD2 (86bp) sense:	5'- AGT GAA ATC AGA CCC ACA ACG AA - 3'
antisense:	5'- CAT CTG ATG CAC TAA GTC CTT GTA GC - 3'

PTEN (126bp) sense: 5'- CCC AGA CAT GAC AGC CAT C - 3'
antisense: 5'- TCT GCA GGA AAT CCC ATA GC - 3'
SP1 (106bp) sense: 5'- GCC TCC AGA CCA TTA ACC TCA GT - 3'
antisense: 5'- GCT CCA TGA TCA CCT GGG GCA T - 3'

DNA-Methylierungs-spezifische Primer:

Die folgenden Primer wurden speziell für die mit Bisulfit behandelte DNA entworfen. Bisulfit wandelt alle nicht methylierten Cytosine zu Thyminen um. Es handelt sich hier um Primer für die Promotorregion der MAGE A Gene.

MAGE A1 (322bp) sense: 5'- CCC AAG CTT TTT TAT TTT
TAT TTA GGT AGG ATT - 3'
antisense: 5'- CGG GGT ACC CCT AAT ATC
TCT CAA AAC TTT TAA - 3'
MAGE A2 (563bp) sense: 5'- GGT ATA TAT TGG TAA TGA
TTT TAT TT(T/C) GAG - 3'
antisense: 5'- CCC TAC AAA AAA ATC CAA
ACC C(G/A)A CAA - 3'
MAGE A3 (482bp) sense: 5'- AGA TTT GGT TTG AGG GGA GTA GAA GT - 3'
antisense: 5'- AAC CC(C/T) ACA ACA AAA ACA ACA CTA AA - 3'
MAGE A12 (377bp) sense: 5'- GGA TTT TTA TTT AGG AAG AAT TTA GTT T - 3'
antisense: 5'- CTC TTA CAC CAA AAT TCC TA - 3'

Für die LOH-Analysen:

Die sense Primer für die LOH-Analysen der Plasma Proben von der SUCCESS-Studie sind an ihren 5' Enden fluoreszenz-markiert. Die Primer D3S1605, D10S1765, D12S1660, D16S421 und D17S855 sind mit dem Fluorophor FAM (6-Carboxyfluorescein) markiert. FAM wird bei 495 nm angeregt und emittiert Licht bei 515 nm. Die Primer D11S4200, D12S1725 und D13S218 sind mit dem Fluorophor HEX (Hexachlorofluorescein) markiert. Die Anregung von HEX erfolgt bei 535 nm und die Lichtemission bei 555 nm.

D3S1605 (TIG1) sense: 5'- CTC ATT TGC TTA AGG TTT GAT C - 3'
antisense: 5'- TAG ACT TCC ACC CTG GCT - 3'
D10S1765 (PTEN) sense: 5'- ACA CTT ACA TAG TGC TTT CTG CG - 3'
antisense: 5'- CAG CCT CCC AAA GTT GC - 3'
D11S4200 (CD44) sense: 5'- TTT GTG TTA TTA TTT CAG GTG C - 3'
antisense: 5'- GTT TTT TGT TTC AGT TTA GGA AC - 3'
D12S1660 (GLIPR1) sense: 5'- TTC TTC ATT GTA CTG TCA AAA ATT ATC - 3'
antisense: 5'- GAA ATC AGC TGG ATA GAC CTG - 3'
D12S1725 (Cyclin D2) sense: 5'- TTT GTC CCT TGG AGA TTT TT - 3'
antisense: 5'- GGA TAA CGG TTG GCT GG - 3'
D13S218 (RB1) sense: 5'- GAT TTG AAA ATG AGC AGT CC - 3'
antisense: 5'- GTC GGG CACT ACG TTT ATC T - 3'
D16S421 (E-Cadherin) sense: 5'- ACA TGA ACC GAT TGG ACT GA - 3'
antisense: 5'- CCG TTC CCT ATA TTT CCT GG - 3'
D17S855 (BRCA1) sense: 5'- GGA TGG CCT TTT AGA AAG TGG - 3'
antisense: 5'- ACA CAG ACT TGT CCT ACT GCC - 3'

Für die DNA-Sequenzierung:

Für den pcDNA Vektor:

T7 sense: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
BGH antisense: 5'- TAG AAG GCA CAG TCG AGG - 3'

Für den pmirGLO Vektor:

sense: 5'- ACA CGG TAA AAC CAT GAC - 3'
antisense: 5'- GTC CAA ACT CAT CAA TTG TA - 3'

Für den TOPO Vektor:

M13 sense: 5'- -GTA AAA CGA CGG CCA G - 3'
M13 antisense: 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
T3 sense: 5'- ATT AA CCC TCA CTA AAG GGA - 3'
T7 antisense: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'

2.7.4 Antikörper

Antikörper für das durchflusszytometrische Sortieren (FACS):

Primärantikörper:

Purified Mouse IgG1 κ	BD Biosciences, Heidelberg
Isotype Control	

Anti-Boris Antikörper 5 (Maus, monoklonal)	Prof. Loukinov, NIH, NAID Rockville, USA
---	---

Sekundärantikörper:

FITC Goat Anti-Mouse IgG/IgM	BD Biosciences, Heidelberg
Alexa Fluor® 488 Goat	Life Technologies, Darmstadt

Anti-Mouse IgG (H+L)

Antikörper für die durchflusszytometrische Apoptosemessung:

Annexin V-FITC	BD Biosciences, Heidelberg
----------------	----------------------------

Antikörper für den Western Blot:

Primärantikörper:

Anti-Bax Δ 21 Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-CD44 Antikörper (156-3C11, Maus, monoklonal)	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-CD63 Antikörper (Kaninchen, polyklonal)	BioCat, Heidelberg
Anti-c-Erb/c-Neu Ab-3 Antikörper (3B5, Maus, monoklonal)	Merck Millipore, Schwalbach

Anti-E-Cadherin Antikörper (EP700Y, Kaninchen, monoklonal)	Epitomics, Burlingame, USA
Anti-ER Ab-14 Antikörper (1D5+6F11, Maus, monoklonal)	Fisher Scientific, Schwerte
Anti-HSC70 B-6 Antikörper (Maus, monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-MAGE-D2 G-14 Antikörper (Maus, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-MBD2 Antikörper (ab5824, Ziege, polyklonal)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-PTEN Antikörper (138G6, Kaninchen, monoklonal)	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-Smad2 Antikörper (86F7, Kaninchen, monoklonal)	New England Biolabs, Frankfurt
Anti-SP1 Antikörper (86F7, Kaninchen, polyklonal)	Merck Millipore, Schwalbach
Sekundärantikörper:	
Anti Kaninchen IgG-HRP (horse radish peroxidase) konjugiert (Ziege)	Dako, Hamburg

2.7.5 Plasmide und Vektoren

pcDNA 3.1 (+) Expressionsplasmid	Promega, Mannheim
pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector	Promega, Mannheim
pCR TM 4-TOPO®	Life Technologies, Darmstadt
pBIG-HA BORIS	Prof. Loukinov, NIH, NAID Rockville, USA

2.7.6 Restriktionsenzyme

4 NheI (10000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
XbaI (20000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
XhoI (20000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
EcoRI (20000 U/ml)	New England Biolabs, Frankfurt
EcoRI Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt
NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt
NEBuffer 2 (10x)	New England Biolabs, Frankfurt

2.7.7 Datenbanken und Software

Analyse der hergestellten Primer:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Analyse der Restriktionsschnittstellen:	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
Informationen zu Proteinen	http://http://www.uniprot.org/
MicroRNA Informationen	http://www.mirbase.org/
MicroRNA Ziel-mRNAs (Diana)	http://http://diana.cslab.ece.ntua.gr/
MicroRNA Ziel-mRNAs (microRNA.org)	http://www.microRNA.org/
MicroRNA Ziel-mRNAs (targetscan)	http://http://www.targetscan.org/

Weitere Software: Excel, Word (Microsoft); Adobe Reader, Adobe Photo Shop (Adobe); FinchTV (Geospiza); Glomax (Promega); Gene Mapper 4.0, Sequencing Analysis 5.2, 7500 Fast System SDS Software (Life Technologies); Replex (Eppendorf), BD FACSDiva™ Software (BD Biosciences)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die für die Experimente benötigten Zelllinien werden in Kultur genommen. Dazu werden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen bei 37°C aufgetaut und in eine Zellkulturflasche mit dem entsprechenden vorgewärmten Medium überführt. Nach 24 Std erfolgte ein Wechsel des Mediums.

Gewöhnlich erfolgt die Kultivierung bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 10%. Die Ausnahme bildet die BC-M1 Zelllinie, die einen 5%igen CO₂ und einen 10%igen O₂-Gehalt benötigt. Bei einer Konfluenz von 80-100% werden die Zellen passagiert. Nach einem Waschschrift mit PBS werden die Zellen mittels Trypsin-EDTA vom Boden gelöst und die Reaktion der Protease mit dem im Medium vorhandenen FCS gestoppt. Die Zellen werden in frischem Medium resuspendiert und entsprechend dem Versuch und ihrer Zellteilungsrate ausgesät.

Zur Lagerung werden die Zellen nach dem Trypsinisieren in mit 10% (v/v) DMSO versetztem Zellkulturmedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und in einer Styroporbox 1 Std bei -20°C und über Nacht bei -80°C langsam abgekühlt. Die anschließende Konservierung erfolgt in flüssigem Stickstoff.

Die Zellzahl wird durch eine 1:1 Mischung von Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer nach dem Protoll des Herstellers ermittelt. Die Zellen werden in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Venor®GeM Kits gemäß den Herstellerangaben auf Mykoplasmen getestet.

3.1.2 Behandlung der Zellen mit Trichostatin A und 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Um den Einfluss der DNA-Methylierung und Histon-Deazetylierung auf die Repression der miR-Expression zu untersuchen, wurden MDA-MB-231, MDA-MB-468, MCF-7 und GI-101 Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) und Trichostatin A (TSA) behandelt. Bei Aza handelt es sich um ein Cytidin-Analog, das durch Bindung der Methyltransferase die DNA-Methylierung verhindert. TSA ist ein Inhibitor der Histondeazetylase und führt somit zu einer Azetylierung der Histone.

Die Zellen werden mit einer Dichte von 20-25% ausgesät und nach 24 Std, 48 Std und 72 Std mit 1 μ M Aza inkubiert. Die Zugabe von 0,5 μ M TSA erfolgt nach 72 Std. Insgesamt werden vier Versuchsansätze gewählt, in denen die Zellen unbehandelt sind (Kontrolle), nur mit TSA, ausschließlich mit Aza oder mit beiden Substanzen behandelt werden. Die Ernte der Zellen erfolgt nach 96 Std.

3.1.3 Transfektion von Zelllinien

Um eukaryotische Zellen zu transfizieren, wird das X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent benutzt. Es handelt sich dabei um ein Reagenz aus mehreren Komponenten, das einen Komplex mit der DNA formt, um sie in die Zelle zu transportieren.

miR-Überexpression:

3 x 10⁵ MCF-7, GI-101, MDA-MB-231 oder MDA-MB-468 Zellen oder 3,5 x 10⁵ BC-M1 Zellen werden pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät und nach 24 Std mittels X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent transfiziert. Zunächst wird das Transfektionsreagenz auf Raumtemperatur erwärmt. 1 μ g des Expressionsplasmids, 5 nM miR-Mimic (chemisch synthetisierte doppelsträngige RNA Moleküle) oder 50 nM miR-Inhibitor (chemisch synthetisierte einzelsträngige RNA Moleküle) werden mit 0,2 ml Serum-freien Medium gemischt und nach Zugabe von 2 μ l des Transfektionsreagenz für 15 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wird anschließend tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Nach 48 Std werden die Zellen geerntet und RNA und/oder Proteine extrahiert. Zur Kontrolle werden die Zellen auch mit dem Transfektionsreagenz oder mit dem Transfektionsreagenz und dem leeren Expressionsplasmid oder nur mit Serum-freien Medium inkubiert. Die Überexpression der miRs wird mittels RT-qPCR kontrolliert.

Proliferationsassay:

2.500 MCF-7, GI-101, MDA-MB-231, MDA-MB-468 Zellen oder 3.500 BC-M1 Zellen werden pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät und nach 24 Std mittels XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent transfiziert. 0,03 µg des Expressionsplasmids, 0,3 nM miR-Mimic oder 1,5 nm miR-Inhibitor werden mit 10 µl Serum-freien Medium gemischt und nach Zugabe von 0,1 µl des Transfektionsreagenz für 15 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wird anschließend auf die Zellen gegeben.

Luciferaseassay:

Die Transfektionen des Luciferaseassays entspricht der miR-Überexpression, mit dem Unterschied, dass das Expressionsplasmid oder die Mimic mit 1 µg des Luciferase Vektors zusammen transfiziert werden. Als Kontrolle werden zusätzlich zu den oben genannten Ansätzen noch die Transfektion mit den Leervektoren des Reporter- und des Expressionsplasmids genutzt.

BORIS-Transfektion:

Für diesen Versuch werden $1,75 \times 10^6$ MCF-7 Zellen in einer T75er Flasche ausgesät. 5,5 µg pBIG-HA Boris Konstrukt werden mit 11 µl Transfektionsreagenz in 1,1 ml Serum-freien DMEM gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. 1 ml des Transfektionsansatzes wird tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. Die Zellernte erfolgt 48 Std nach der Transfektion. Im Kontrollansatz befindet sich der Transfektionsansatz oder nur Medium.

3.1.4 Behandlung der Zellen mit Camptothecin

Ein möglicher Effekt von den miRs auf eine induzierte Zelloptose wird durch Behandlung von MCF-7 und BC-M1 Zellen mit Camptothecin untersucht. Camptothecin ist ein Inhibitor der Topoisomerase I und wird auch in der Tumorbehandlung eingesetzt.

3×10^5 Zellen pro Well werden in einer 6-Well Platte ausgesät und nach 24 Std mit den miR-373 und miR-155 Konstrukten oder den synthetischen miR-373 und miR-155 Mimics transfiziert. Nach weiteren 24 Std werden die Zellen mit 6 µM Camptothecin

für 4 Std bei 37°C inkubiert. 48 Std nach der Induktion der Apoptose werden die Zellen mit Hilfe des Axiovert 200 durlichtmikroskopisch fotografiert oder am FACS-Canto II analysiert. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen, transfizierte Zellen ohne Camptothecin Behandlung und nichttransfizierte, mit Camptothecin behandelte Zellen.

3.1.5 Zellernte

Für die RNA- und Proteinisolation erfolgt die Ernte der Zellen mittels Schaber. Zunächst wird das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen. Anschließend werden zweimal 1ml PBS auf die Zellen pipettiert. Sie werden mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß, auf Eis, überführt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm für 3 min und 4°C. Der Überstand wird verworfen und es wird mit der RNA und/oder Proteinextraktion fortgefahren.

Für den Luciferaseassay erfolgt die Zellernte mittels Passive Lysis Puffer, der im Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit enthalten ist. Die Zellen werden einmal mit kaltem 1xPBS gewaschen und 250 µl des 1x Puffers dazu gegeben. Es folgt eine 15-minütige Inkubation bei RT, unter Schütteln. Der Überstand wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis pipettiert.

Um die Zellstruktur zu erhalten werden die Zellen für die FACS-Analysen mittels Trypsin-EDTA geerntet. Die gelösten Zellen werden in Medium resuspendiert, in ein 15-ml Polypropylen-Röhrchen überführt, bei 1500 g für 3 min und RT zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Für den Apoptose-Assay werden die bereits abgestorbenen Zellen im Medium vor der Zentrifugation zu den durch Trypsin gelösten Zellen gegeben.

3.1.6 Proliferationsassay

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue) ist ein wasserlösliches Salz, dass zu einer gelben Färbung in Lösung führt. Bei Abspaltung des Tetrazolium-Rings wird MTT zu einem Wasser-unlöslichen, violetten Formazan. Diese Reaktion wird von der mitochondrialen Dehydrogenase katalysiert, die nur in lebenden Zellen aktiv ist. Daher kann mit dieser Methode die Zahl lebender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten und

somit die Zellproliferation gemessen werden. Als Messzeitpunkte werden 0, 24, 48 und 72 Std nach der Transfektion der Zellen gewählt. 20 µl der MTT Lösung (5 mg/ml in PBS) werden zu den Zellen gegeben und für 3 Std bei 37°C inkubiert. Der Überstand wird anschließend abgenommen und die Zellen in 150 µl MTT-Lysepuffer resuspendiert. Die Messung erfolgt bei 540 nm und mit einer Referenz von 650 nm am Mikroplattenlesegerät SunriseTM. Jede Analyse wird in Triplikaten angesetzt.

3.1.7 Mykoplasmentest

Die Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen ist ein häufiges Problem. Da sich ein Befall auf die Ergebnisse auswirken kann, werden die Zellen regelmäßig auf diese zellwandlosen Bakterien getestet. Der auf PCR basierende Mykoplasmentest wird mit dem Überstand der Zellen nach dem Herstellerprotokoll des Venor®GeM-OneStep Kits durchgeführt. Die Auswertung erfolgt auf einem 2%igen Agarosegel. Bei einem Befall der Zellen werden diese entsorgt.

3.2 Isolierung von Leukozyten aus Vollblut

Die aus Leukozyten isolierte genomische DNA wird bei den LOH-Analysen als Kontrolle für den jeweiligen Patienten genutzt. Die Leukozytenisolierung wird vollständig auf Eis durchgeführt. Das Vollblut wird zunächst mit 2-3 ml des Leukozyten-Lysepuffers versetzt, in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen überführt und dieses vollständig mit dem Lysepuffer aufgefüllt. Es folgt ein Inkubationsschritt von 15-30 min und ein Zentrifugationsschritt bei 3500 rpm, für 20 min und 4°C. Der Überstand wird verworfen, das Pellet zunächst in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und erneut mit dem Puffer auf 50 ml aufgefüllt. Der Inkubations- und Zentrifugationsschritt werden wiederholt. Das Pellet wird erneut in 1 ml Lysepuffer resuspendiert, diesmal in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13.000 rpm für 5 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt und das Pellet bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

3.3.1 Isolierung genomischer DNA

Isolierung genomischer DNA aus Leukozyten

Die DNA-Isolierung aus Leukozyten wird mittels QIAamp® Blood Mini Kit nach den Herstellerangaben für kultivierte Zellen ausgeführt. Aufgelistet sind Abweichungen von dem angegebenen Protokoll: Der Inkubationsschritt bei 56°C wird auf 2-3 Std unter regelmäßigem Vortexen verlängert. Die Zentrifugation wird immer bei 13.000 rpm, für 1 min und bei RT durchgeführt. Für die Elution werden zweimal aufeinanderfolgend 100 µl AE Puffer auf die Säule gegeben, für 1 min inkubiert und anschließend zentrifugiert. Es folgt eine Konzentrationsbestimmung des Eluats am NanoDrop ND-1000.

Isolierung und Fraktionierung genomischer DNA aus Plasma

Die Isolierung der hochmolekularen, genomischen DNA aus Plasma wird mit dem QIAamp® Blood Mini Kit nach den Herstellerangaben für Blut oder Körperflüssigkeiten ausgeführt. Beschrieben sind Abweichungen des Protokolls: 2 ml Plasma werden in ein 15-ml Polypropylen-Röhrchen überführt, was dem 10-fachen des Probenvolumen im Protokoll entspricht. Daher wird die Menge der eingesetzten Protease, des Lysepuffers und des absoluten Ethanol entsprechend erhöht. Die Inkubationszeit bei 56°C beträgt 15 min. 0,5 ml des Inkubats werden auf die Säule gegeben und der jeweilige Durchfluss wird zusammengeführt und für die Isolierung der niedrigmolekularen, genomischen DNA mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System verwendet. Das Volumen des AW1 und AW2 Puffers wird auf 0,7 ml erhöht. Die Elution erfolgt mit 0,1 ml AE Puffer. Die zusammengeführten Eluate werden mit 2 Vol 6 M Guanidinthiocyanat versetzt und invertiert. Es folgt eine 10-minütige Inkubation bei RT. Der Ansatz wird in Schritten von 0,7 ml auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Alle Zentrifugationsschritte finden bei 13.000 rpm, für 1 min und bei RT statt. Die Waschschritte und Elution erfolgen den Herstellerangaben entsprechend, mit einer Verringerung des Elutionsvolumen auf 50 µl. Es folgt eine Konzentrationsbestimmung des Eluats mit dem NanoDrop ND-1000.

Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Auf Grund der schlechten Transfektionseffizienz und damit verbundenen geringen Menge der durchflusszytometrisch positiv gesorteten Zellen wird zur DNA Isolierung aus Zellen das NucleoSpin® Tissue XS Kit, nach Herstellerangaben, genutzt.

3.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Isolierung der Gesamt-RNA aus Serum und Exosomen

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus 400 µl Serum bzw. aus den Exosomen in 400 µl Serum wird mit dem *miRVana*TM *PARIS*TM Kit, nach den Herstellerangaben, durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Verfahren der Phenol/Chloroform Trennung und der Aufreinigung mit Hilfe eines Filters. Die Konzentration des Eluats wird mit dem NanoDrop ND-1000 bestimmt und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt. Die RNA kann sowohl zur Quantifizierung der miRs als auch der mRNA genutzt werden. Für das Kollektiv der Gynäkologie des UKE wurden nach Zugabe des Denaturierungsreagenz 25 fmol der künstlich hergestellten cel-39 RNA in die Serumproben gegeben. Die cel-39 RNA dient als Kontrolle für eine gleichmäßige Verarbeitung der Proben.

Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zelllinien werden die Herstellerangaben für peq-GOLD TriFastTM zur Isolation von RNA aus adherenten Zellen befolgt. Die RNA wird in einem geeigneten Volumen nuklease-freiem Wasser eluiert, mittels NanoDrop ND-1000 quantifiziert und bei -80°C aufbewahrt. Die auf diese Weise gewonnene RNA eignet sich zur Bestimmung der miR und mRNA Expression.

3.3.3 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation erfolgt durch eine Extraktion der Plasmid-DNA aus einer Übernachtskultur. Zur Herstellung einer Übernachtskultur werden einzelne, transformierte DH5α-Kolonien, die auf Agarplatten (mit 50 µg/ml Ampicillin) gewachsen sind, in ein Polypropylen-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C und 160 rpm inkubiert.

Die Minipräparation aus 1 ml Übernachtskultur wird mit Hilfe des Quiaprep Spin Mini Prep Kits durchgeführt und das Protokoll des Herstellers wird befolgt. Mit der gewonnenen Plasmid-DNA wird ein Restriktionsverdau zur Überprüfung der Ligation und Transformation durchgeführt. Bei erfolgreicher Transformation erfolgt der Ansatz für eine Maxipräparation.

3.3.4 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zunächst wird eine Vorkultur angefertigt. Dazu werden einzelne, transformierte DH5 α -Kolonien, die auf Agarplatten (mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) gewachsen sind, für 6 Std in einem Polypropylen-Röhrchen mit 5 ml LB-Medium (mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) inkubiert. 0,1 ml der Vorkultur werden zu 100 ml LB-Medium (mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) gegeben und über Nacht bei 37°C und 160 rpm inkubiert.

Die Abzentrifugation der Bakterien erfolgt bei 4°C, 6000 rpm und für 20 min. Anschließend wird das Protokoll der Firma Qiagen für das QIAfilter Plasmid Maxi Kit befolgt. Die isolierte Plasmid-DNA kann zur Transfektion sowie zur Sequenzierung genutzt werden.

3.3.5 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsbestimmung der isolierten Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit dem Spektralphotometer NanoDrop ND-1000 gemessen. Das Absorptionsmaximum der gemessenen Nukleinsäuren (OD 260nm) wird bestimmt und Verunreinigungen durch Proteine (OD 280nm) festgestellt. Liegt der Wert von OD 260 nm/OD 280 nm über 1,5 ist die Verunreinigung mit Proteinen gering. Die Berechnung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte über das Lambert'sche Gesetz.

Zur Überprüfung der RNA Qualität, wird 1 μg RNA mit 5x RNA Probenpuffer gemischt und auf ein 1%iges Agarosegel (5 μl Ethidiumbromid in 100 ml) aufgetragen. Nach dem Lauf von 1 Std bei 100V wird die RNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Dabei sollte die 28s rRNA Bande doppelt so stark wie die 18s rRNA Bande sein. Ist dies nicht der Fall, deutet es auf einen Abbau der RNA hin.

3.4 Isolierung und Reinigung von Proteinen

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden dem Versuch entsprechend zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Werden RNA und Protein aus einer Probe benötigt, erfolgt die Isolierung der Proteine mittels peqGOLD TriFast nach den Angaben des Herstellers. Die Proteine werden anschließend in einem Proteinlösungspuffer aufgenommen und für 2-10 Zyklen sonifiziert (Amplitude 60%; Zyklus 0,5).

Die Extraktion mit dem RIPA Puffer erfolgt bei extrahierten Exosomen oder bei der Untersuchung der alleinigen Proteinexpression (ohne RNA Extraktion). Der RIPA Puffer wird direkt, vor Zugabe zu den Proteinen, mit den Protease Inhibitoren versetzt. Es folgt ein Inkubationsschritt bei 4°C für 30 min mit anschließender Sonifikation (Amplitude 60%; Zyklus 0,5). Die Lösung wird für 10 min bei 12.000 rpm und 2°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.4.1 Proteinbestimmung mit dem DC Protein Assay Kit

Die Proteinbestimmung mittels DC Protein Assay beruht auf dem von Lowry [165] beschriebenen kolorimetrischen Verfahren. Zur Quantifizierung wird eine BSA Standardkurve erstellt und das Protokoll des Herstellers für eine 96-Well Platte befolgt. Die Messung wird am Mikroplattenlesegerät Sunrise bei 650 nm durchgeführt.

3.5 Klonierungstechniken

Für die Klonierung der miR-34a, miR-155 und miR-373 in den pcDNA 3.1 (+) Expressionsvektor werden die miR sense und antisense DNA-Oligonukleotide miteinander ligiert, mit Hilfe des Klenow Fragmentes aufgefüllt und mit dem Restriktionsenzym XhoI geschnitten. Das pcDNA 3.1 (+) Expressionsplasmid wird entsprechend mit XhoI verdaut und die beiden Stücke miteinander ligiert.

Die Herstellung der Reporterplasmide mit den möglichen Bindestellen der miRs in den 3'UTR Sequenzen ihrer Ziel-mRNAs erfolgt durch Hybridisierung der Oligonukleotide mit den 3'UTR Sequenzen. Dabei entstehen bereits Schnittstellen für XbaI

und NheI und das Auffüllen sowie der Verdau sind nicht mehr nötig. Das pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Plasmid wird entsprechend mit XbaI und NheI verdaut und mit einem 3'UTR Insert ligiert.

3.5.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden und Auffüllen der Überhänge

Für die Hybridisierung der Oligonukleotide werden je 50 pmol in 50 µl Nuklease-freiem Wasser mit 5 mM NaCl verdünnt. Die Lösung wird für 1 min im 70°C warmen Wasserbad inkubiert und dort über Nacht langsam abgekühlt. Die Reaktion wird mit einem MetaPhor Agarosegel überprüft und die Konzentration am NanoDrop ND-1000 gemessen.

Folgender Reaktionsansatz für das Auffüllen der Überhänge wurde gewählt:

0,1-4 µg DNA
2 µl Reaktionspuffer (10x)
0,5 µl dNTP Mix (2 mM)
0,1-0,5 µl Klenow Fragment
ad 20 µl Nuklease-freies Wasser

Der Reaktionsansatz wird bei 30°C für 15 min inkubiert und die Reatktion bei 75°C für 10 min abgestoppt.

Die aufgefüllten DNA-Stücke werden mit dem DNA Clean & Concentrator™ Kit nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

3.5.2 Restriktionsverdau

Restriktionsansatz der synthetisch hergestellten miR-Inserts:

15 µl Fragment
0,5 µl XhoI (20.000 U/ml)
2 µl Puffer 4 (10x)
2 µl BSA (10%)
ad 20 µl Nuklease-freies Wasser

Restriktionsansatz des pcDNA 3.1 (+) Expressionsplasmids:

- 1 μ l Vektor (1 μ g/ μ l)
- 1 μ l XhoI (20.000 U/ml)
- 2 μ l Puffer 4 (10x)
- 2 μ l BSA (10%)
- ad 20 μ l Nuklease-freies Wasser

Restriktionsansatz des pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Plasmids:

- 1 μ l Vektor (1 μ g/ μ l)
- 2 μ l NheI (10.000 U/ml)
- 1 μ l XbaI (20.000 U/ml)
- 2 μ l Puffer 2 (10x)
- 2 μ l BSA (10%)
- ad 20 μ l Nuklease-freies Wasser

Restriktionsansatz des TOPO® TA Plasmids:

- 1 μ l Vektor (1 μ g/ μ l)
- 1 μ l EcoRI (20.000 U/ml)
- 2 μ l EcoRI Puffer (10x)
- 2 μ l BSA (10%)
- ad 20 μ l Nuklease-freies Wasser

Die Reaktionsansätze werden bei 37°C für 1 Std inkubiert. Für das TOPO® TA Plasmid wird die Inkubation auf 2 Std erhöht.

Die Aufreinigung der miR-Inserts erfolgt mittels DNA Clean & Concentrator™ Kit nach Herstellerangaben.

Die Vektoren werden nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung (1% Agarose in 1x TAE) mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

3.5.3 Ligation

Die Ligation wird für die Verknüpfung von linearisierter Plasmid-DNA mit den hergestellten Inserts genutzt. Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden der DNA, so dass rekombinante DNA-Moleküle entstehen. Für die Ligation ist nicht das Gewicht relevant, sondern die Molarität des Inserts und des Vektors ausschlaggebend. Das Insert sollte im 5-fachen Überschuss zum Vektor vorliegen. Auf Grund der geringen Konzentration des Inserts wird hierfür eine Menge von 5 ng festgelegt.

Reaktionsansatz:

10 ng Fragment
1:5 Plasmid:Insert
1 µl T4-DNA Ligase (5 U/µl)
2 µl Ligase Puffer (10x)
ad 20 µl Nuklease-freies Wasser

Die Reaktion wird bei 16°C über Nacht inkubiert. Bei jeder Ligation dienen ein Ansatz mit Insert und ohne Plasmid und umgekehrt als Kontrolle.

Der Ligationsansatz wird für die Transformation von Bakterien verwendet.

3.5.4 Hitzetransformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation werden die kompetenten DH5α Zellen auf Eis aufgetaut. 5 µl Ligationsansatz wird zu den 30 µl kompetenten Bakterien gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 30 sec. Danach werden die Zellen für weitere 2-3 min auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 µl S.O.C-Medium werden die Bakterien für 1 Std bei 37°C und 160 rpm inkubiert. Die transformierten Bakterien werden anschließend auf LB-Ampicillin Platten (mit 50 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.5.5 TOPO[®] TA Klonierung

Um die Bisulfit behandelte DNA leichter sequenzieren zu können, wird 1 µl PCR-Produkt des MAGE-A1 Promotors mit dem TOPO[®] TA Cloning[®] Kit, nach den Herstellerangaben, kloniert und 50 µl DH5α Bakterien damit transformiert. Das PCR-Produkt kann direkt verwendet werden, da durch die Taq DNA-Polymerase am 3'-Ende Adenosin-Überhänge synthetisiert werden, die zu den Thymin-Überhängen des Plasmids passen. Die LB-Ampicillin Platten (50 µg/ml) werden für die Blau/Weiß-Selektion mit 200 µl S.O.C.-Medium, 20 µl IPTG (100 mM in H₂O) und 20 µl X-Gal (50 mg/ml in DMSO) beschichtet. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C werden weiße Kolonien, die das klonierte TOPO[®]-Plasmid enthalten für die Übernachtskultur gepickt.

3.6 Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

3.6.1 Reverse Transkription

Reverse Transkription der mRNA In der Reversen Transkription wird die extrahierte RNA in cDNA umgeschrieben. 200 ng mRNA werden in einem 20 µl-Ansatz, nach den Herstellerangaben des First Strand cDNA Synthesis Kits, in cDNA umgeschrieben. Nur RNA mit einem Poly-A Schwanz wird umgewandelt, da die als Primer genutzen Oligo dTs an Poly-A Schwänze binden.

Reverse Transkription der miRs

Zur Umwandlung der miRs werden die bei den TaqMan[®] microRNA Assays mitgelieferten Stem-loop RT Primer zusammen mit dem TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit genutzt. Durch einen eigenen RT Ansatz für jede miR wird die Sensitivität und Spezifität erhöht. Die Taqman miR-Assays werden so entworfen, dass sie in der Lage sind Vorläufer-miRs von reifen miRs zu unterscheiden.

Folgender Reaktionsansatz wurde gewählt.

- 0,1 µl dNTPs (100 mM)
- 0,66 µl MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)
- 1,0 µl Reverse Transcription Buffer (10x)
- 40 µl 10% SDS
- 0,13 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl)
- 2,77 µl Nuklease-freies Wasser
- 2,0 µl Primer
- 4,0 µl RNA

Die Reaktion im Thermocycler läuft gemäß den Herstellerangaben ab.

3.6.2 Preamplifikation

Die Expression von miR-373 und miR-372 ist vor allem in gesunden Frauen zu gering, um mittels *Real-Time* PCR nachgewiesen zu werden. Daher wird die cDNA aus den Serumproben dieser beiden miRs vor der *Real-Time* PCR preamplifiziert. Um eine akkurate Normalisierung zu gewährleisten wird zusätzlich eine Preamplifikation der cDNA der endogenen Kontrollen miR-16 und miR-484 durchgeführt.

Reaktionsansatz:

- 5 µl Taq PCR Master Mix
- 0,5 µl TaqMan® microRNA Assays (20x *Real-Time* Primer)
- 2,5 µl Nuklease-freies Wasser
- 2 µl miR-cDNA

PCR-Programm:

- | | | | |
|----------------|------|--------|-------|
| Denaturierung: | 95°C | 5 min | |
| Denaturierung: | 95°C | 20 sec | } 15x |
| Annealing: | 60°C | 20 sec | |
| Elongation: | 72°C | 20 sec | |
| Elongation: | 72°C | 5 min | |

3.6.3 PCR

Gradienten-PCR

Die berechneten Annealing Temperaturen weichen häufig von den optimalen Temperaturen ab. Um die beste Temperatur zu ermitteln, d.h. keine unspezifischen Banden aber ein starkes, spezifisches Signal, wird eine Gradienten-PCR durchgeführt. Reaktionsansatz und Programm entsprechen der eigentlichen PCR, mit dem Unterschied, dass ausgehend von der berechneten Annealing Temperatur ein Gradient von 4°C nach oben und unten gewählt wird. Die PCR-Produkte werden mittels Agarose Gelelektrophorese ausgewertet.

PCR mit Methylierungs-spezifischen Primern

Die PCR nach einer Bisulfit Behandlung wird mit Methylierungs-spezifischen Primer der MAGE-A Promotoren durchgeführt. Die Primer für MAGE-A1, -A2, -A3 und -A12 wurden getestet. Auf Grund der geringen Menge an DNA nach dem durchflusszytometrischen Sortieren, wird im weiteren Verlauf ausschließlich der Promotorbereich von MAGE-A1 untersucht.

Reaktionsansatz:

- 10 µl Taq PCR Master Mix
- 1 µl Sense-Primer (10 µM)
- 1 µl Antisense-Primer (10 µM)
- 2 µl DNA
- 6 µl Nuklease-freies Wasser

PCR-Programm:

Denaturierung:	94°C	5 min	} 45x
Denaturierung:	94°C	30 sec	
Annealing:	53°C	1 min	
Elongation:	72°C	1 min	
Elongation:	72°C	15 min	

Die PCR wird mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Das PCR-Produkt wird direkt für die TOPO® TA Klonierung eingesetzt.

LOH-PCR

Für die Mikrosatelliten-Analysen mit der fraktionierten DNA aus dem Plasma der Mammakarzinompatientinnen wird ein mit FAM- oder HEX-fluoreszenzmarkierter Sense-Primer in der PCR verwendet.

Reaktionsansatz:

- 1 µl GeneAmp® PCR Puffer (10x)
- 0,5 µl TMAC (2 mM)
- 1 µl MgCl₂
- 1 µl dNTPs (2 mM)
- 0,1 µl Sense-Primer (10 µM)
- 0,1 µl Antisense-Primer (10 µM)
- 0,1 µl AmpliTaq Gold® DNA Polymerase
- 10-100 ng DNA
- ad 10 µl Nuklease-freies Wasser

PCR-Programm:

- Denaturierung: 95°C 5 min
 - Denaturierung: 95°C 30 sec
 - Annealing: X°C 30 sec
 - Elongation: 72°C 30 sec
 - Elongation: 72°C 5 min
- } 40x

Die Annealing Temperatur beträgt für TIG: 58°C, PTEN: 56°C, CD44: 60°C, GLIPR: 57°C, Cyclin D2: 62°C; RB1 - 56°C; E-Cadherin - 52°C; BRCA1 - 54°C.

Um die Proben am Genetic Analyzer 3130 Hitachi mit dem Programm Gene Mapper 4.0 analysieren zu können, werden die PCR-Produkte aus Leukozyten-DNA 1:10 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und die PCR Produkte aus Plasma-DNA unverdünnt verwendet. 0,5 µl der PCR-Produkte der aus Plasma gewonnenen DNA und der verdünnten Leukozyten PCR-Lösungen werden mit 20 µl Hi-Di™ Formamide und 0,1 µl GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard versetzt und bei 95°C für 2 min denaturiert.

3.6.4 Quantitative Real-Time PCR

SYBR Green

Als *Real-Time* PCR oder auch quantitative-PCR wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem die Menge der entstandenen Produkte anhand von Fluoreszenzlicht in Echtzeit gemessen wird. Eine Möglichkeit zur Generierung produktabhängiger Fluoreszenz bieten doppelsträngige DNA (dsDNA) bindende Fluoreszenzfarbstoffe. Der Cyaninfarbstoff SYBR Green bindet weitgehend sequenzunspezifisch in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Das gebundene SYBR Green fluoresziert nach Anregung etwa 1000x stärker als der freie Farbstoff. SYBR Green lässt sich in Gegenwart von dsDNA mit Blaulicht (480 nm) anregen und zeigt ein Emissionsspektrum mit einem Maximum bei 520 nm. Da es sich um eine produktabhängige Fluoreszenz handelt und somit auch unspezifische Produkte zu einem Signal führen, wird eine Dissoziationskurve benötigt. Sie gibt die Temperatur abhängig von der Größe des Stückes, sowie des GC-Gehalts der Sequenz an, bei der das PCR Produkt dissoziiert.

Reaktionsansatz:

5 µl	Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)
0,5 µl	Sense-Primer (10 µM)
0,5 µl	Antisense-Primer (10 µM)
3 µl	Nuklease-freies Wasser
1 µl	cDNA

PCR-Programm:

Denaturierung:	95°C	15 min	
Denaturierung:	95°C	5 sec	} 40x
Annealing:	X°C	30 sec	
Elongation:	72°C	30 sec	
Denaturierung:	95°C	15 sec	} Dissoziationskurve
Annealing:	60°C	15 sec	
	ansteigende Temperatur	20 min	
Denaturierung:	95°C	15 sec	

Die folgenden Annealing Temperaturen wurden für die Primer verwendet: Bax: 60°C, BRCA1: 58°C, CD44: 60°C, E-Cadherin: 60°C, ESR1: 60°C, ETS1: 56°C, GAPDH: 60°C, MAGE D2: 60°C, MBD2: 60°C, PTEN: 60°C, SP1: 60°C.

Die Analysen erfolgen im Realplex Mastercycler epgradient S. Jede Probe wird als Triplikat pipettiert, um falsche Ergebnisse auszuschließen. Im Realplex Programm kann der Verlauf der Amplifikation verfolgt werden. Die Ordinate wird logarithmisch dargestellt und ein geeigneter Schwellenwert im Bereich der exponentiellen Steigung wird ausgewählt. Die Daten werden in das Programm Microsoft Excel exportiert und dort weiterverarbeitet. Für die Erstellung der Graphen und Statistik wird das Statistik-Programm SPSS verwendet.

Taqman Sonde

Eine anderes Verfahren der *Real-Time* PCR ist die Nutzung spezifischer Taqman® Sonden. Eine Sonde besteht aus einem FAMTM Reporterfarbstoff, einer Bindestelle für die kleine Furche der DNA und einem nichtfluoreszierenden Quencher. Die Sonde bindet an ihre komplementäre Sequenz, aber durch den Förster-Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Erst durch die DNA-Polymerase wird der Reporter vom Quencher gespalten und kann ein Fluoreszenzsignal erzeugen. Auf Grund der exakten Komplementarität der Sonde und der Amplifikation der Sequenz, ohne die kein Signal erzeugt wird, ist nur die Detektion einer spezifischen Amplifikation möglich. Die Taqman Sonden werden auf Grund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität für die miR-Analysen eingesetzt.

Reaktionsansatz:

5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)
0,5 µl TaqMan® microRNA Assays (20x *Real-Time* Primer)
3,8 3µl Nuklease-freies Wasser
1 µl cDNA

PCR-Programm:

Denaturierung:	95°C	10 min	} 40x
Denaturierung:	95°C	15 sec	
Annealing und Elongation:	60°C	60 sec	

Die Analysen der Proben des MARIE Kollektivs erfolgen im Realplex Mastercycler epgradient S, die des Kollektivs von der Gynäkologie des UKE im 7500 Fast Real-Time PCR System. Der Realplex Mastercycler epgradient S verwendet das Programm Reaplex, das 7500 Fast Real-Time PCR System die 7500 Fast System SDS Software. Die Ordinate wird logarithmisch dargestellt und ein geeigneter Schwellenwert im Bereich der exponentiellen Steigung ausgewählt. Die Daten werden zu Microsoft Excel exportiert und dort weiterverarbeitet. Für die Erstellung aller Graphen wird SPSS verwendet.

Auswertung der Real-Time Ergebnisse

Der Abgleich der mRNA Ergebnisse erfolgt mit GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase). Das Enzym katalysiert einen Schritt in der Glykolyse und erfüllt somit in der Zelle die Aufgabe eines Haushaltsgens. Um die miRs abzugleichen wird in der MARIE-Studie miR-16 und in der Studie von der Gynäkologie des UKE miR-16 und miR-484 verwendet. Beide miRs sind stabil und gleichmäßig im Serum in gesunden Frauen und Brustkrebspatientinnen exprimiert. Die Ergebnisse werden mit diesen endogenen Referenzgenen deshalb abgeglichen, um Unterschiede in der Konzentration auszugleichen. Bei den Analysen des Serums können diese Unterschiede durch eine unterschiedliche Qualität des Serums, Unterschiede in der Aufarbeitung der Proben oder Pipettierungenauigkeit bedingt sein. Bei den Analysen der Zellkulturproben können Fehler in der RNA-Vermessung und Pipettierungenauigkeit der Grund für unterschiedliche Mengen der endogenen Referenz sein. Für das Kollektiv aus der Gynäkologie des UKE wurde zusätzlich cel-39 als „spike-in“ Kontrolle genutzt. Dabei handelt es sich um eine miR, die ausschließlich im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* vorkommt und sich dazu eignet, Unterschiede bei der RNA Aufreinigung und der Reversen Transkription aufzuzeigen. Es handelt sich bei allen Analysen um eine relative und keine absolute Quantifizierung, da keine Eichkurve mit bekannten RNA Mengen genutzt wird, sondern die Proben relativ zueinander betrachtet werden.

Die folgende Formel wird zur Berechnung der relativen Quantifizierung der mRNA bzw. miR Konzentrationen genutzt:

$$CT_{Ziel - RNA} - CT_{Referenzgen} = \Delta CT$$
$$2^{-\Delta CT} \cdot 1000$$

3.6.5 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Prinzip des Didesoxy-Kettenabbruchverfahrens nach Sanger [243]. Pro Konstrukt werden 2 getrennte Ansätze, einen für den Sense- und einen für den Antisense-Primer pipettiert.

Reaktionsansatz:

5 µl BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix
1 µl Sense- oder Antisense-Primer (10 nM)
3 µl BigDye Puffer (5x)
250 ng Plasmid
ad 20 µl Nuklease-freies Wasser

PCR-Programm:

Denaturierung:	95°C	30 sec	} 25x
Annealing:	50°C	15 sec	
Elongation:	60°C	4 min	

Fällung des Sequenzieransatzes

Zu dem Reaktionsansatz werden 16µl Nuklease-freies Wasser und 64 µl EtOH (100%) zugegeben, gefolgt von einer Inkubation von 15 min bei RT und einer Zentrifugation mit 13.000 rpm für 20-30 min bei 4°C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit 250 µl EtOH (70%) gewaschen und mit 13.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das trockene Pellet wird in 30 µl Hi-Di™ Formamide resuspendiert, für 5 min bei 95°C denaturiert und am Genetic Analyzer 3130 Hitachi mit dem Programm Sequencing Analysis 5.2 sequenziert.

3.7 Gelelektrophorese

3.7.1 Agarosegele

Die Agarosegele werden mit 1x TAE angesetzt und mit 5 µl Ethidiumbromid auf 100ml Gel versetzt. Die Spannung und Dauer des Laufes werden der Größe des Gels, dem Agarosegehalt und den aufzutrennenden Nukleinsäuren angepasst. Gele zur Überprüfung der qPCR sind immer 2%ig und die RNA Gele 1%ig. 1x TAE wird als Laufpuffer verwendet. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert unter UV-Licht (365 nm). Dadurch können die Oligonukleotide an einem Geldokumentationsgerät sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.7.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli [144] dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. SDS lagert sich an die Proteine an, denaturiert diese und sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung. Die Gele sind diskontinuierlich, da ein aufliegendes Sammelgel und darunterliegendes Trenngel verwendet werden.

Zusammensetzung des Sammelgels:

670 µl ProtoGel® 30%
500 µl 1 M Tris pH 6,8
2,7 ml H₂O
40 µl 10% SDS
5 µl TEMED
40 µl APS

Zusammensetzung des Trenngels (10%):

5 ml ProtoGel® 30%
3,8 ml 1 M Tris pH 8,8
5,9 ml H₂O
150 µl 10% SDS
6 µl TEMED
150 µl APS

Abhängig von dem Versuch werden 20-40 µg Protein mit 4x SDS Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in der Proteinelektrophoresekammer XCell SureLock mit 1x Laemmli Laufpuffer. Für die Passage der Proteine im Sammelgel wird eine Spannung von 100 V und anschließend im Trenngel von 120 V angelegt. Die Laufzeit wird entsprechend der zu untersuchenden Proteingröße angepasst.

3.8 Western Blot

3.8.1 Transfer eines SDS-Polyacrylamidgels auf eine Membran

Als Western Blot wird der Transfer von Proteinen von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran bezeichnet. Auf der Membran werden die Proteine gebunden und immobilisiert, um zur weiteren Immundetektion genutzt zu werden. Zum Aktivieren der Membran wird sie für 1 min in Methanol inkubiert, 3 min in Wasser gewaschen und 5 min in Transferpuffer equilibriert. Nach Anlegen der Spannung von 30 V und Einstellen der Stromstärke auf 120 mA werden die durch SDS negativ geladenen Proteine in dem XCell II™ Blot Modul, nach Herstellerangaben, halbnaß in 1x Transferpuffer auf eine Immobilon-P Membran (PVDF) transferiert.

3.8.2 Immundetektion

Zunächst wird die Membran zum Blockieren unspezifischer Bindestellen für 1 Std bei RT in der entsprechenden Blockierungslösung (5% Milch oder 5% BSA in 1x TBST) inkubiert. Es folgt die Inkubation mit dem Primärantikörper (in Blockierungslösung verdünnt) über Nacht bei 4°C. Unspezifisch gebundener Primärantikörper wird in 3 15-minütigen Waschsritten mit 1x TBST entfernt. Die Membran wird für 1 Std mit dem 1:1500 verdünnten Sekundärantikörper (in 5% Milch in 1x TBST) inkubiert. Nach 3 15-minütigen Waschsritten mit 1x TBST wird die Membran für 4 min mit einer Mischung aus der ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 überzogen. Die Inkubation mit dem Meerettich-Peroxidase markierten Sekundärantikörper bewirkt die Oxidation des Luminol Reagenz in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Die entstehenden Chemilumineszenzsignale werden durch die Exposition eines Röntgenfilm und Entwicklung des Films im Röntgenfilmentwickler Curix60 sichtbar gemacht.

Gewählte Parameter der Primärantikörper:

Primärantikörper	Verdünnung	Laufhöhe der Bande
Anti-CD44	1:1000 (5% Milch)	80 kDa
Anti-CD63	1:500 (5% Milch)	25 kDa bei normalen Zellen (45 kDa bei Exosomen)
Anti-c-Erb/c-Neu	1:500 (5% Milch)	200 kDa
Anti-E-Cadherin	1:2x10 ⁶ (5% BSA)	120 kDa
Anti-ER	1:500 (5% Milch)	67 kDa
Anti-HSC70	1:50.000 (5% Milch)	70 kDa
Anti-MAGE-D2	1:1.000 (5% BSA)	65 kDa
Anti-MBD2	1:2.000 (5% BSA)	43 kDa
Anti-PTEN	1:1.000 (5% BSA)	50 kDa
Anti-SP1	1:500 (5% BSA)	105 kDa

3.8.3 Strippen

Um eine Membran mehrmals zu verwenden, werden die bereits gebundenen Proteine durch Denaturierung wieder von der Membran gelöst. Dieser Vorgang wird als Strippen bezeichnet. Zunächst wird die Membran für 15 min mit 1x TBST gewaschen und anschließend für 1 Std in Stripppuffer inkubiert. Es folgen mehrere Waschschrirte mit Leitungswasser und TBST, bis der Schwefelgeruch nicht mehr wahrnehmbar ist. Die Membran kann nun wieder blockiert und für weitere Antikörper verwendet werden.

3.9 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können Zellen nach ihrer Form und der Markierung mit einem fluoreszenmarkierten Antikörper unterschieden werden. Die Zellen werden vereinzelt und fließen anschließend durch einen Laserstrahl, der je nach Einstellung die Zelle mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge beleuchtet. Das emittierte bzw. gestreute Licht wird dann von einem Detektor erfasst und in der FACSDivaTM Software ausgegeben.

3.9.1 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose

Die Messung der durch Camptothecin induzierten Apoptose wird mit Annexin-V und Propidiumiodid (PI) durchgeführt. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin, welches sich in gesunden, lebenden Zellen auf der zytosolischen Seite der Membran befindet. Mit Beginn der Apoptose sind die Phospholipide auch auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran nachweisbar. Propidiumiodid bindet an die DNA, sobald die Zellmembran abgebaut und durchlässig wird. Durch diese Kombination sind früh-apoptotische (Annexin-V-positiv, PI-negativ) von nekrotischen bzw. spät-apoptotischen (Annexin-V-positiv, PI-positiv) und lebenden (Annexin-V-negativ, PI-negativ) differenzierbar.

Um die bereits abgestorbenen Zellen nicht zu verlieren wird das Medium abgenommen und aufbewahrt. Die Zellen werden trypsinisiert, zu dem abgenommenen Medium gegeben und bei 1.200 rpm für 3 min zentrifugiert. Es folgt ein Waschschrift mit 1x PBS. Die Zellen werden mit 3 µl Annexin-V-FITC und 5 µl PI (50 µg/ml) in 100 µl 1x Annexin-V-FITC Bindepuffer für 15 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Für die Kalibrierung des FACS-Canto II werden bei jedem Versuch Zellen ohne PI und Annexin-V-FITC, sowie mit nur einem der beiden Farbstoffe inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 400 µl 1x Annexin-FITC Bindepuffer resuspendiert und am FACS-Canto II gemessen. Die Zellen werden mit 488 nm angeregt und durch Annexin-V-FITC mit einem 585/42 Filter (*Longpass* Spiegel mit 556 nm) sowie PI mit einem 660/20 Filter (*Longpass* Spiegel mit 610 nm) detektiert. Die Auswertung erfolgt mit der FACSDiva™ Software.

3.9.2 Durchflusszytometrische Sortierung

Bei einer transienten Transfektion liegt die Effizienz meistens bei maximal 15%. Daher sollten die mit dem BORIS (*Brother of Regulator of Imprinted Sites*) Expressionsplasmid transfizierten MCF-7 Zellen nach ihrem Gehalt an BORIS-Protein sortiert werden. Bei den folgenden Experimenten kann so sichergestellt werden, ausschließlich BORIS-positive bzw. -negative Zellen zu analysieren.

Die Zellen werden mit dem BORIS Färbepuffer gewaschen und mit 300 rpm, für 5 min bei RT zentrifugiert. Es folgt eine Inkubation mit FcR Blocking Reagenz für 15 min bei 4°C und ein weiterer Waschschrift mit Färbepuffer. Die Zellen werden im

Dunkeln für 20 min bei RT mit IC Fixation Puffer fixiert und zum Permeabilisieren zweimal mit 1x Permeabilisierungspuffer gewaschen. 4 µg anti-BORIS Antikörper, bzw. 4 µg Isotypen-Kontrolle werden für 30 min, im Dunkeln, bei 4°C zu den Zellen gegeben. Als Kontrollansätze dienen hier Zellen die komplett unmarkiert sind, sowie die Isotypen-Kontrolle, an die der Sekundärantikörper bindet, aber die nicht an die Zellen bindet und somit als negative Kontrolle genutzt werden kann. Nach einem Waschschrift mit 1x Permeabilisierungspuffer werden die Zellen mit 4 µg FITC Goat Anti-Mouse IgG/IgM oder 4 µg Alexa Fluor® 488 Goat für 30 min, im Dunkeln, bei 4°C inkubiert. Beide Sekundärantikörper wurden getestet, wobei etwas bessere Ergebnisse mit Alexa Fluor® 488 Goat erzielt wurden. Es folgen je ein Waschschrift mit 1x Permeabilisierungspuffer und Färbepuffer. Die Zellen werden im Färbepuffer resuspendiert, durch einen 30 µm Filter filtriert und bis zur Analyse auf Eis gehalten. Die Sortierung findet am FACS Aria III statt und wird von den Mitarbeitern der FACS Core Unit am UKE durchgeführt. Aus den sortierten Zellen wird die DNA isoliert und nach Bisulfit-Behandlung der DNA der MAGE-A1 Promotor untersucht.

3.10 Natriumbisulfit-Behandlung der DNA

Um das Methylierungsmusters des MAGE-A1 Promotors zu analysieren, wird die DNA aus mit dem BORIS Expressionsplasmid transfizierten, gesorteten, sowie nicht gesorteten und nicht transfizierten MCF-7 Zellen mit Natriumbisulfit behandelt. Dadurch werden nicht methylierte Cytosine zunächst in Uracil und in Folge dessen bei einer anschließenden PCR zu Thymin umgewandelt. Methylierte Cytosine sind vor dieser Desaminierung geschützt, das Cytosin bleibt erhalten.

200 ng der DNA wird mit dem EpiTect Bisulfite Kit, nach Herstellerangaben, umgewandelt und aufgereinigt. Auf Grund der geringen DNA-Konzentration wird Carrier RNA bei der Aufreinigung genutzt. Die durch Bisulfit umgewandelte DNA wird für PCR-Analysen mit Methylierungs-spezifischen Primer verwendet.

3.11 Präzipitation der Exosomen

Exosomen, 40-150 nm große Membranvesikel, werden gewöhnlich über mehrere Zentrifugationsschritte aufgearbeitet. Eine schnellere und effizientere Methode bietet die Extraktion der Exosomen aus Serum mit der ExoQuick-TC™ Lösung. Zunächst wird das Serum mit 3.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert, um mögliche Zellfragmente zu entfernen. Zu 400 µl Serum werden 108 µl ExoQuick-TC™ gegeben, gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Pelletierung erfolgt durch Zentrifugation mit 1.500 rpm für 30 min bei 4°C. Der Überstand wird abgenommen und als negative Kontrolle für den Western Blot verwendet. Die Exosomen werden nochmals mit 1.500 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert und das Pellet, für die RNA Isolation mit Hilfe des *miRVana*™ PARIS™ Kits, mit 40 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt. Die Proteinisolierung erfolgt mit 400 µl RIPA Puffer.

3.12 Luciferase-Assay

Die Firefly Luciferase ist ein Monomer-Protein aus dem Leuchtkäfer, das die Oxidation von Luciferin mit Hilfe von ATP-Mg²⁺ katalysiert. Diese Oxidationsreaktion verursacht eine Lumineszenz. Da die Luciferase nicht auf natürliche Weise in humanen Zellen exprimiert wird, kann auf Grund der Intensität der Lumineszenz die Promotoraktivität bestimmt werden. Jedoch können Pipettierungenauigkeiten zu einer abweichenden Dichte der Zellen führen und die Transfektionseffizienz kann unterschiedlich sein. Daher wird die Luciferaseaktivität von Renilla (*Renilla reniformis*) im gleichen Ansatz detektiert und als interner Standard mit der Firefly Luciferase Aktivität abgeglichen.

Der Assay wird genutzt, um potenzielle Zielgene der miRs zu ermitteln. Bei erfolgreicher Bindung der miR an die, in den pmirGLODual-Luciferase miRNA Target Vektor inklonierte, 3'UTR wird die Expression des Firefly Luciferase Proteins inhibiert. Die Renilla Expression wird nicht beeinflusst.

48 Std nach der Transfektion werden die Zellen mit dem Passive Lysis Buffer geerntet. Nach einer Zentrifugation mit 13.000 rpm für 30 sec bei 4°C werden 15 µl des Überstandes mit 50 µl des Luciferase-Reagenz (LAR II) versetzt und im Luminometer GloMax® 20/20 gemessen. Anschließend werden 50 µl Stop&Glow-Reagenz zugegeben, um die Aktivität der Renilla-Luciferase zu messen.

3.13 Statistische Auswertung

Alle statistischen Auswertungen erfolgten mit der SPSS Software, Version 18.0. Bei den LOH-Analysen wurde die Chi-Quadrat-Verteilung oder der Exakte Fisher-Test verwendet um Assoziationen zwischen der LOH-Häufigkeit und den klinischen und pathologischen Risikofaktoren zu ermitteln. Nichtparametrischen Vergleiche mit zwei unabhängigen Variablen wurden mit dem Mann-Whitney *U* Test berechnet. Assoziationen zwischen zwei abhängigen Variablen, wie für den Vergleich der einzelnen Marker in den beiden Fraktionen, wurden mit dem Wilcoxon Test berechnet.

Die gesamte RNA-Menge, sowie die mittels *Real-Time* PCR berechneten relativen miR-Konzentrationen sind in den Studien nicht normal verteilt. Daher wird zur statistischen Berechnung der Mann-Whitney *U* Test angewandt. Die diagnostische Teststärke wird mittels ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Kurven analysiert. Die Kurve entsteht indem die echt-positiven aus allen positiven (Richtig-Positiv-Rate) gegen die falsch-positiven aus allen negativen Fällen (Falsch-Positiv-Rate) mit unterschiedlichen Schwellenwerten aufgetragen werden. Die Richtig-Positiv-Rate ist besser bekannt als Sensitivität und die Falsch-Positiv-Rate hingegen als 1-Spezifität. Die Sensitivität ist im Diagramm die Ordinate und die 1-Spezifität die Abszisse. Bei den ROC-Kurven wird zusätzlich der AUC (*Area under Curve*)-Wert berechnet. Ein P-Wert $< 0,5$ wird als statistisch signifikant anerkannt. Alle p-Werte sind zweiseitig berechnet. Da es sich in den Studien um eine explorative Datenanalyse handelt wurde keine Berichtigung für multiple Prüfungen durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Differenzielle Serumkonzentrationen der miR-17, miR-34a, miR-155 und miR-373 während der Entwicklung und Progression des Mammakarzinoms

Da das Mammakarzinom die Hauptursache für den krebsbedingten Tod von Frauen weltweit darstellt, ist die Suche nach neuen Biomarkern äußerst wichtig. Besonders interessant sind Biomarker, die als „flüssige Biopsie“ zur Verringerung benötigter Gewebebiopsien eingesetzt werden können. Durch die regelmäßige Entnahme von Blutproben könnte so der Verlauf der Krankheit, bzw. der Behandlung genau verfolgt werden. Die Wahl der Therapie wird durch die pathologische und molekulare Heterogenität des Mammakarzinoms beeinflusst. Für eine optimale, angepasste Behandlung ist daher die Suche nach molekularen Markern zur genauen Klassifizierung des Tumors essenziell. Auf Grund der aktuellen Erkenntnisse zur Stabilität der mikroRNAs (miRs) im Blut und ihrer vielfältigen Aufgaben in der Karzinogenese wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sechs im Mammakarzinom relevante miRs ausgewählt und im postoperativem Serum von Mammakarzinompatientinnen quantifiziert.

4.1.1 Quantifizierung der zirkulierenden RNA in Mammakarzinompatientinnen

Zunächst wurde die zirkulierende Gesamt-RNA aus dem Serum von 40 gesunden Frauen, sowie aus dem postoperativen Serum (vor einer Chemotherapie) von 120 Patientinnen mit einem primären (M0) und aus dem Serum von 32 Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom (M1) extrahiert. Die klinischen und pathologischen Patientendaten sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und ihre Korrelation mit den relativen miR-Konzentrationen im postoperativen Serum.

Parameter	Patienten n (%)	miR-10b		miR-17		miR-34a		miR-93		miR-155		miR-373	
		Median 5%	Median 95%										
Mammakarzinompatientinnen													
Gesamt	152												
Alter	65 Jahre (von 50 bis 74 Jahre)												
M0	120 (100)	0,2		120		0,5		88		1,7		0,6	
		0,0	0,7	46	270	0,1	1,1	39	190	0,6	5,1	0,0	2,7
Histologie													
Duktal	90 (75)	0,2		110		0,5		88		1,7		0,7	
		0,0	0,7	40	250	0,1	1,1	37	190	0,6	4,2	0,0	2,9
Lobulär	18 (15)	0,2		110		0,4		77		1,6		0,6	
		0,0	-	52	-	0,1	-	39	-	0,5	-	0,0	-
Andere	12 (10)	0,2		190		0,5		100		2,7		0,4	
		0,0	-	75	-	0,1	-	46	-	1,1	-	0,0	-
Tumorstadium													
pT1	69 (58)	0,2		100		0,5		82		1,6		0,6	
		0,0	0,9	41	260	0,1	1,2	32	160	0,6	4,8	0,6	1,9
pT2-4	51 (42)	0,2		130		0,5		93		1,8		0,6	
		0,0	0,7	44	330	0,1	1,1	41	200	0,6	5,8	0,6	3,2
Lymphknotenmetastasen													
Negativ	89 (75)	0,2		120		0,5		85		1,8		0,7	
		0,1	0,8	42	290	0,1	1,2	37	190	0,6	5,3	0,0	2,1
Positiv	30 (25)	0,2		120		0,3		95		1,5		0,5	
		0,0	0,8	44	330	0,1	1,0	44	200	0,5	4,6	0,0	3,2
Graduierung													
1,2	77 (65)	0,2		100		0,4		82		1,6		0,6	
		0,0	0,7	37	260	0,1	1,0	34	180	0,5	5,5	0,0	1,7
3	42 (35)	0,2		130		0,5		95		2,1		0,5	
		0,0	0,8	64	320	0,1	1,2	43	210	0,8	3,8	0,0	3,3
ER ⁺ /PR ⁺	40 (33)	0,3		100		0,4		75		1,5		0,8	
		0,0	1,0	37	300	0,1	1,0	30	150	0,5	5,5	0,1	1,7
HER2 ⁺	40 (33)	0,2		130		0,5		95		2,1		0,3	
		0,0	0,8	46	330	0,1	1,0	52	210	0,6	5,4	0,0	2,1
Triple negative	40 (33)	0,2		130		0,5		91		1,8		0,9	
		0,1	0,7	41	270	0,1	1,2	38	190	0,5	4,0	0,0	3,4
M1	32 (100)	0,2		84		0,4		75		1,0		0,9	
		0,0	0,7	24	200	0,1	1,3	35	160	0,4	1,9	0,1	3,4

Anmerkung: -, 95er Perzentile konnten nicht berechnet werden

Abkürzungen: PR, Progesteron-Rezeptor; ER, Estrogen-Rezeptor;

HER2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

Die Differenzen der spektrophotometrisch gemessenen RNA-Konzentrationen in den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney *U* Test bestimmt. Die RNA-Konzentrationen waren signifikant höher bei M0 (P=0,0001) und M1 (P=0,002) Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu den gesunden Frauen. Zudem waren die RNA-Werte bei M1

Patientinnen höher als bei den M0 Patientinnen ($P=0,002$, Abb. 4.1A). Diese Ergebnisse weisen auf einen progressiven Anstieg der Serum-RNA von gesunden Frauen über Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom zu Patientinnen mit Metastasen hin.

Die 120 Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom wurden in drei Gruppen mit jeweils 40 Patientinnen mit einem *triple negative* (ER^- , PR^- , $HER2^-$), einem $HER2^+$ und einem ER^+/PR^+ Mammakarzinom eingeteilt. In den Gruppen untereinander waren die RNA-Konzentrationen ähnlich, in allen Gruppen jedoch signifikant höher als bei den gesunden Frauen (*triple negative*, $P=0,0001$; $HER2^+$, $P=0,015$; ER^+/PR^+ , $P=0,001$; Abb. 4.1B).

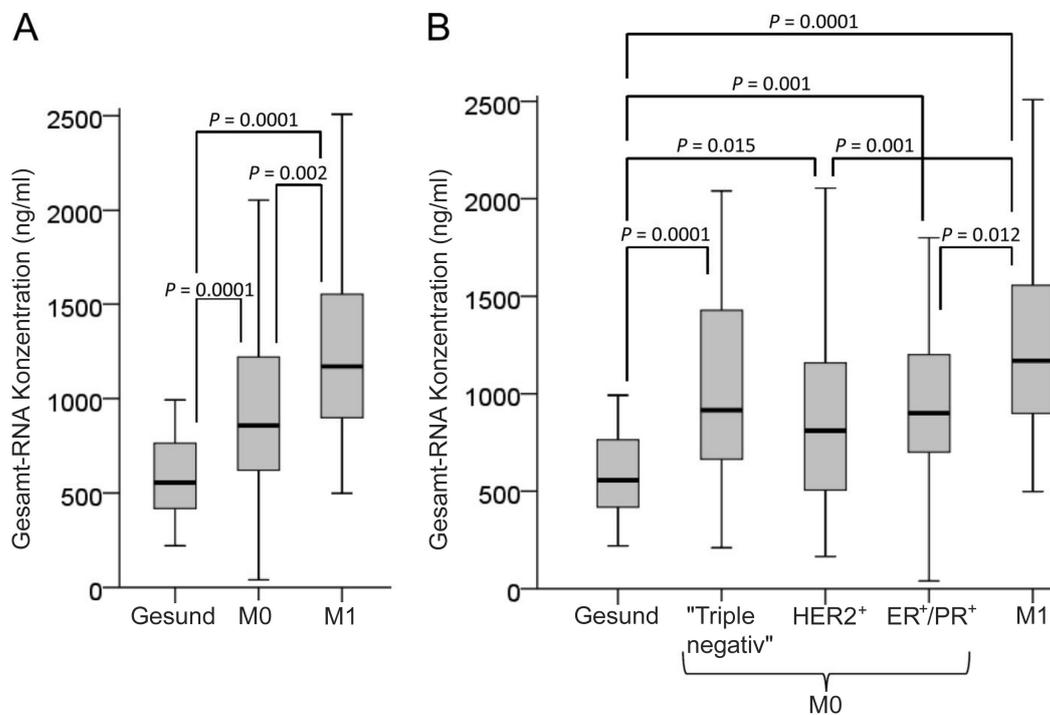


Abbildung 4.1: Quantifizierung der zirkulierenden Gesamt-RNA im Serum von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen. (A) Die dargestellten Boxplots vergleichen die Gesamt-RNA Konzentration im Serum von gesunden Frauen ($n=40$) mit den Konzentrationen der Patientinnen mit einem primären (M0, $n=120$) oder metastasierten (M1, $n=32$) Mammakarzinom. (B) Die Boxplots zeigen die Gesamt-RNA Konzentrationen im Serum von M0 Patientinnen mit *triple negative* ($n=40$), $HER2^+$ ($n=40$) und ER^+/PR^+ ($n=40$) Mammakarzinom. Die angegebenen, signifikanten P-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test bestimmt.

4.1.2 MiR-16 als endogene Kontrolle für das Kollektiv der MARIE-Studie

Um die Daten der *Real-Time* PCR zu normalisieren, muss eine geeignete endogene Kontrolle für die Quantifizierung der zirkulierenden miRs im Serum gefunden werden. MiR-16 wurde nach eingehender Literaturrecherche, auf Grund ihrer Stabilität, ihrem hohen Vorkommen im Serum und ihrer konstanten Expression bei gesunden Frauen und Patientinnen, ausgewählt. In dem Kollektiv der MARIE Studie wurde ein Mittelwert der CT (*Cycle Threshold*)-Werte der miR-16 von 21,62 (Standardabweichung 1,40) bei M0 Patientinnen, 20,99 (Standardabweichung 1,68) bei M1 Patientinnen und 20,44 (Standardabweichung 1,26) bei gesunden Frauen ermittelt.

4.1.3 Quantifizierung der zirkulierenden miRs im Serum von Patientinnen mit primärem und metastatisiertem Mammakarzinom

Die Quantifizierung der relativen Konzentrationen der zirkulierenden miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373 erfolgte mittels CT Bestimmung in einer *Real-Time* PCR und durch Normalisierung mit der endogenen Kontrolle miR-16. Die Normalisierung ist notwendig, um Unterschiede in der Qualität des Serums und bei der Aufarbeitung nicht in die Ergebnisse miteinzubeziehen. Die relativen Transkriptmengen der zirkulierenden miR-34a ($P=0,013$), miR-93 ($P=0,001$) und miR-373 ($P=0,0001$) waren signifikant höher bei M0 Patientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen, allerdings waren die Konzentrationen zwischen M0 und M1 Patientinnen ähnlich (Abb. 4.2A). Von diesen drei miRs wurde nur für miR-373 ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Frauen und M1 Patientinnen gefunden ($P=0,0001$, Abb. 4.2A). Für miR-17 und miR-155 wurden keine Tumor-spezifischen Veränderungen detektiert, da ihre Konzentrationen bei Patientinnen mit einem primärem Mammakarzinom denen der gesunden Frauen ähnlich waren. Allerdings waren beide miRs signifikant bei Patientinnen mit Metastasen herunterreguliert. Bei M1 Patientinnen waren die Transkriptmengen der miR-17 ($P=0,002$) und miR-155 ($P=0,0001$) signifikant niedriger als bei M0 Patientinnen und auch geringer als in gesunden Frauen (miR-17, $P=0,039$; miR-155, $P=0,0001$; Abb. 4.2A). Für miR-10b wurden keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von gesunden Frauen, sowie von M0 und M1 Patientinnen gefunden (Abb. 4.2A).

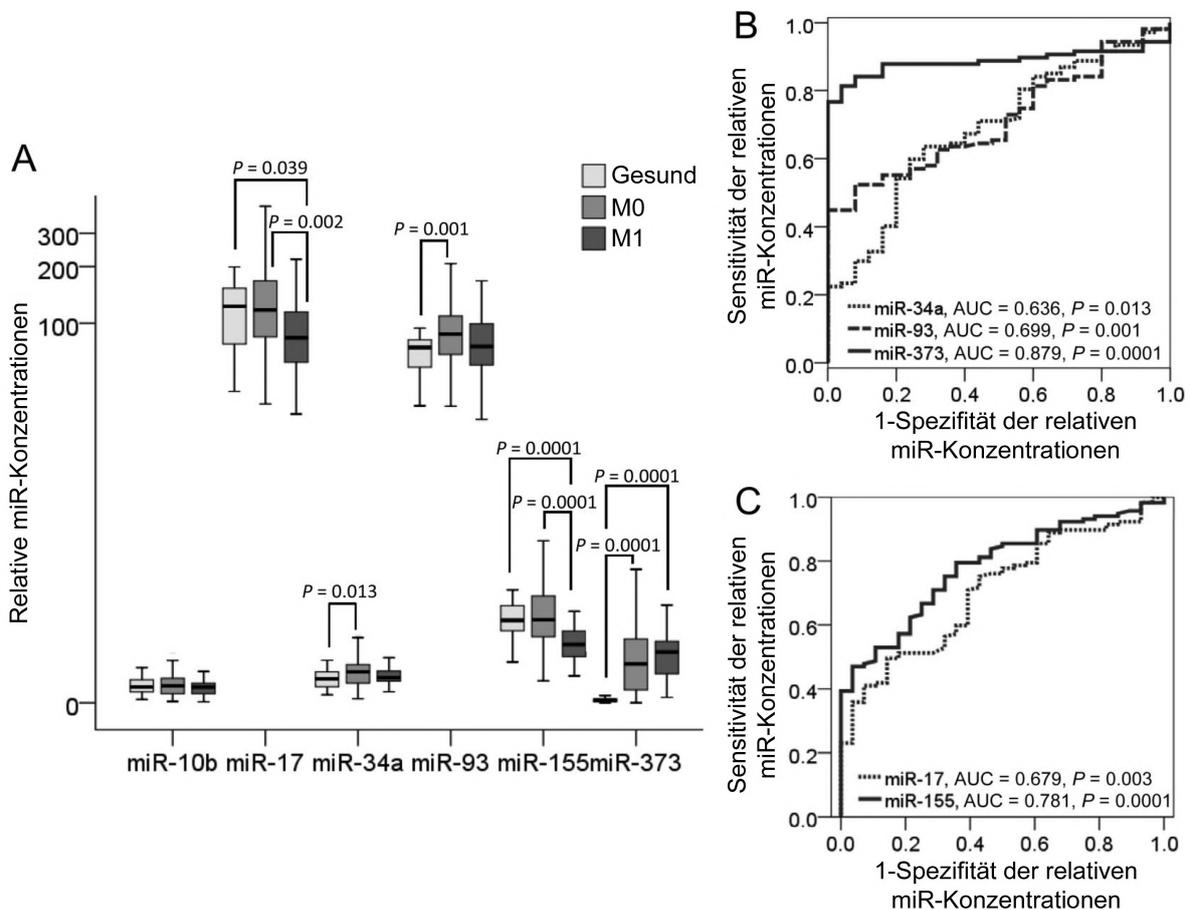


Abbildung 4.2: Quantifizierung der relativen miR-Konzentrationen im Serum von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen. (A) Die dargestellten Boxplots vergleichen die durch *Real-Time* PCR ermittelten relativen miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373 Konzentrationen im Serum von gesunden Frauen ($n=40$) mit denen von Patientinnen mit einem primären (M0, $n=120$) oder metastasierten (M1, $n=32$) Mammakarzinom. Die angegebenen, signifikanten P-Werte wurden mittels Mann-Whitney *U* Test bestimmt. (B) Die ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Kurven zeigen die Sensitivität und Spezifität der miR-34a, miR-93 und miR-373, um gesunde Frauen von M0 Patientinnen zu unterscheiden. Je höher der AUC (*Area under the Curve*)-Wert, desto sensibler und spezifischer ist die miR. (C) Die ROC-Kurve stellt die Sensitivität und Spezifität der miR-17 und miR-155 für die Differenzierung zwischen M0 und M1 Patientinnen dar.

Durch die ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Analysen wird die Sensitivität und Spezifität der miR-Konzentrationen ermittelt, mit der gesunde Frauen von M0 Patientinnen und M1 von M0 Patientinnen unterschieden werden können (Tabelle 4.2).

Die AUC (*Area under the Curve*)-Werte von 0,689 ($P=0,013$) für miR-34a, 0,713 ($P=0,001$) für miR-93 und 0,886 ($P=0,0001$) für miR-373 zeigen insbesondere für miR-373 einen signifikanten Unterschied in den Werten zwischen gesunden Frauen und M0 Patientinnen (Abb. 4.2B). Auch für miR-17 (AUC=0,707, $P=0,003$) und miR-155 (AUC=0,781, $P=0,0001$) belegen die AUC-Werte, dass die Transkriptmengen der beiden miRs signifikant bei M1 im Vergleich zu M0 Patientinnen herunterreguliert sind (Abb. 4.2C).

Tabelle 4.2: Sensitivität und Spezifität (%) der relativen miR-Konzentrationen.

	M0 gegen Gesund		M1 gegen Gesund		M0 gegen M1	
	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität	Sensitivität	Spezifität
miR-10b	21,8	92,1	76,3	35,5	43,7	74,2
miR-17	18,8	100	51,4	80	49,6	85,7
miR-34a	59,8	76	87,1	29,7	53,4	74,2
miR-93	44,9	100	25	100	76,1	43,8
miR-155	70,6	42,7	85,3	70	79,5	64,3
miR-373	76,6	100	96,8	94,1	74,2	43,6

Abkürzungen: M0, Patientinnen mit primärem Mammakarzinom;

M1, Patientinnen mit Metastasen.

4.1.4 Quantifizierung der zirkulierenden miRs bei ER- und PR-positiven

Mammakarzinompatientinnen vor und nach einer Chemotherapie

Um zu ermitteln, ob sich die Serumkonzentrationen der zirkulierenden miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373 durch Chemotherapie verändern, wurden die Konzentrationen bei Patientinnen mit einem ER⁺/PR⁺ Mammakarzinom vor und nach einer Chemotherapie quantifiziert. Dabei handelt es sich um zwei unterschiedliche Patientengruppen, da keine nachfolgenden Proben von den Patientinnen gesammelt wurden. Bei unabhängigen Proben lässt sich der statistische Unterschied mit dem Mann-Whitney *U* Test ermitteln. Die Transkriptmengen von miR-17 ($P=0,02$), miR-34a ($P=0,0001$), miR-93 ($P=0,014$) und miR-155 ($P=0,022$) waren nach der Che-

motherapie signifikant erhöht während die miR-373 Konzentrationen signifikant niedriger waren ($P=0,005$). Die Konzentrationen der miR-10b blieben relativ konstant (Abb. 4.3).

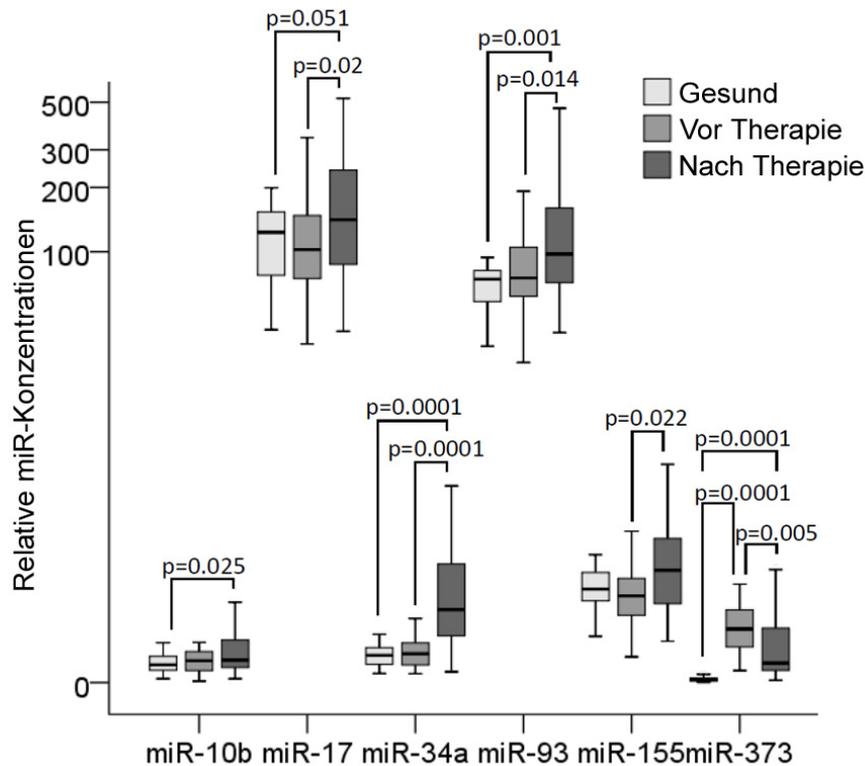


Abbildung 4.3: Quantifizierung der relativen miR-Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit einem ER⁺/PR⁺ Mammakarzinom vor und nach einer Chemotherapie. Die dargestellten Boxplots vergleichen die durch *Real-Time* PCR ermittelten relativen miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373 Konzentration im Serum von gesunden Frauen (n=40) mit denen von Patientinnen mit einem ER⁺/PR⁺ Mammakarzinom vor (n=40) und nach (n=40) einer Chemotherapie. Die angegebenen, signifikanten P-Werte wurden mittels Mann-Whitney *U* Test bestimmt.

4.1.5 Korrelationen der miRs mit den klinischen und pathologischen Risikofaktoren

Um festzustellen, ob die miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373 Serumkonzentrationen mit den klinischen und pathologischen Risikofaktoren der Mammakarzinompatientinnen assoziiert sind, wurde das diagnostische Potential der

miRs mit dem Mann-Whitney U Test ermittelt. In Tabelle 4.1 sind die Mediane, sowie die 5- und 95-Perzentile der miR-Variablen der verschiedenen Patientengruppen dargestellt. Die Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die signifikanten AUC- und P-Werte zwischen den miR-Variablen und den klinischen und pathologischen Parametern der Patientinnen.

In den drei Gruppen der Patientinnen mit einem *triple negative*, einem HER2⁺ und einem ER⁺/PR⁺ Mammakarzinom, sowie bei den Patientinnen mit Metastasen waren die Serumkonzentrationen der miR-373 signifikant höher als bei gesunden Frauen (P=0,0001, Abb. 4.4F). Außerdem wurden signifikant niedriger relative Transkriptwerte bei HER2⁺ Patientinnen als bei Patientinnen mit einem *triple negative* (P=0,005) oder metastasierten Mammakarzinom detektiert (P=0,002, Abb. 4.4F). Die Konzentrationen von miR-34a (Abb. 4.4C) und miR-93 (Abb. 4.4D) waren bei Patientinnen mit einem *triple negative* (miR-34a, P=0,004; miR-93, P=0,001) oder HER2⁺ (miR-34a, P=0,004; miR-93, P=0,0001) Mammakarzinom signifikant höher als bei gesunden Frauen. Zudem wurde miR-34a differenziell zwischen M0 Patientinnen mit *triple negative* und ER⁺/PR⁺ Mammakarzinom (P=0,02, Abb. 4.4C) und miR-93 zwischen HER2⁺ und M1 Patientinnen exprimiert (P=0,019, Abb. 4.4D).

Im Gegensatz dazu waren die Serumkonzentrationen der miR-17 (Abb. 4.4B) und miR-155 (Abb. 4.4E) signifikant niedriger bei M1 Patientinnen als in den Gruppen mit einem *triple negative* (miR-17, P=0,003; miR-155, P=0,0001) und HER2⁺ (miR-17, P=0,001; miR-155, P=0,0001) Mammakarzinom. Die miR-155 Transkriptmengen waren zusätzlich in der Gruppe mit einem ER⁺/PR⁺ Mammakarzinom höher als bei M1 Patientinnen (P=0,002).

Für miR-10b wurden keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen der unterschiedlichen Gruppen gefunden (Abb. 4.4A).

Bei den Untersuchungen zu dem ER und PR Status zeigte sich, dass miR-17 niedrigere Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit einem ER⁺/PR⁺ Mammakarzinom aufwies als bei Patientinnen mit einem anderen Rezeptorstatus (ER⁺/PR⁻, ER⁻/PR⁺, ER⁻/PR⁻, P=0,029, Tabelle 4.3). Auch für die Transkriptwerte der miR-34a wurde eine Assoziation mit dem Rezeptorstatus gefunden (ER⁻, P=0,012; ER⁻/PR⁻, P=0,029, Tabelle 4.3).

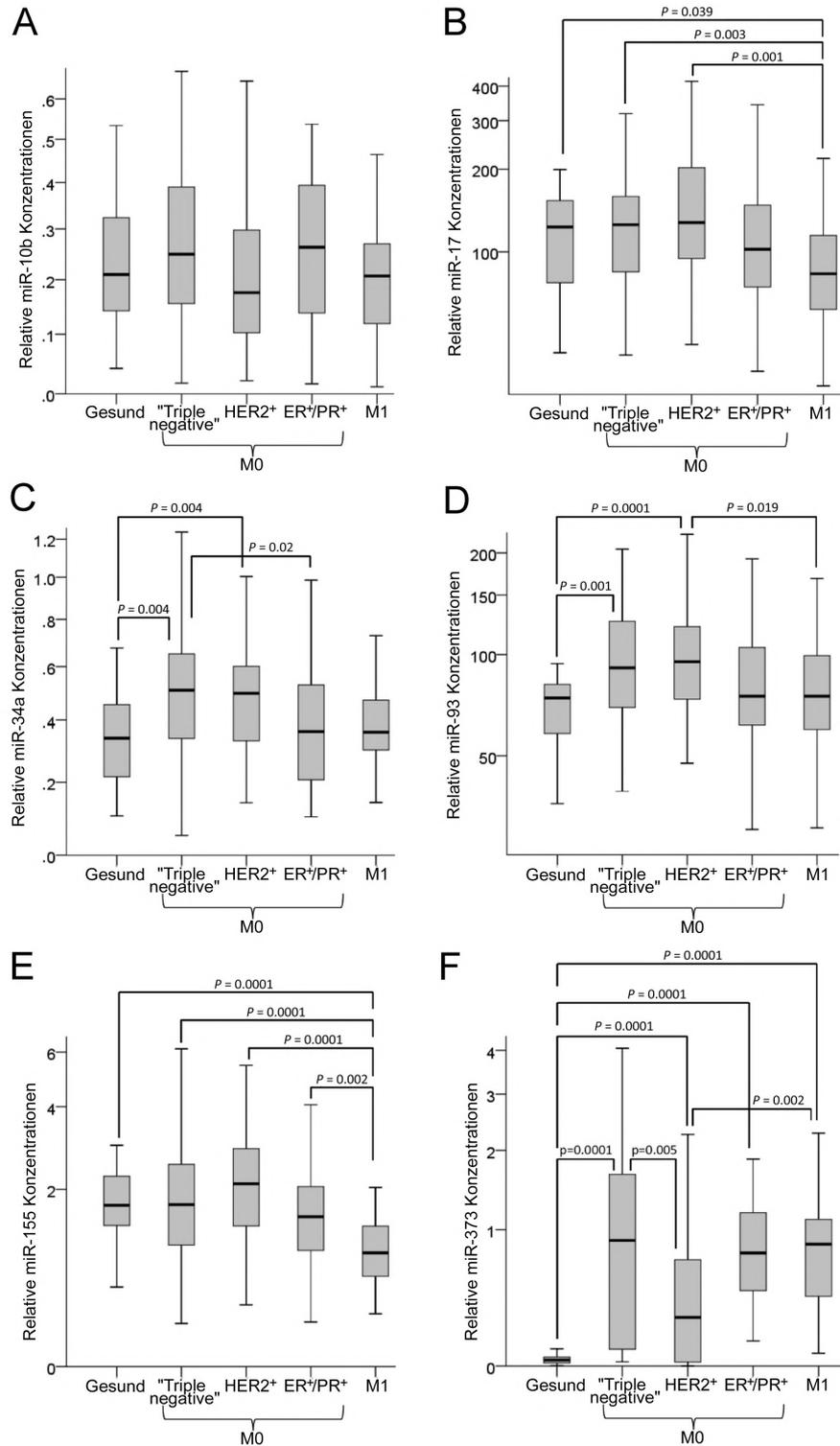


Abbildung 4.4: Quantifizierung der relativen miR-Konzentrationen im Serum von Mammakarzinompatientinnen. Die Boxplots vergleichen die relativen miR-10b (A), miR-17 (B), miR-34a (C), miR-93 (D), miR-155 (E) und miR-373 (F) Konzentration im Serum von gesunden Frauen (n=40), Patientinnen mit einem „triple negative“ (n=40), HER2⁺ (n=40) oder einem ER⁺/PR⁺ (n=40) primären Mammakarzinom und metastasierten Mammakarzinom (n=32). Die angegebenen, signifikanten P-Werte wurden mittels Mann-Whitney U Test bestimmt.

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der signifikanten Unterschiede zwischen den Serumkonzentrationen der miRs und den klinischen und pathologischen Risikofaktoren der Patientinnen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms.

Parameter	miR-10b ^a		miR-17 ^a		miR-34a ^b		miR-93 ^b		miR-155 ^a		miR-373 ^b	
	P-Wert	AUC	P-Wert	AUC	P-Wert	AUC	P-Wert	AUC	P-Wert	AUC	P-Wert	AUC
M0 vs. Gesund	-	-	-	-	0,013	0,636	0,001	0,699	-	-	0,0001	0,879
Triple negative vs. Gesund	-	-	-	-	0,004	0,692	0,001	0,732	-	-	0,0001	0,909
HER2 ⁺ vs. Gesund	-	-	-	-	0,004	0,691	0,0001	0,778	-	-	0,0001	0,745
ER ⁺ /PR ⁺ vs. Gesund	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0001	0,995
M1 vs. Gesund	-	-	0,039	0,649	-	-	-	-	0,0001	0,835	0,0001	0,990
M1 vs. M0	-	-	0,002	0,679	-	-	-	-	0,0001	0,781	-	-
HER2 ⁺ vs. HER2 ⁻	0,029	0,621	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0001	0,706
ER ⁻ vs. ER ⁺	-	-	-	-	0,012	0,636	-	-	-	-	-	-
ER ⁻ /PR ⁻ vs. ER ⁺ /PR ⁺	-	-	0,019	0,625	-	-	-	-	-	-	-	-
ER ⁺ /PR ⁺ vs. ER ⁺ /PR ⁻ , ER ⁻ /PR ⁺ , ER ⁻ /PR ⁻	-	-	-	-	0,029	0,624	-	-	-	-	-	-

Anmerkung: a, herunterregulierte miR; b, hochregulierte miR; der P-Wert aller AUC-Werte ist <0,5.

Abkürzungen: M0, Patientinnen mit primärem Mammakarzinom; M1 Patientinnen mit Metastasen; AUC, Area under Curve;

PR, Progesteron-Rezeptor; ER, Estrogen-Rezeptor; HER2, Human Epiderman Growth Factor Receptor 2.

4.1.6 Die miR-155 Expression kann durch DNA-Demethylierung induziert werden

Die miR-155 Konzentrationen waren signifikant geringer bei M1 Patientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen und Patientinnen mit einem primärem Mammakarzinom. Daher wurde untersucht, ob die miR-155 Expression epigenetisch durch DNA-Methylierung oder Histon-Deazetylierung reprimiert wird. Dafür wurde die Zelllinie MCF-7, die ein geringes metastatisches Potential besitzt und die stark metastatische Zelllinie MDA-MB-231 mit dem DNA-Demethylierungsagens 5'-Aza-2'-Deoxycytidin und dem Histon-Deazetylaseinhibitor TSA (Trichostatin A) inkubiert, und nach einer RNA Isolation die miR-Konzentrationen mittels *Real-Time* PCR bestimmt. Die geringe basale Expression von miR-155 konnte in den MDA-MB-231 Zellen durch 5'-Aza-2'-Deoxycytidin stark erhöht werden, aber die durch 5'-Aza-2'-Deoxycytidin induzierte Expression wurde durch TSA nicht weiter stimuliert. Dieser stimulatorische Effekt

wurde nicht in der weniger aggressiven Zelllinie MCF-7 beobachtet (Abb. 4.5). Daher besteht die Möglichkeit, dass miR-155 in hochmetastatischen Zellen durch DNA-Demethylierung reguliert wird.

Um zu untersuchen, ob die DNA-Demethylierung auch auf die Expression der anderen miRs einen Einfluss hat, wurden die Konzentrationen der miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93 und miR-373 in den beiden Zelllinien vor und nach der Inkubation mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin und TSA quantifiziert. Die Untersuchungen der miRs zeigten keinen (miR-10b, miR-34a, miR-93, miR-373) oder nur einen sehr geringen (miR-17) Unterschied in den Transkriptmengen vor und nach der Inkubation, was zu der Vermutung führt, dass diese miRs nicht durch epigenetische Prozesse reguliert werden.

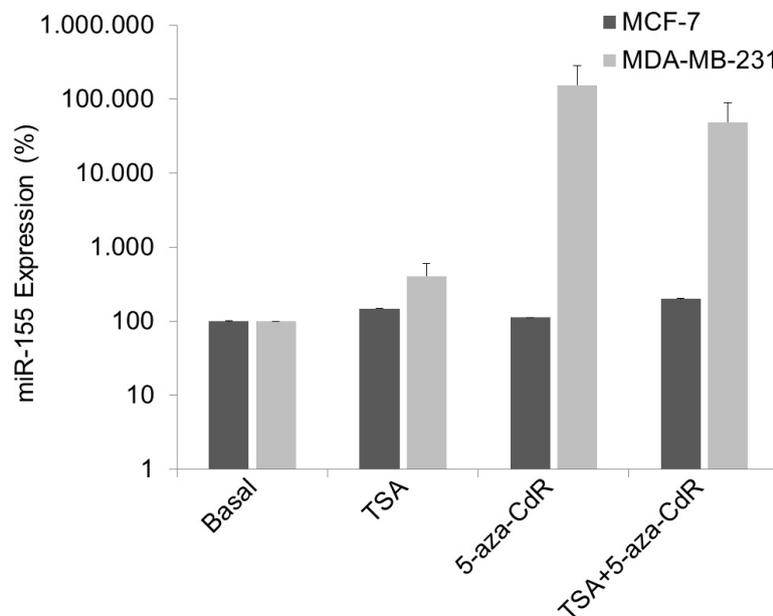


Abbildung 4.5: Die miR-155 Expression in basalen und mit TSA und 5'-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen. Das dargestellte Balkendiagramm zeigt die durch *Real-Time* PCR ermittelte miR-155 Expression in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 vor und nach Stimulation mit TSA und/oder 5'-Aza-2'-Deoxycytidin. Die basale Expression wurde als 100% festgelegt.

4.1.7 MiR-373 reprimiert die CD44-Proteinexpression

Um zu untersuchen, ob die hohen miR-373 Transkriptmengen im Serum auch mögliche Auswirkungen auf die Proteinexpression im Tumor haben, wurden verschiedene miR-Datenbanken (Diana, microRNA.org, Targetscan) nach potenziellen mRNA-Zielen der miR-373 durchsucht. Von besonderem Interesse waren putative Bindestellen für miR-373 in der 3' UTR (*Untranslated Region*) der CD44 und E-Cadherin mRNA. Um den reprimierenden Effekt auf diese Proteine durch miR-373 zu untersuchen, wurden die Brustkarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-231, sowie die mikrometastatische Mammakarzinomzelllinie BC-M1 transient mit der künstlichen miR-373 (Mimic) oder dem miR-373 Inhibitor transfiziert. Bei der Mimic handelt es sich um synthetische, doppelsträngige RNA Moleküle, die die endogene, reife miR-373 imitieren. Die Inhibitoren dagegen sind synthetische, einzelsträngige RNA Moleküle, die an die endogene miR-373 binden und ihre Funktion blockieren. Die Überexpression der miR-373 in den transfizierten Zelllinien wurde durch quantitative *Real-Time* PCR bestätigt.

Um zu analysieren, ob miR-373 die mRNA abbaut, wurde die Expression von CD44 und E-Cadherin mit mRNA-spezifischen Primern in einer *Real-Time* PCR detektiert. Allerdings konnte kein Effekt durch die miR-373 Überexpression oder Inhibierung auf die mRNA von E-Cadherin oder CD44 beobachtet werden. Auf Proteinebene ist E-Cadherin in MCF-7 Zellen und CD44 nur in den basalen MDA-231 und BC-M1 Zelllinien nachweisbar. In Western Blot-Analysen wurde kein Unterschied in MCF-7 Zellen durch die miR-373 Überexpression mittels Mimic oder Inhibierung mittels Inhibitor detektiert. Das zeigt sich anhand der gleichbleibenden Proteinkonzentration und somit Bandenstärke auf dem Western Blot, in den unterschiedlichen Versuchsansätzen (Abb. 4.6A). Die CD44 Proteinmenge wird dagegen sowohl in MDA-MB-231 (Abb. 4.6B), als auch in den BC-M1 (Abb. 4.6C) Zellen durch miR-373 reguliert. In beiden Zelllinien wird die Bande und somit die Proteinkonzentration schwächer, wenn die miR-373 durch Transfektion mit der Mimic überexprimiert wird und entsprechend stärker, wenn die miR-373 inhibiert wird. Um einen Effekt des Transfektionsreagenzes auszuschließen werden die Zellen zur Kontrolle nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Die gleichmäßige Proteinkonzentration wird durch die Detektion der HSC-70 Ladekontrolle überprüft, die nicht durch die miR-373 reguliert wird.

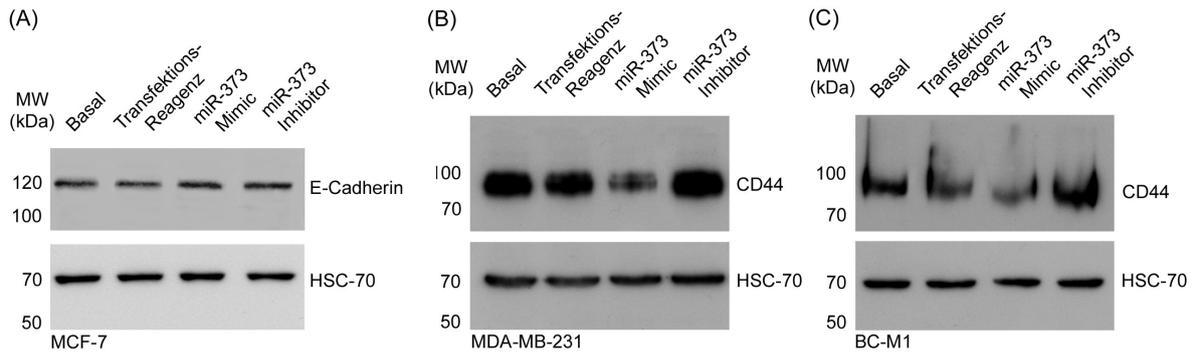


Abbildung 4.6: Inhibierung der CD44 Proteinexpression durch miR-373 Überexpression. Die Proteinmengen der MCF-7, MDA-MB-231 und BC-M1 Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. HSC70 fungiert als Ladekontrolle. (A) E-Cadherin Proteinexpression in nicht transfizierten, basalen MCF-7 Zellen, Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert oder mit miR-373 Mimic oder miR-373 Inhibitor transfiziert. (B) CD44 Proteinexpression in nicht transfizierten, basalen MDA-MB-231 oder (C) basalen BC-M1 Zellen, Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert oder mit miR-373 Mimic oder miR-373 Inhibitor transfiziert.

Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass miR-373 in die Repression von CD44 involviert ist, aber keinen Einfluss auf die E-Cadherin Expression in den untersuchten Mammakarzinomzelllinien hat.

4.2 Die zirkulierenden zellfreien und exosomalen miR-101, miR-371, miR-372 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Mammakarzinompatientinnen

Bei der Analyse des Kollektivs der MARIE-Studie sind insbesondere die Konzentrationen der miR-373 durch ihre starke Assoziation mit dem HER2-Rezeptor und ihren deutlichen Unterschieden zwischen gesunden Frauen und Mammakarzinompatientinnen aufgefallen. Daher sollte diese miR und die beiden im gleichen Cluster liegenden miRs miR-371 und miR-372 näher untersucht werden. Des Weiteren gab es eine aktuelle Studie, in der für miR-101 eine wichtige Rolle im Estrogen-unabhängigen Wachstum postuliert wurde [239], auf Grund derer miR-101 als weitere miR für die vorliegende Studie des Kollektivs der Gynäkologie des UKE ausgewählt wurde.

4.2.1 MiR-16 und miR-484 als endogene Kontrollen und cel-39 als *spike-in* Kontrolle

Zusätzlich zu miR-16, wurde miR-484 als potenzielle endogene Kontrolle für die vorliegende Studie über das Kollektiv der Gynäkologie des UKE evaluiert [107]. Für miR-16 lag der Mittelwert des CT bei gesunden Frauen bei 25,4 (Standardabweichung 1,9), bei Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen bei 25,8 (Standardabweichung 1,6) und bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom bei 25,0 (Standardabweichung 1,4). Für miR-484 lag der Mittelwert des CT bei gesunden Frauen bei 29,1 (Standardabweichung 1,6), bei Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen bei 28,8 (Standardabweichung 1,2) und bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom bei 28,5 (Standardabweichung 1,4). Auf Grund der relativ konstanten Transkriptmengen bei den Patientinnen und gesunden Frauen eignen sich beide zirkulierende miRs als endogene Kontrollen in diesem Kollektiv der Gynäkologie des UKE. Für die Normalisierung der zu analysierenden miRs wurde der Mittelwert der beiden miRs gebildet, der bei gesunden Frauen bei 27,2, bei Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen bei 27,3 und bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom bei 26,8 lag.

Um die möglichen Abweichungen bei der RNA-Extraktion und der reversen Transkription zu normalisieren, wurden 20 fmol der synthetischen cel-39 in die Denaturierungslösung als *spike-in* Kontrolle zu den Serumproben gegeben. Cel-39 wurde mittels *Real-Time* PCR quantifiziert und die endogenen Kontrollen damit normalisiert.

4.2.2 Quantifizierung der zellfreien miR-101, miR-371, miR-372 und miR-373 im präoperativen Serum von Patientinnen mit primärem Mammakarzinom oder gutartigen Brusterkrankungen

Die relativen Konzentrationen der zellfreien miR-101, miR-371, miR-372 und miR-373 wurden im präoperativen Serum von 168 Patientinnen mit einem invasivem Mammakarzinom, 19 Patientinnen mit einer benignen Brusterkrankung und 28 gesunden Frauen mittels *Real-Time* PCR bestimmt. Wie in Abbildung 4.7 gezeigt, stiegen die miR-101 Serumkonzentrationen von gesunden Frauen über Patientinnen mit benignen Brusterkrankungen ($P=0,024$) zu Mammakarzinompatientinnen ($P=0,0001$) kon-

tinuierlich an. Außerdem war der Konzentrationsunterschied zwischen den Patientinnen mit einer gutartigen Brusterkrankung und den Mammakarzinompatientinnen signifikant ($P=0,013$).

Überraschend war die Detektion der unterschiedlichen miR-371, miR-372 und miR-373 Transkriptmengen, die alle im gleichen „Cluster“ der chromosomalen Region 19q13.42 liegen. Die miR-371 Konzentrationen waren zu gering um mittels *Real-Time* PCR gemessen werden zu können. MiR-372 konnte quantifiziert werden, allerdings war sie nicht differenziell bei Patientinnen mit gutartigen Brusterkrankungen oder einem Mammakarzinom exprimiert (Abb. 4.7). Die miR-373 Transkriptmengen waren dagegen sowohl bei Patientinnen mit benignen ($P=0,0001$) Erkrankungen als auch bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom ($P=0,001$) signifikant im Vergleich zu gesunden Frauen erhöht. Im Gegensatz zu miR-101 waren die miR-373 Konzentrationen signifikant höher bei Patientinnen mit einer gutartigen Brusterkrankung als bei Mammakarzinompatientinnen ($P=0,024$; Abb. 4.7).

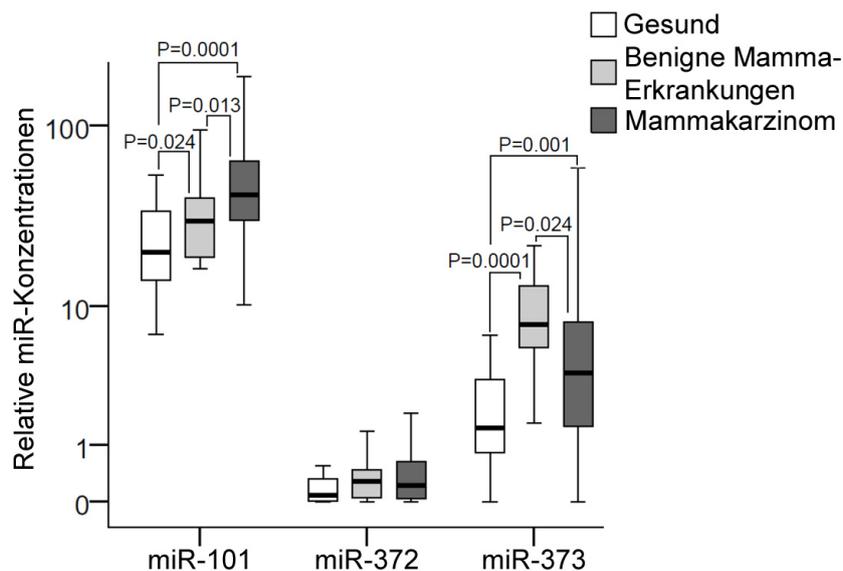


Abbildung 4.7: Quantifizierung der zellfreien miR-101, miR-372 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom oder benigner Brusterkrankung und von gesunden Frauen. Der dargestellte Boxplot vergleicht die durch die *Real-Time* PCR ermittelten miR-Konzentrationen im Serum von gesunden Frauen ($n=28$), Patientinnen mit einer gutartigen Brusterkrankung ($n=19$) und Mammakarzinom ($n=168$). Die angegebenen, statistisch signifikanten P-Werte sind durch den Mann-Whitney *U* Test bestimmt worden.

Da bei der Entscheidung über eine Therapie der molekulare Subtyp des Mammakarzinoms eine wichtige Rolle spielt, wurde das Kollektiv in 60 Luminale A (ER⁺ und PR⁺, HER2⁻, Ki-67 niedrig), 59 Luminale B (entweder HER2⁻, ER⁺, PR⁻ und Ki-67 hoch; oder HER2⁺, ER⁺, Ki-67 gering oder hoch und PR⁻ oder PR⁺), 33 Basal-ähnliche (ER⁻, PR⁻ und HER2⁻) und 5 HER2⁺ (HER2⁺, ER⁻ und PR⁻) Mammakarzinom-Subtypen unterteilt. Aus statistischen Gründen wurde der Luminale A und B Subtyp zusammengefasst. In allen Subgruppen waren die miR-101 und miR-373 Konzentrationen höher als bei den gesunden Frauen. Es gab allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subtypen (Abb. 4.8).

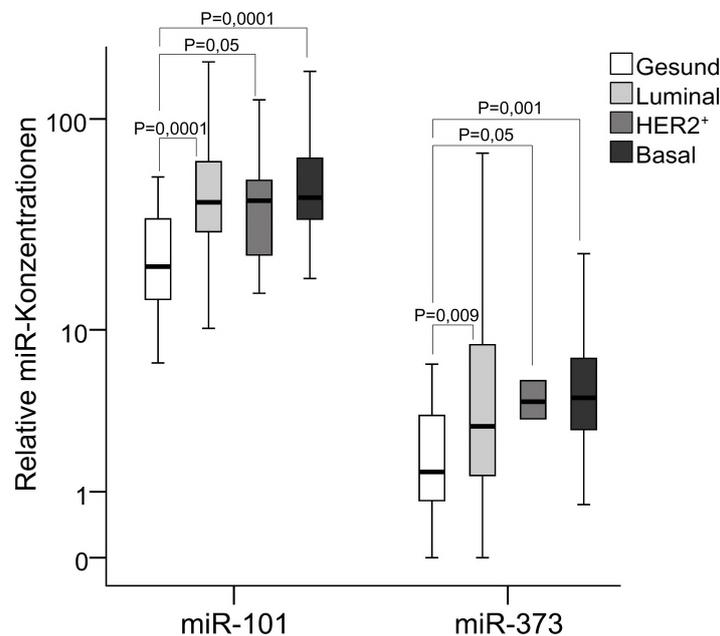


Abbildung 4.8: Quantifizierung der zellfreien miR-101 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit luminalem, HER2⁺ und basal-ähnlichen Mammakarzinom, sowie von gesunden Frauen. Der dargestellte Boxplot vergleicht die durch die *Real-Time* PCR ermittelten miR-101 und miR-373 Konzentrationen im Serum von gesunden Frauen (n=28), Patientinnen mit einem luminalen (n=119), HER2⁺ (n=5) und basalen Mammakarzinom (n=33). Die angegebenen, statistisch signifikanten P-Werte sind durch den Mann-Whitney *U* Test bestimmt worden.

Zusätzlich wurden die miR-101, miR-372 und miR-373 Konzentrationen mit den klinischen und pathologischen Risikofaktoren der Patientinnen verglichen. In Tabelle 4.4 sind die Mediane sowie die 5 und 95 Perzentile der miR-Variablen in den verschie-

denen Patientengruppen zusammengefasst. Die Serumkonzentrationen der zellfreien miR-101 korrelierten invers mit dem Lymphknotenstatus ($p=0,008$; Abb 4.9). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Herunterregulierung der miR-101 eine Rolle bei Lymphknoten-positiven Karzinomen und ein Anstieg eher bei nicht metastatischen Mammakarzinomen spielt. Es wurden keine weiteren Korrelationen der miRs mit den Risikofaktoren gefunden.

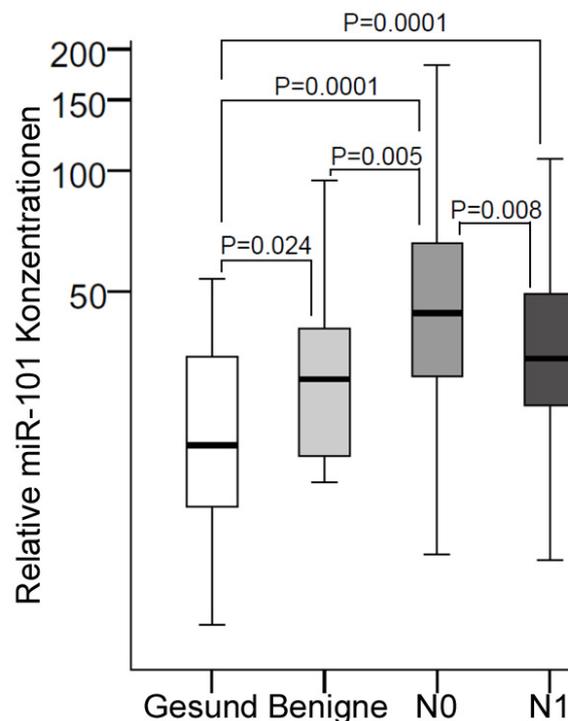


Abbildung 4.9: Inverse Assoziation der zellfreien miR-101 Konzentrationen mit dem Lymphknotenstatus bei präoperativen Mammakarzinompatientinnen. Der dargestellte Boxplot vergleicht die durch *Real-Time* PCR ermittelten miR-Konzentrationen im Serum von gesunden Frauen ($n=28$) und Mammakarzinompatientinnen ohne ($n=114$) und mit ($n=53$) Lymphknotenmetastasen. Die angegebenen, statistisch signifikanten P-Werte sind durch den Mann-Whitney *U* Test bestimmt worden.

Tabelle 4.4: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und ihre Korrelationen mit den relativen miR-Konzentrationen im präoperativen Serum.

Parameter	Patienten n (%)	miR-101		miR-372		miR-373	
		Median 5%	95%	Median 5%	95%	Median 5%	95%
Mammakarzinompatientinnen							
Gesamt	168 (100)	42		0,2		3,8	
		16	106	0,0	2,6	0,4	43
Alter	59 Jahre (von 30 bis 85 Jahre)						
Histologie							
Duktal	109 (65)	41		0,2		3,8	
		17	118	0,0	3,1	0,4	40
Duktu-Lobulär	9 (5)	48		0,2		2,2	
		29	-	0,0	-	0,7	-
Lobulär	31 (19)	41		0,2		4,3	
		12	93	0,0	1,8	0,2	73
Andere	19 (11)	43		0,0		3,2	
		15	-	0,0	-	0,3	-
Tumorstadium							
pT1	93 (56)	43		0,2		2,8	
		16	106	0,0	2,6	0,4	49
pT2-4	74 (44)	39		0,2		4,3	
		16	110	0,0	3,0	0,5	37
Lymphknotenmetastasen							
Negativ	114 (68)	44		0,2		4,2	
		18	106	0,0	3,1	0,4	49
Positiv	53 (32)	35		0,2		3,3	
		13	87	0,0	2,4	0,4	23
Graduierung							
1,2	98 (60)	42		0,3		3,6	
		15	100	0,0	2,9	0,3	49
3	64 (40)	40		0,2		4,1	
		16	106	0,0	3,3	0,7	43
Estrogen-Rezeptorstatus							
Negativ	38 (23)	42		0,2		4,1	
		18	123	0,0	3,3	0,7	31
Positiv	127 (77)	41		0,2		3,4	
		14	102	0,0	2,9	0,3	48

Tabelle 4.4: - fortgesetzt von vorheriger Seite

Parameter	Patienten n (%)	miR-101		miR-372		miR-373	
		Median		Median		Median	
		5%	95%	5%	95%	5%	95%
Progesteron-Rezeptorstatus							
Negativ	68 (41)	38		0,3		4,2	
		19	127	0,0	3,4	0,8	32
Positiv	98 (59)	44		0,2		2,7	
		14	100	0,0	1,9	0,4	49
HER2 Status							
Negativ	129 (82)	43		0,2		3,6	
		15	106	0,0	3,2	0,4	43
Positiv	28 (18)	40		0,2		3,8	
		16	117	0,0	2,4	0,3	15
Subtyp							
Luminal	119 (76)	41		0,2		3,0	
		14	103	0,0	3,1	0,3	41
HER2 ⁺	5 (3)	42		0,1		4,2	
		15	-	0,0	-	1,2	-
Basal-ähnlich	33 (21)	43		0,2		4,4	
		21	142	0,0	3,0	0,8	40
Gesamtüberleben							
Lebendig	147 (90)	43		0,2		3,6	
		16	104	0,0	3,0	0,4	48
Verstorben	16 (10)	40		0,3		3,8	
		5,7	-	0,0	-	0,6	-

Anmerkung: -, 95er Perzentile konnten nicht berechnet werden.

Abkürzungen: HER2, *Human Epiderman Growth Factor Receptor 2*.

4.2.3 Quantifizierung der exosomalen miR-101, miR-372 und miR-373 im Serum von Mammakarzinompatientinnen

Exosomen sind von besonderem Interesse, seit bekannt wurde, dass sie miRs enthalten und sie durch horizontalen Transfer in andere Zellen einschleusen können, was zu einer möglichen Transformation der Zellen führen könnte. Von 50 Mammakarzinompatientinnen und 12 gesunden Frauen des Kollektivs war ausreichend Serum

vorhanden, um die Exosomen zu extrahieren (Tabelle 4.5). Das Vorhandensein der Exosomen wurde mittels Western Blot-Analyse und dem Antikörper gegen den exosomalen Marker CD63 nachgewiesen (Abb. 4.10).

Tabelle 4.5: Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Mammakarzinoms und ihre Korrelationen mit den relativen exosomalen miR-Serumkonzentrationen.

Parameter	Patienten n (%)	miR-101		miR-372		miR-373	
		Median 5%	Median 95%	Median 5%	Median 95%	Median 5%	Median 95%
Mammakarzinompatientinnen							
Gesamt	50 (100)	101		1,1		16	
		38	271	0,0	4,7	1,5	104
Alter	56 Jahre (von 30 bis 83 Jahre)						
Histologie							
Duktal	38 (76)	102		1,3		13	
		32	295	0,0	4,4	1,2	88
Duktu-Lobulär	2 (4)	81		1,0		33	
		64	-	0,0	-	13	-
Lobulär	7 (11)	129		0,8		35	
		63	-	0,7	-	14	-
Andere	3 (6)	73		0,9		13	
		69	-	0,8	-	7,0	-
Tumorstadium							
pT1	25 (50)	112		1,0		13	
		21	289	0,0	4,3	1,4	92
pT2-4	25 (50)	83		1,6		17	
		40	280	0,0	-	1,1	132
Lymphknotenmetastasen							
Negativ	35 (71)	118		1,2		14	
		29	297	0,0	5,4	1,2	112
Positiv	14 (29)	101		1,1		16	
		63	-	0,0	-	1,6	-
Graduierung							
1,2	27 (61)	97		1,2		14	
		21	240	0,0	5,8	1,0	122
3	17 (39)	101		1,0		21	
		63	-	0,0	-	7,0	-
Estrogen-Rezeptorstatus							
Negativ	14 (29)	108		1,3		24	
		43	-	0,0	-	9,7	-
Positiv	35 (71)	101		1,1		16	
		29	240	0,0	5,3	1,2	112

Tabelle 4.5: - fortgesetzt von vorheriger Seite

Parameter	Patienten n (%)	miR-101		miR-372		miR-373	
		Median		Median		Median	
		5%	95%	5%	95%	5%	95%
Progesteron-Rezeptorstatus							
Negativ	22 (44)	97		1,2		23	
		35	304	0,0	-	6,2	103
Positiv	28 (56)	112		1,1		13	
		28	243	0,0	5,6	1,0	124
HER2 Status							
Negativ	36 (80)	113		1,0		16	
		50	257	0,0	5,1	1,2	112
Positiv	9 (20)	100		1,3		23	
		45	-	0,8	-	5,6	-
Subtyp							
Luminal	29 (66)	100		1,1		13	
		29	240	0,0	5,3	1,2	112
HER2 ⁺	3 (7)	120		1,3		23	
		79	-	1,3	-	10	-
Basal-ähnlich	12 (27)	101		1,1		16	
		43	-	0,0	-	10	-
Gesamtüberleben							
Lebendig	45 (94)	100		1,2		17	
		36	282	0,0	4,9	1,4	104
Verstorben	3 (6)	118		0,9		16	
		63	-	0,0	-	13	-

Anmerkung: -, 95er Perzentile konnten nicht berechnet werden.

Abkürzung: HER2, *Human Epiderman Growth Factor Receptor 2*.

Auch für die Normalisierung der miR-Konzentrationen aus den Exosomen wird eine endogene Kontrolle benötigt. Zu diesem Zweck wurde neben der *spike-in* Kontrolle cel-39 auch miR-484 und wieder mir-16 analysiert. Die CT-Werte der miR-16 und miR-484 sind höher im Vergleich zu den Werten im gesamten Serum, aber in gesunden Frauen und Mammakarzinompatientinnen ähnlich. Die erhöhten CT-Werte bedeuten, dass die miR-Konzentrationen geringer sind, da der Schwellenwert erst bei einem höheren Zyklus in der *Real-Time* PCR erreicht wird.

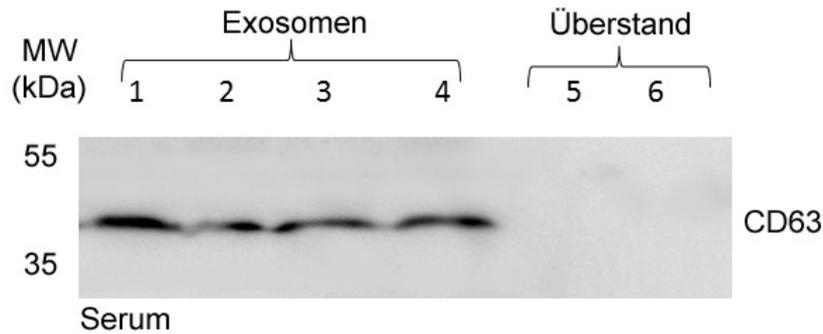


Abbildung 4.10: Nachweis des Exosomen-spezifischen CD63 Proteins im Serum. Exosomen wurden aus Serum extrahiert und pelletiert, um mittels Western Blot das Transmembranprotein CD63 zu detektieren. Die negative Kontrolle bildet der Exosomen-freie Überstand nach der Pelletierung, mit dem kein Signal durch den CD63 Antikörper erzeugt werden kann (Spur 5,6). Der Western Blot zeigt representative Beispiele von extrahierten Exosomen aus dem Serum von Mammakarzinompatientinnen (Spur 1, 2, 3, 4).

Für miR-16 betragen die CT-Werte bei gesunden Frauen 27,2 (Standardabweichung 1,1) und bei Mammakarzinompatientinnen 27,3 (Standardabweichung 1,4). Für miR-484 betragen die CT-Werte bei gesunden Frauen 30,6 (Standardabweichung 1,1) und bei Mammakarzinompatientinnen 30,0 (Standardabweichung 1,3), was einen Mittelwert von 28,3 in gesunden Frauen und 28,6 in Mammakarzinompatientinnen ergibt. Die niedrigeren Konzentrationen der miR-16 und miR-484 in den Exosomen, im Vergleich zum gesamten Serum deutet darauf hin, dass die beiden miRs noch in anderer Form, wie beispielsweise proteingebunden, im Serum zirkulieren. Auf Grund ihrer gleichmäßigen Konzentrationen in den Serum-Exosomen aus gesunden Frauen und den Mammakarzinompatientinnen können sie als endogene Kontrollen genutzt werden.

Die relativen exosomalen miR-101, miR-372 und miR-373 Konzentrationen wurden im Serum von Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen verglichen. Da die Exosomen nur eine Fraktion des gesamten Serums sind und miR-371 im gesamten Serum nicht detektiert werden konnte, wurde sie nicht in den Exosomen analysiert. In beiden Kohorten waren die relativen Serumkonzentrationen der miRs höher in der exosomalen als in der gesamten zellfreien Fraktion (Abb. 4.11). Das kann dadurch erklärt werden, dass die rohen CT-Werte der miR-101, miR-372 und miR-373 ähnlich im gesamten Serum und den Exosomen waren. Allerdings führte die Normalisierung mit miR-16 und miR-484, deren Transkriptmengen geringer in den Exosomen als in dem gesamten Serum waren, zu höheren relativen Konzentrationen

der miR-101, miR-372 und miR-373. Die Analysen zeigen somit, dass miR-101, miR-372 und miR-373 vorwiegend in Exosomen im Serum zirkulieren. Außerdem wurde ein Tumor-spezifischer Anstieg der exosomalen miR-101 ($P=0,0001$) und miR-372 ($P=0,021$) detektiert. Die Werte der beiden miRs sind folglich höher bei Mammakarzinompatientinnen als bei gesunden Frauen. Für miR-373 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen festgestellt werden (Abb. 4.11).

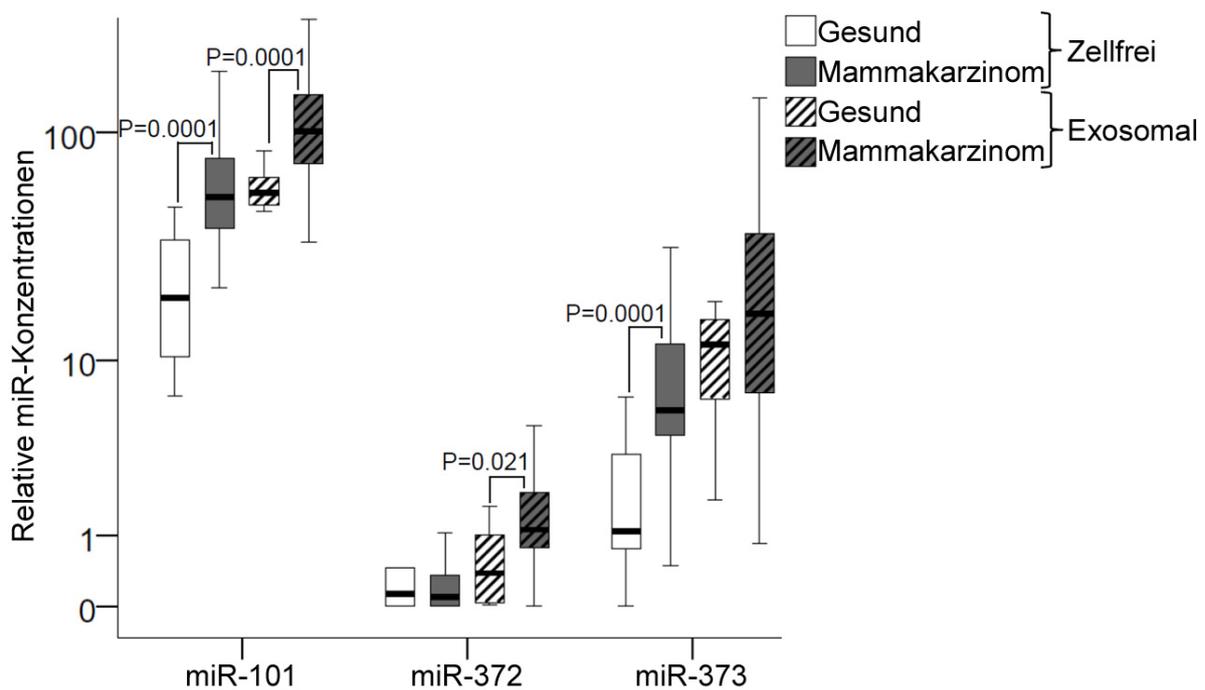


Abbildung 4.11: Quantifizierung der exosomalen miR-101, miR-372 und miR-373 Konzentrationen im Serum von Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom und gesunden Frauen. Der dargestellte Boxplot vergleicht die durch *Real-Time* PCR ermittelten miR-Konzentrationen in Exosomen aus dem Serum von gesunden Frauen ($n=12$) mit Mammakarzinompatientinnen ($n=50$). Die angegebenen, statistisch signifikanten P-Werte sind durch den Mann-Whitney *U* Test bestimmt worden.

Hinsichtlich der molekularen Subtypen konnte eine signifikant höhere exosomale miR-373 Konzentration in basal-ähnlichen als in luminalen Mammakarzinomen detektiert werden ($P=0,027$; Abb. 4.12A). Dementsprechend waren die exosomalen miR-373 Transkriptmengen auch höher bei ER^- ($P=0,021$; Abb. 4.12B) und PR^- ($P=0,01$; Abb. 4.12C) Mammakarzinompatientinnen als bei den korrespondierenden Rezeptor-positiven Patientinnen. Diese Ergebnisse deuten auf eine Assoziation der miR-373

mit einem negativen Rezeptorstatus hin. Die weiteren Untersuchungen zeigten keine Korrelationen zwischen exosomalen miR-Konzentrationen und den Risikofaktoren der Patientinnen.

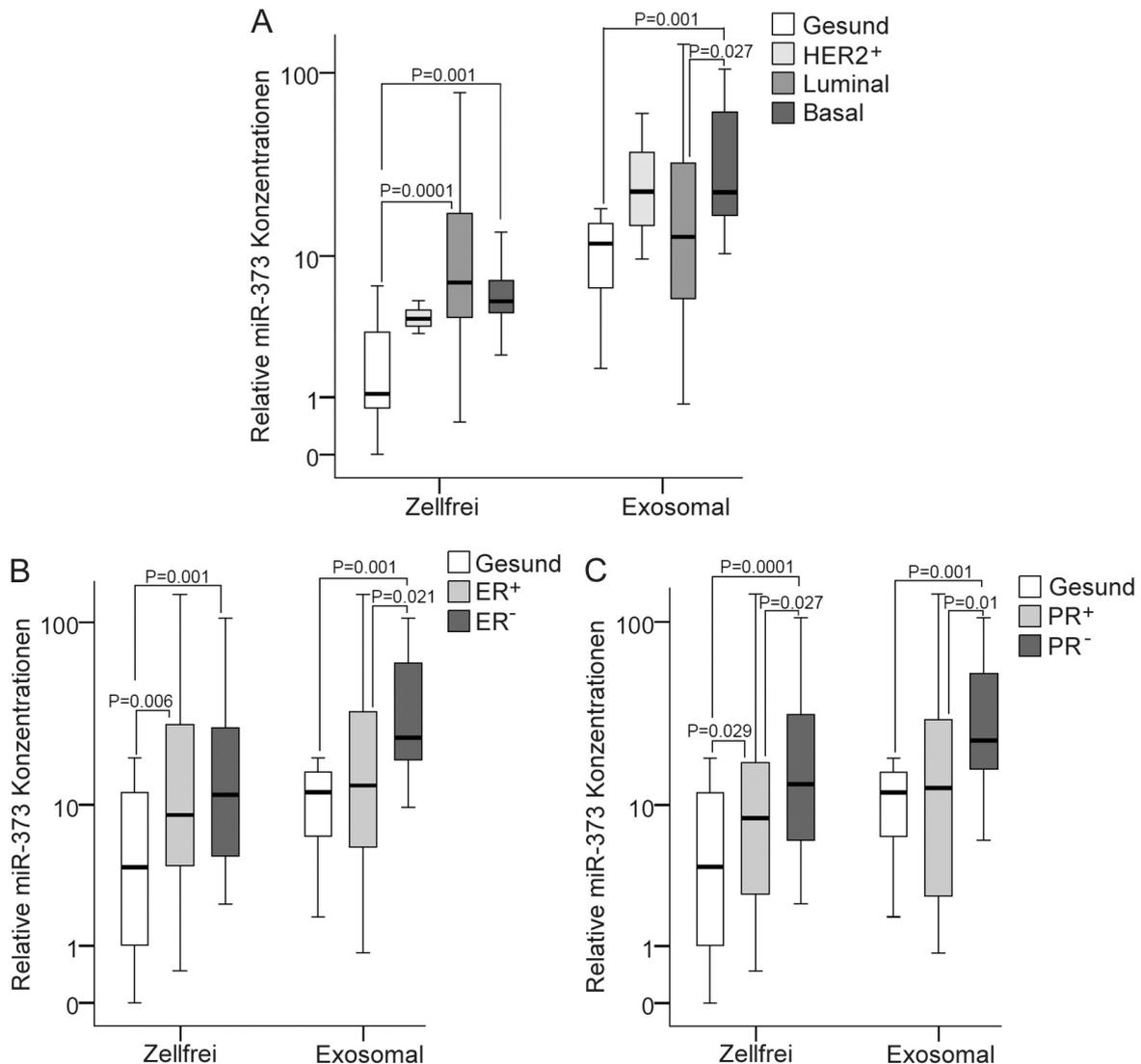


Abbildung 4.12: Quantifizierung der exosomalen miR-373 Konzentrationen im präoperativen Serum von Patientinnen mit unterschiedlichen Subtypen und Rezeptorstatus.

Die dargestellten Boxplots vergleichen die durch *Real-Time* PCR ermittelten miR-373 Konzentrationen in Exosomen aus dem Serum von gesunden Frauen (n=12) und Patientinnen mit (A) luminalen (n=29) oder basal-ähnlichen (n=12), (B) ER⁺ (n=35) und ER⁻ (n=14), und (C) PR⁺ (n=28) und PR⁻ (n=22) Mammakarzinomen. Die angegebenen, statistisch signifikanten P-Werte sind durch den Mann-Whitney *U* Test bestimmt worden.

4.2.4 MiR-373 inhibiert die Estrogen-Rezeptor-Proteinexpression

Da die Ergebnisse aus den Untersuchungen des Kollektivs der Gynäkologie des UKE auf eine Assoziation zwischen miR-373 und einem Rezeptor-negativen Mammakarzinom hinweisen, wurde untersucht, ob der ER oder PR Ziele der miR-373 sind. Dazu wurden zunächst in verschiedenen miR-Datenbanken (Diana, microRNA.org und Targets) untersucht, ob miR-373 potenzielle Bindestellen in der 3'UTR des ER oder PR aufweist.

In der 3' UTR des ER, aber nicht des PR, wurde eine mögliche Bindestelle gefunden. Anschließend wurden Transfektionsstudien in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7, MDA-MB-231 und der mikrometastatischen Zelllinie BC-M1 durchgeführt, um zu untersuchen, ob der ER ein Ziel der miR-373 ist. Allerdings wurde nur in den MCF-7 Zellen eine hohe Menge an ER-mRNA und ER-Protein detektiert. Daher wurden nur die MCF-7 Zellen mit den miR-373 Mimics oder einem Expressionsplasmid, das für miR-373 kodiert, transfiziert. MiR-373 Mimics sind synthetische, doppelsträngige RNA Moleküle, die die endogene, reife miR-373 imitieren. Die Effizienz der transienten Transfektion wurde durch Quantifizierung der miR-373 Expression mittels *Real-Time* PCR überprüft.

Die mRNA-Konzentrationen des ER wurden durch eine Überexpression von miR-373 nicht inhibiert, wie mittels *Real-Time* PCR ermittelt wurde (Abb. 4.13A). Allerdings wird die ER-Proteinexpression nach miR-373 Überexpression herunterreguliert. Dies wurde in Western Blot Analysen, durch die schwächeren Banden der mit miR-373 transfizierten MCF-7 Zellen (Abb. 4.13B, Spur Mimic und Plasmid) im Vergleich zu den stärkeren Banden der nicht oder mit einem leeren Vektor transfizierten Zellen (Abb. 4.13B, Spur basal und leerer Vektor) festgestellt. Durch die HSC-70 Ladekontrolle, die eine gleichmäßige Bandenstärke in allen Proben aufweist, wird sichergestellt, dass immer die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass miR-373 die ER-Proteinexpression durch Inhibierung der Translation reprimiert.

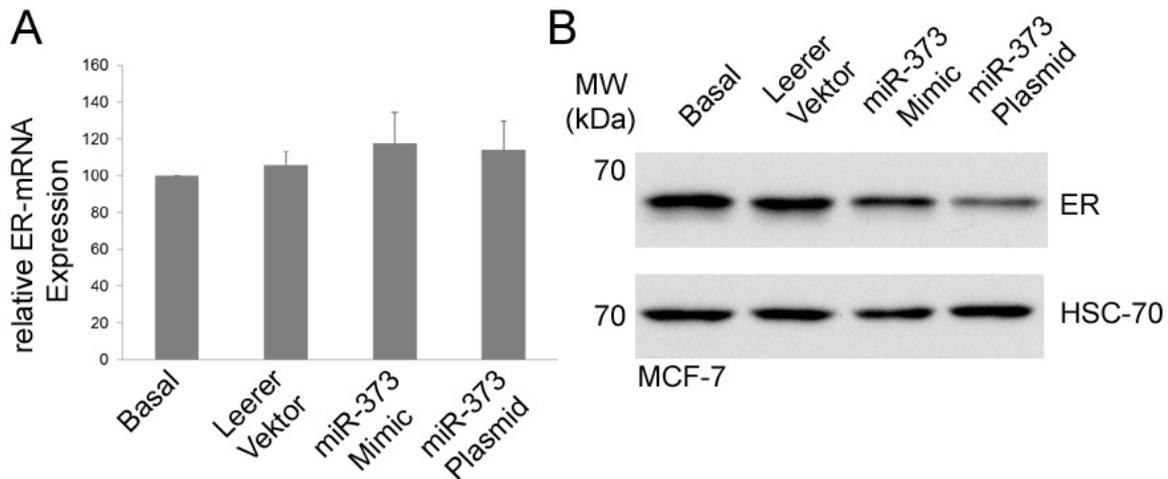


Abbildung 4.13: Estrogen-Rezeptor mRNA- und Proteinexpression nach miR-373 Überexpression. (A) Die relative ER mRNA-Expression in MCF-7 Zellen wurden mittels *Real-Time* PCR quantifiziert. Die Normalisierung erfolgte mit GAPDH. (B) Die ER Proteinmengen der MCF-7 Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. HSC70 fungiert als Ladekontrolle. Unbehandelte MCF-7 Zellen (Basal), MCF-7 Zellen mit dem leeren Expressionsplasmid, der miR-373 Mimic oder dem miR-373 Expressionsplasmid transfiziert wurden für die Analysen genutzt.

4.2.5 MiR-373 inhibiert die Camptothecin induzierte Apoptose

Die erhöhte miR-373 Expression im Serum von Mammakarzinompatientinnen führte zu der Frage, inwiefern miR-373 einen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Dazu wurde in nicht transfizierten und in mit der miR-373 Mimic transfizierten MCF-7 Zellen die Apoptose mit Hilfe des Topoisomerase I Inhibitors Camptothecin induziert. Camptothecin wird in der Chemotherapie als Induktionsmittel der Apoptose genutzt. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen und Zellen die mit der miR-373 Mimic transfiziert wurden, in denen aber keine Apoptose Induktion mit Camptothecin erfolgte, genutzt. In durchflusszytometrischen Analysen kann eine Abnahme der späta-poptotischen Zellen durch Camptothecin-Behandlung nach Transfektion der MCF-7 Zellen mit der miR-373 Mimic im Vergleich zu den nicht transfizierten Zellen beobachtet werden (Abb. 4.14 FACS-Analyse, Quadrant Q2). Dieses Ergebnis wird auf durchlichtmikroskopischen Aufnahmen bestätigt, in denen ein Apoptose-inhibierender Effekt in den miR-373 überexprimierenden MCF-7 Zellen beobachtet wurde, wie durch die verringerte Anzahl der apoptotischen, runden, leuchtenden Zellen erkennbar ist (Abb. 4.14 Durchlichtmikroskopie). Zum Vergleich hatte die Überexpression der miR-155 in den MCF-7 Zellen keine Auswirkung auf die Apoptose.

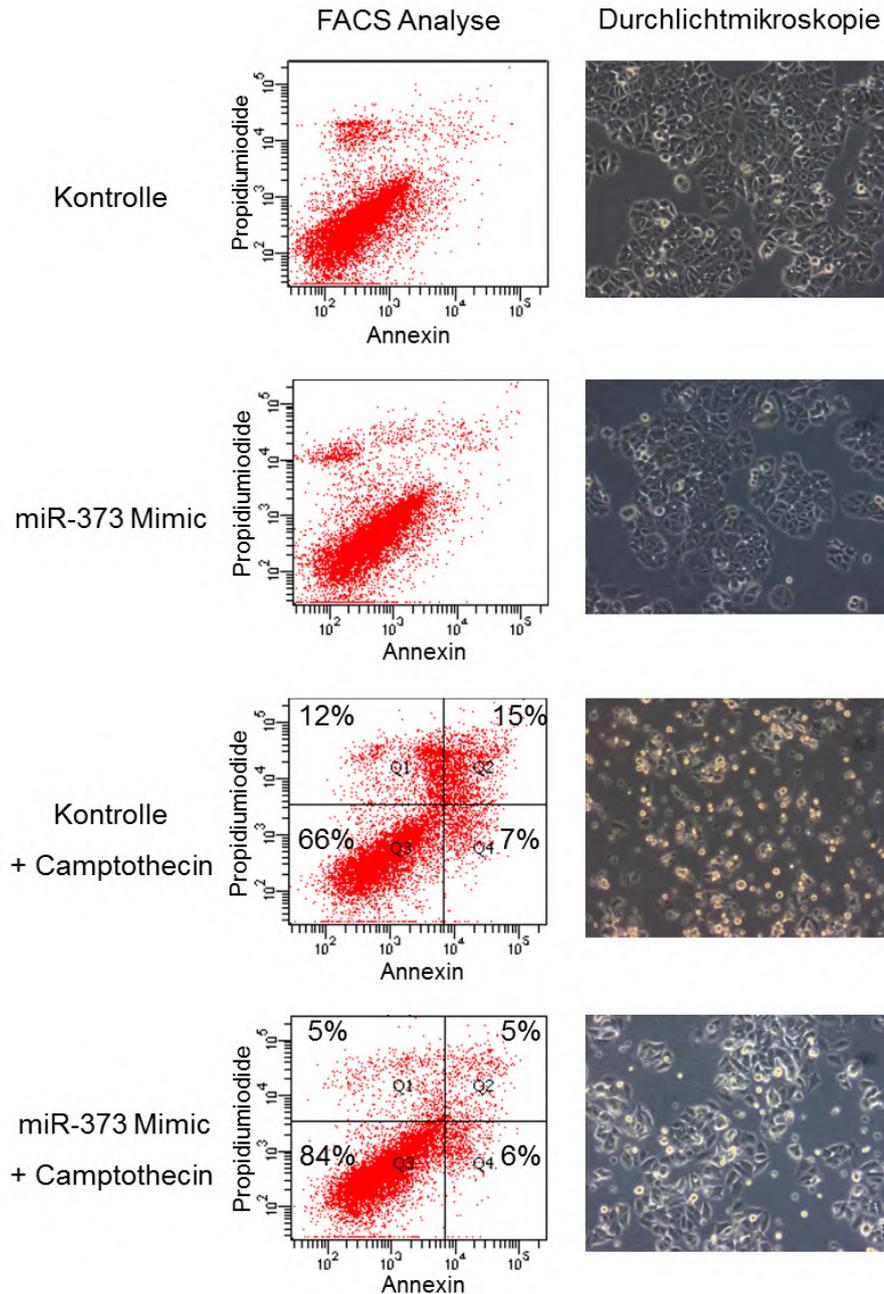


Abbildung 4.14: Inhibierung der durch Camptothecin vermittelten Apoptose durch eine miR-373 Überexpression. MiR-373 transfizierte und nicht transfizierte MCF-7 Zellen wurden mit dem Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin behandelt, um die Apoptose zu induzieren. Die Daten wurden am FACS-Canto II (links) und durchlichtmikroskopisch (rechts, 10x Vergrößerung) analysiert. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC, das an Phosphatidylserin bindet, und mit Propidiumiodid, das an DNA bindet, markiert. Die Zellfragmente im linken oberen Quadranten sind nur positiv für Propidiumiodid (Q1). Spätapoptotische Zellen im Quadranten rechts oben sind positiv für Annexin und Propidiumiodid (Q2). Lebende Zellen im linken unteren Quadranten sind negativ für Annexin und Propidiumiodid (Q3). Frühapoptotische Zellen im rechten unteren Quadranten sind Annexin-positiv (Q4). Die prozentuale Zellzahl ist angegeben.

Zusätzlich wurde die Proliferation in den Mammakarzinomzelllinien MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468 und BC-M1 nach Transfektion mit der miR-373 Mimic untersucht. Dazu wurde eine Proliferationsassay mittels MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Blue*) durchgeführt. Allerdings konnte in keiner Zelllinie und zu keinem Zeitpunkt ein Effekt der miR-373 auf die Proliferation beobachtet werden (Abb. 4.15).

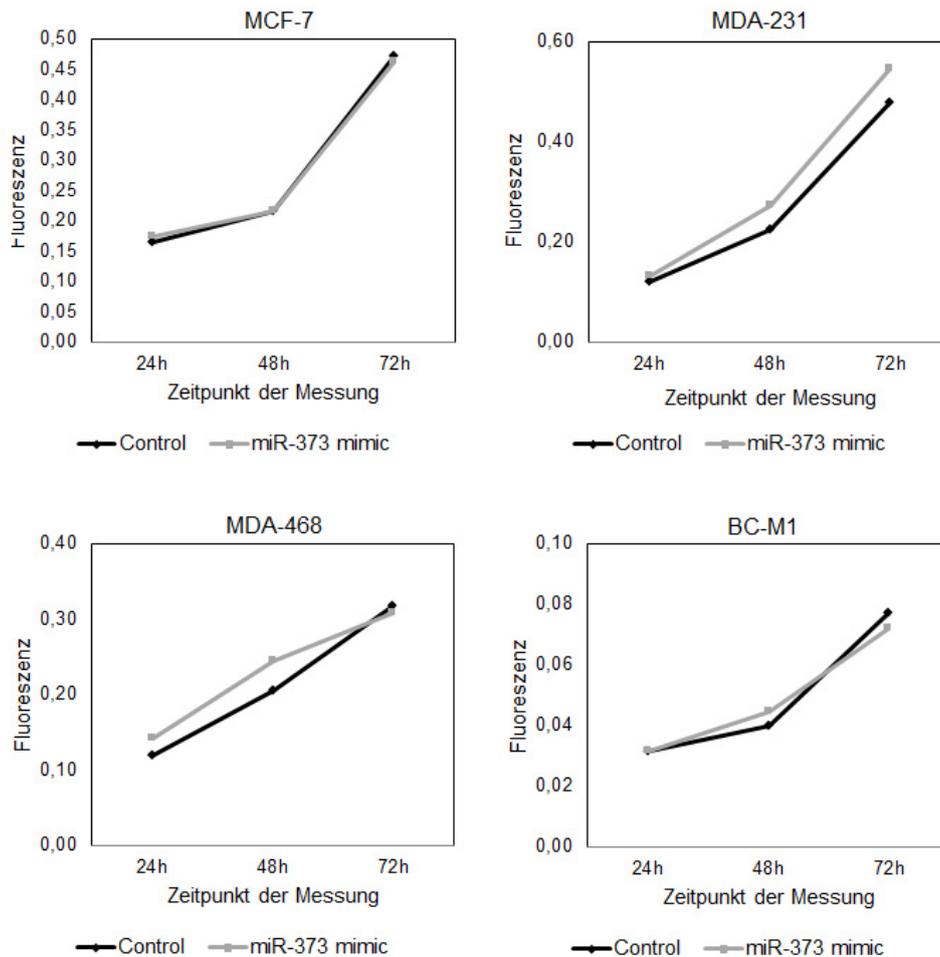


Abbildung 4.15: MiR-373 hat keine Auswirkungen auf die Proliferation von Mammakarzinomzellen. Die Proliferation wurde in miR-373 transfizierten und nicht transfizierten MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB 468 und BC-M1 Mammakarzinomzellen mittels MTT-Analyse 24 Std, 48 Std und 72 Std nach Transfektion gemessen.

4.3 Detektion des Verlustes der Heterozygotität von Tumorsuppressorgenen in fraktionierter, zirkulierender Tumor-DNA

Die Untersuchung des Verlustes der Heterozygotität (LOH, *Loss of Heterozygosity*) könnte als blutbasierter Marker tumorspezifische Informationen liefern. Die LOH-Identifikation wird allerdings durch schlechte Qualität und geringe Quantität der tumorspezifischen DNA sowie der Verunreinigung mit normaler DNA erschwert. Um die Detektion von LOH zu verbessern, wurden die Plasmaproben von Mammakarzinompatientinnen der SUCCESS-Studie in hoch- und niedermolekulare DNA fraktioniert.

4.3.1 Patientenkollektiv der SUCCESS Studie

Bei der SUCCESS Studie handelt es sich um eine multizentrische, prospektiv, randomisierte Phase III Studie, in die Frauen mit histologisch nachgewiesenem invasivem Mammakarzinom (pT1-4, pN0-3, M0) eingeschlossen wurden. Die Patientinnen wurden mit drei Zyklen FEC-Chemotherapie (Epirubicin, Fluorouracil, Cyclophosphamid) und anschließend drei Zyklen Docetaxel oder drei Zyklen Gemcitabine in Kombination mit Docetaxel behandelt und das Rezidiv-freie Überleben in den beiden Behandlungsgruppen verglichen. Nach der Chemotherapie wurden die Patientinnen für 2 oder 5 Jahre mit Zoledronat behandelt. Bei einem positiven ER-Status wurde eine endokrine Therapie verabreicht.

Aus dieser Studie wurden 388 Patientinnen, basierend auf ihrem HER2-Status ausgewählt, unter Berücksichtigung einer gleichmäßigen Verteilung des ER-, PR-, Lymphknotenstatus und Tumorstadiums (Abb. 4.16). 55% der Patientinnen waren HER2-negativ, 71% hatten Lymphknotenmetastasen, 74% hatten das Tumorstadium 1 oder 2 und ungefähr die Hälfte den histopathologischen Grad 3. Auf Grund der selektiven Auswahl der Proben ist die SUCCESS Studie nicht repräsentiert [223]. Das Plasma stammt von Patientinnen, deren Operation 1-2 Monate zurücklag, aber die noch keine Chemotherapie erhalten hatten und von 30 Patientinnen nach einer Chemotherapie. Die Nachbeobachtungszeit betrug im Median 2,5 Jahre (von 2 Monaten bis 4,5 Jah-

re). Tabelle 4.6 fasst die klinischen und histopathologischen Daten der Patientinnen zusammen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Plasmaproben von 72 der 388 Patientinnen auf LOH untersucht.

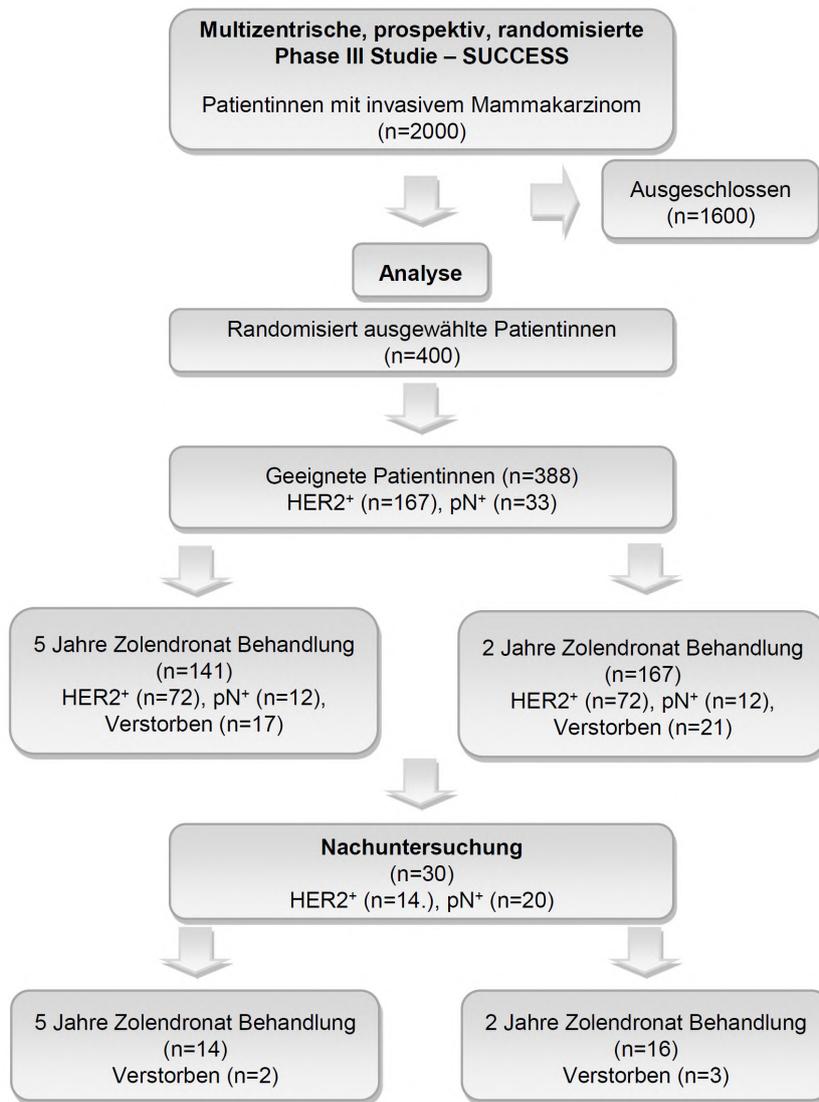


Abbildung 4.16: Übersicht der aus der SUCCESS Studie ausgewählten und analysierten Patientinnen.

Tabelle 4.6: Beziehung zwischen dem Verlust der Heterozygosität an acht verschiedenen Markern in den beiden Plasma DNA-Fraktionen und den klinischen und histopathologischen Parametern.

Parameter	Patienten n (%)	D3S1605 n (%) Inf.	D10S1765 n (%) Inf.	D11S4200 n (%) Inf.	D12S1660 n (%) Inf.	D12S1725 n (%) Inf.	D13S218 n (%) Inf.	D16S421 n (%) Inf.	D17S855 n (%) Inf.
Gesamt	388 (100)								
Alter	56 Jahre (von 26 bis 75 Jahre)								
Histologie									
Duktal	256 (67)	10 (5) 186	22 (10) 227	19 (11) 180	35 (18) 196	33 (16) 203	13 (8) 161	26 (19) 137	22 (11) 198
Lobulär	61 (16)	2 (5) 39	11 (21) 52	6 (13) 48	10 (22) 45	11 (23) 48	7 (19) 37	7 (23) 30	9 (18) 49
Andere	67 (17)	3 (6) 50	7 (12) 59	8 (14) 56	6 (12) 51	3 (6) 52	5 (15) 34	4 (11) 37	2 (4) 52
Tumorstadium									
pT1-2	283 (74)	7 (3) 211	19 (8) 249	21 (10) 212	35 (16) 215	21 (9) 228	13 (8) 169	26 (17) 156	21 (10) 218
pT3-4	100 (26)	8 (13) 63	20 (23) 88	11 (16) 71	16 (21) 76	25 (34) 74	12 (19) 63	11 (23) 48	12 (15) 81
Lymphknotenmetastasen									
Negativ	110 (29)	0 (0) 80	7 (7) 98	11 (13) 88	16 (21) 75	8 (9) 90	7 (10) 69	12 (19) 63	12 (14) 86
Positiv	273 (71)	15 (8) 194	33 (14) 239	22 (11) 195	35 (16) 217	39 (18) 212	18 (11) 163	25 (18) 141	21 (10) 212
Graduierung									
1,2	199 (52)	6 (4) 139	21 (12) 172	18 (13) 144	26 (18) 147	28 (18) 153	14 (11) 127	22 (21) 106	21 (14) 152
3	185 (48)	9 (7) 134	19 (12) 165	15 (11) 139	25 (17) 144	19 (13) 149	10 (10) 103	15 (15) 98	12 (8) 145
Estrogen-Rezeptor									
Negativ	116 (30)	3 (4) 83	10 (10) 103	10 (11) 89	15 (17) 86	10 (11) 88	8 (11) 70	11 (17) 66	7 (7) 96
Positiv	268 (70)	12 (6) 192	30 (13) 235	23 (12) 195	36 (18) 206	37 (17) 215	17 (11) 162	26 (19) 138	26 (13) 203
Progesteron-Rezeptor									
Negativ	149 (39)	1 (1) 105	16 (12) 135	11 (10) 115	19 (17) 113	15 (13) 116	9 (10) 90	14 (16) 89	12 (10) 123
Positiv	235 (61)	14 (8) 170	24 (12) 203	22 (13) 169	32 (18) 179	32 (17) 187	16 (11) 142	23 (20) 115	21 (12) 176
HER2-Rezeptor									
Negativ	204 (55)	5 (5) 111	20 (14) 147	15 (12) 122	24 (19) 124	28 (21) 135	13 (11) 115	17 (19) 92	22 (17) 130
Positiv	167 (45)	10 (7) 155	19 (11) 179	18 (12) 154	26 (17) 158	16 (10) 157	12 (11) 110	18 (17) 105	9 (6) 157

Abkürzungen: n, Anzahl; Inf, Informative Fälle; HER2, *Human Epiderman Growth Factor Receptor 2*

4.3.2 Quantifizierung zellfreier DNA im Plasma

Um die Detektionsrate des Verlustes der Heterozygotie in zellfreier Plasma-DNA zu verbessern, wurde DNA über zwei unterschiedliche Säulen aufgereinigt (3.3.1). Die durch das Qiagen-Kit isolierte DNA ist hauptsächlich hochmolekular und enthält große DNA-Fragmente. Die durch das Promega-Kit gereinigte DNA ist hingegen niedrigmolekular und enthält kurze DNA-Fragmente. Die Fraktionierung wurde durch Hinzufügen eines DNA-Markers zu einer Plasma Probe und durch die Auftrennung auf einem Agarosegel bestätigt (Abb. 4.17).

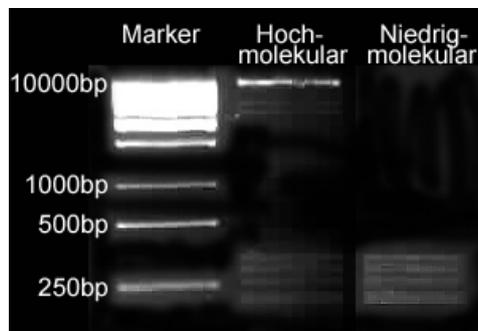


Abbildung 4.17: Agarosegelelektrophorese der hoch- und niedrigmolekularen DNA-Fraktion aus Plasma. Der GeneRuler™ 1kb DNA-Marker wurde zur Verifizierung der Fraktionierung der DNA einer Plasmaprobe zugefügt. Nach der Aufreinigung mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (hochmolekulare Fraktion) und dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (niedrigmolekulare Fraktion) wurden die Eluate agarosegelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die spektrophotometrische Quantifizierung der DNA zeigte in beiden Fraktionen eine große Spanne an DNA-Konzentrationen. Die hochmolekulare DNA variierte zwischen 40 und 6030 ng/ml Plasma, mit einem Median von 139ng/ml. In der niedrigmolekularen DNA-Fraktion lagen die Konzentrationen zwischen 45 und 1510 ng/ml mit einem Median von 81 ng/ml. Die DNA-Konzentrationen waren unabhängig vom Alter der Patientinnen.

4.3.3 Der Verlust der Heterozygosität in der niedrigmolekularen DNA-Fraktion und der hochmolekularen Fraktion im Plasma

Der Verlust der Heterozygosität wurde an acht Markern, die auf verschiedenen chromosomalen Loci liegen, mittels PCR-basierender Fluoreszenz-Mikrosatellitenanalyse bestimmt (Tabelle 4.7). Die Tumorspezifität der Marker wurde in gesunden Frauen getestet, bei denen LOH an keinem dieser Marker detektiert wurde. LOH wurde durch die Division des Verhältnisses der Intensität der beiden Allele aus der Plasma Probe durch das Verhältniss der Intensität der beiden Allele aus den korrespondierenden Leukozyten, die als Referenz eingesetzt wurden, ermittelt (Abb. 4.18A). Liegt der Quotient unter 0,6 oder über 1,67 handelt es sich um LOH. Nicht analysierbare und homozygote Proben wurden als nicht-informative Fälle gezählt (Abb. 4.18B).

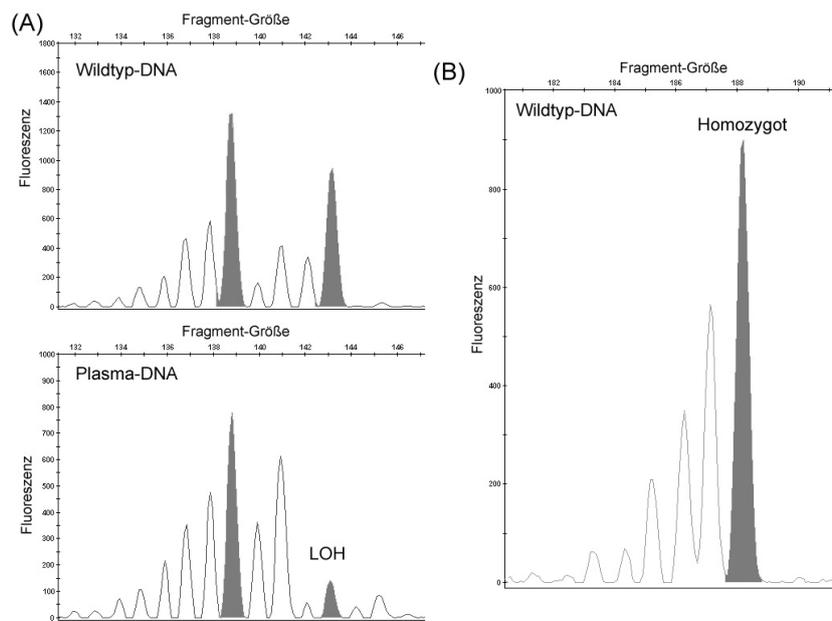


Abbildung 4.18: Fluoreszenz-markierte PCR-Produkte, die durch kapillare Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Gezeigt sind die PCR Produkte an einem Marker nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und Analyse mit der Gene Mapper Software. Die Abszisse gibt die Länge des PCR-Produkts und die Ordinate die Intensität der Fluoreszenz an. (A) Von einer Patientin ist exemplarisch die heterozygote Wildtyp-DNA aus Leukozyten und die Plasma-DNA mit LOH dargestellt. (B) An einem anderen Marker liegt ein homozygoten Signal vor, wodurch der Fall als nicht-informativ zählt.

Um den Anteil der tumorspezifischen DNA im Plasma zu ermitteln, wurden serielle Verdünnungsexperimente durchgeführt. Plasma-DNA mit nachgewiesenem LOH (10, 9, 8, 6, 4, 2 und 0 ng) wurde mit steigenden Konzentrationen von Wildtyp-DNA aus Leukozyten bis zu einer Gesamtmenge von 10 ng gemischt und anschließend mittels PCR amplifiziert. Die Abbildung 4.19 zeigt exemplarisch für die Marker D10S1765 und D13S218 die Verdünnungsreihe der hoch- und niedrigmolekularen Fraktionen. Der Grenzwert von 0,6, ab dem der Verlust der Heterozygosität am Marker D10S1765 in beiden Fraktionen und am Marker D13S218 in der niedrigmolekularen Fraktion nicht mehr detektiert werden kann, wurde vorwiegend bei einer Mischung von 90% Plasma-DNA and 10% Wildtyp-DNA erreicht. Bei dem Marker D13S218 wurde der Grenzwert in der hochmolekularen-DNA erst bei einem Verhältnis von 80% Plasma-DNA and 20% Wildtyp-DNA erreicht.

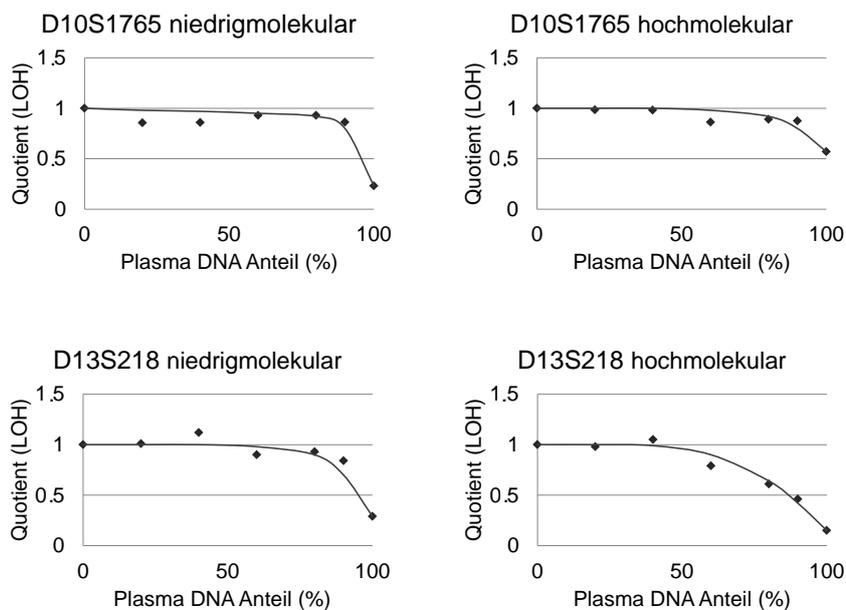


Abbildung 4.19: Verdünnungsreihe der Plasma-DNA mit Wildtyp-DNA aus Leukozyten.

Das Diagramm zeigt unterschiedliche Verdünnungen von hochmolekularer- und niedrigmolekularer DNA, in der LOH nachgewiesen wurde, mit Wildtyp-DNA aus Leukozyten, an den Markern D10S1765 und D13S218. LOH wurde ab einem Quotienten von unter 0,6 bestimmt. Bei einer Mischung von 90% Plasma-DNA and 10% Wildtyp-DNA erfolgte der Wechsel von LOH zu Heterozygosität am Marker D10S1765 in beiden Fraktionen und am Marker D13S218 in der niedrigmolekularen Fraktion. In der hochmolekularen-DNA Fraktion des Markers D13S218 erfolgte der Wechsel bei einem Verhältnis von 80% Plasma-DNA and 20% Wildtyp-DNA.

Die Analysen ergaben, dass bei den Patientinnen LOH an einem oder mehreren Markern signifikant öfter in der Fraktion der niedrigmolekularen DNA (in 38% der Proben) als in der hochmolekularen DNA (28%, $P = 0.0001$) nachgewiesen werden konnte. Auch die Gesamtzahl der detektierten LOH war mit 11% in der Fraktion, die die kurzen DNA-Fragmente enthält, höher als in der Fraktion mit den langen DNA-Fragmenten (7%). In der Abbildung 4.20 wird die Verteilung der Verluste der Heterozygotität an den acht Markern in den beiden Fraktionen und ihrer Kombination dargestellt. Mit der Ausnahme des Markers D13S218 war die LOH-Häufigkeit höher in der niedrigmolekularen als in der hochmolekularen DNA Fraktion. Mit Hilfe des Wilcoxon Tests wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Fraktionen für die Marker D10S1765 ($P=0,003$), D12S1660 ($P=0,0001$), D12S1725 ($P=0,068$), und D16S421 ($P=0,009$, Abb. 4.20) berechnet. Interessanterweise betraf die Übereinstimmung der LOH-Profile an den Markern nur 32,85%, was zeigt, dass in den meisten Fällen LOH aus einer Fraktion nicht in der korrespondierenden anderen Fraktion nachgewiesen werden konnte. Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die DNA Fraktionierung die Detektionsrate des Verlustes der Heterozygotität verbessert.

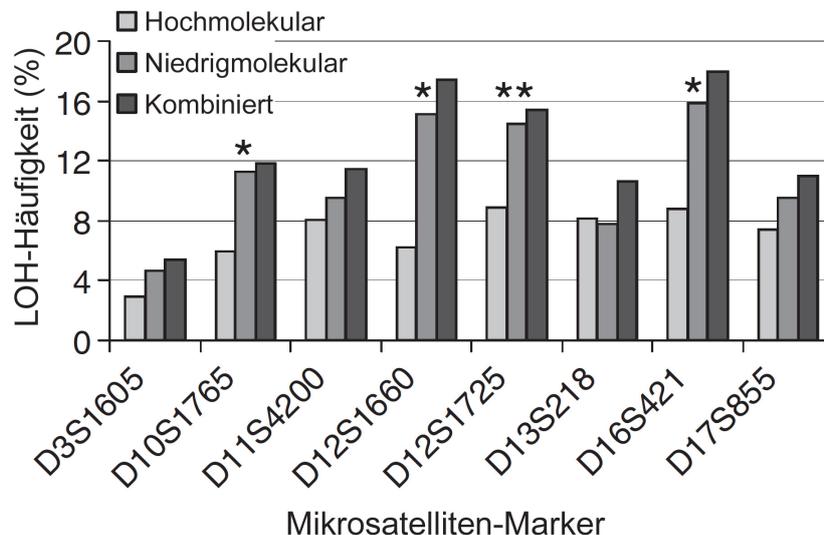


Abbildung 4.20: Vergleich der LOH-Häufigkeiten in Mammakarzinompatientinnen an acht verschiedenen Mikrosatellitenmarkern in den hoch- und niedrigmolekularen, sowie den beiden kombinierten Plasma-DNA-Fractionen. Die LOH-Häufigkeit wurde durch die Division der LOH-Anzahl durch die informativen (LOH und Heterozygotität) Fälle berechnet. Die statistische (*) und die grenzwertige Signifikanz (**) wurden durch den Wilcoxon Test bestimmt: D10S1765, $P=0,003$; D12S1660, $P=0,0001$; D12S1725, $P=0,068$ und D16S421, $P=0,009$.

4.3.4 Häufigkeit des Verlustes der Heterozygotität vor und nach der Chemotherapie

Von 30 Patientinnen waren Plasmaproben vorhanden, die nach der Chemotherapie entnommen wurden. Der Nachweis von LOH wurde an den acht Markern in den Proben vor einer Chemotherapie mit denen nach einer Chemotherapie verglichen. 20 dieser Mammakarzinompatientinnen hatten Lymphknotenmetastasen, ein Rezidiv wurde in 6 Fällen beobachtet und 18 Patientinnen wurden mit einer endokrinen Therapie behandelt. Zusätzlich erhielten 16 Patientinnen Zolendronat für 2 Jahre während 14 Mammakarzinompatientinnen Bisphosphonate für 5 Jahre erhielten.

In der hochmolekularen DNA konnten vor Chemotherapie 15 und nach der Therapie 17 Verluste der Heterozygotität entdeckt werden, wobei nur 3 LOH-Nachweise davor und danach übereinstimmten. In den niedrigmolekularen Fraktionen wurde LOH in 25 Proben vor und 26 nach der Chemotherapie entdeckt, von denen 7 übereinstimmen. Die Marker D11S4200 (*CD44*), D12S1660 (*GLIPR1*), D13S218 (*RB1*) und D16S421 (*E-Cadherin*) zeigten sowohl vor als auch nach der Chemotherapie Verluste der Heterozygotität. In 14 Patientinnen konnte weder vor noch nach der Therapie LOH nachgewiesen werden. In den anderen 16 Patientinnen kam es entweder zu einer erhöhten oder verringerten LOH-Häufigkeit (Abb. 4.21).

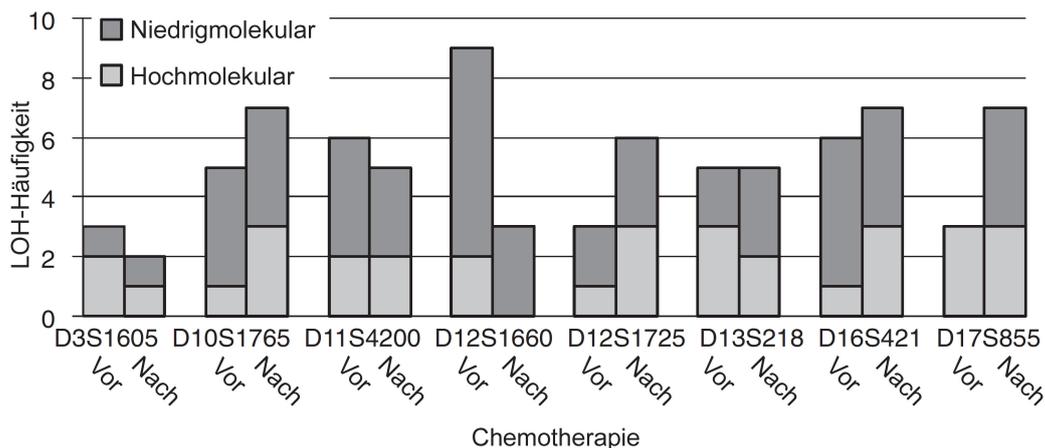


Abbildung 4.21: Vergleich der LOH-Häufigkeit an acht verschiedenen Mikrosatellitenmarkern in den hoch- und niedrigmolekularen Plasma-DNA-Fractionen in Mammakarzinompatientinnen vor und nach einer Chemotherapie. Die LOH-Häufigkeit wurde durch Division der LOH-Anzahl durch die informativen Fälle berechnet.

Die Gruppe war zu klein und die Nachbeobachtungszeit zu kurz, um Assoziationen zwischen den LOH-Frequenzen und den durch die Chemotherapie bedingten Änderungen oder die verschiedenen Behandlungsarme statistisch zu analysieren.

4.3.5 Assoziation des Verlustes der Heterozygotität mit den Risikofaktoren der Mammakarzinompatientinnen

Die statistische Evaluierung von LOH mit den klinischen und histopathologischen Daten erfolgte mit dem Mann-Whitney *U* Test, der für jeden Marker in den beiden Fraktionen und deren Kombination durchgeführt wurde.

In Tabelle 4.7 sind die signifikanten P-Werte ($P \leq 0,5$) für die Assoziationen zwischen LOH und den Risikofaktoren zusammengefasst. Erhöhte LOH-Nachweise an fünf (D3S1605, D10S1765, D12S1725, D13S218 und D17S855) Markern korrelierte mit dem Tumorstadium, der Tumorgröße, Lymphknotenmetastasen und einem positiven ER- und HER2-Status.

Tabelle 4.7: Zusammenfassung der Korrelationen zwischen den Marker-spezifischen Verlusten der Heterozygotität und den klinisch-pathologischen Parametern der Patientinnen, die durch den Mann-Whitney *U* Test ermittelt wurden.

Mikrosatelliten-Marker			P-Werte				
Marker und Fraktion	Genort	Genprodukt	pT	pN	PR ⁺	HER2 ⁺	Gesamtüberleben
D3S1605 H	3q25.31-32	TIG1	0,008	0,066	0,129	-	-
D3S1605 N			0,082	0,056	0,01	-	-
D3S1605 K			0,004	0,011	0,01	-	-
D10S1765 H	10q23.3	PTEN	0,0001	-	-	-	-
D10S1765 N			0,004	-	-	-	-
D10S1765 K			0,0001	-	-	-	-
D11S4200 H	11p13	CD44	-	-	-	-	-
D11S4200 N			-	-	-	-	-
D11S4200 K			-	-	-	-	-
D12S1660 H	12q21.2	GLIPR1	-	-	-	-	-
D12S1660 N			-	-	-	-	-
D12S1660 K			-	-	-	-	-
D12S1725 H	12p13.32	Cyclin D2	0,003	0,375	-	0,219	0,176
D12S1725 N			0,0001	0,014	-	0,028	0,007
D12S1725 K			0,0001	0,037	-	0,012	0,004

Tabelle 4.7: - fortgesetzt von vorheriger Seite

Mikrosatelliten-Marker			P-Werte				
Marker und Fraktion	Genort	Genprodukt	pT	pN	PR ⁺	HER2 ⁺	Gesamtüberleben
D13S218 H	13q12-14	RB1	0,002	-	-	-	-
D13S218 N			0,039	-	-	-	-
D13S218 K			0,013	-	-	-	-
D16S421 H	16q22-23	E-Cadherin	-	-	-	-	-
D16S421 N			-	-	-	-	-
D16S421 K			-	-	-	-	-
D17S855 H	17q21	BRCA1	-	-	-	0,170	-
D17S855 N			-	-	-	0,003	-
D17S855 K			-	-	-	0,002	-

Anmerkung: -, kein signifikanter P-Wert; P-Werte $\leq 0,5$ werden als statistisch signifikant betrachtet, bei einem signifikanten P-Wert in einer Fraktion, werden die P-Werte aller Fraktionen angegeben

Abkürzungen: H, hochmolekulare DNA; N, niedrigmolekulare DNA; K, kombinierte Plasma-DNA Fraktion; PR, Progesteron-Rezeptor; ER, Estrogen-Rezeptor; HER2, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*; TIG1, *Tazarotene Induced Gene 1*; PTEN, *Phosphatase and Tensin Homolog*; GLIPR1, *Glioma Pathogenesis-related Protein 1*; RB1, *Retinoblastoma 1*; BRCA1, *Breast cancer 1*.

4.3.6 Prognostischer Nutzen der Detektion des Verlustes der Heterozygotie in zirkulierender, zellfreier DNA

Um den prognostischen Wert der Detektion von LOH im Plasma zu bestimmen, wurden Kaplan-Meier Überlebensanalysen durchgeführt. Die REMARK (*Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies*) Kriterien wurden in die Analyse mit einbezogen [181].

Die Detektion von LOH an dem Marker D12S1725, der in der Nähe von *Cyclin D2* liegt, korrelierte signifikant mit dem Gesamtüberleben der Patientinnen in der niedrigmolekularen DNA ($P=0,007$, Abb. 4.22B) sowie der kombinierten Plasmafraktion ($P=0,004$, Abb. 4.22C). Die Korrelation mit der hochmolekularen Fraktion war nicht signifikant ($P=0,176$, Abb. 4.22A). In den Patientinnen, bei denen LOH an diesem Marker gefunden wurde, betrug das Gesamtüberleben 43 Monate (95% CI (*Confidence Interval*): 27-59) in der hochmolekularen, 41 Monate (95% CI: 29-53) in der niedrigmolekularen und 42 Monate (95% CI: 31-54) in der kombinierten Fraktion. Das entsprechende Gesamtüberleben erhöhte sich in den LOH-freien Patientinnen auf 55 Monate bei langen (95% CI: 52-59) und kurzen (95% CI: 51-59) DNA-Fragmenten und auf 57 Monate

(95% CI: 53-61) in den kombinierten DNA-Fractionen. Der prognostische Wert wurde auch durch die Behandlung mit Zolendronat beeinflusst (hochmolekulare-DNA, $P=0,163$; niedrigmolekulare-DNA, $P=0,01$; kombinierte DNA-Fractionen, $P=0,009$).

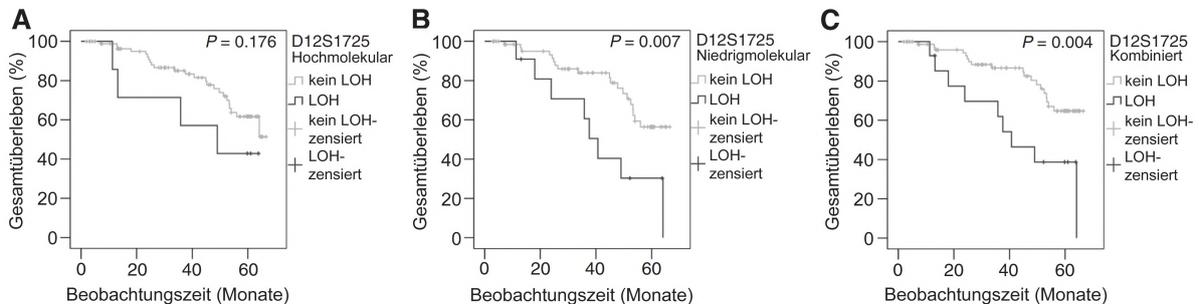


Abbildung 4.22: LOH im Plasma von Mammakarzinompatientinnen an dem Marker D12S1725 korreliert mit dem Gesamtüberleben. Zur Bestimmung des Gesamtüberleben wurden Kaplan-Meier Analysen, basierend auf dem Vorhandensein von LOH am Marker D12S1725, an primären Mammakarzinompatientinnen durchgeführt. Die Abbildung zeigt Überlebenskurven für Patientinnen ohne LOH (obere Kurve) oder mit LOH (untere Kurve) in der hochmolekularen- (A), niedrigmolekularen- (B) oder gesamten DNA Fraktion.

4.4 Epigenetische Untersuchung des MAGE-A1 Promotors

Zusätzlich zu dem Projekt über zirkulierende Nukleinsäuren im Serum von Mammakarzinompatientinnen, wurde in einem Teilprojekt die epigenetischen Regulation des *MAGE-A1* (*Melanoma Antigen Family A*) Gens untersucht. Bei diesen Proteinen handelt es sich um potenzielle Ziele für die Immuntherapie von Karzinomen, da sie außer in Karzinomen nur im Testis und in der Plazenta exprimiert werden. Der *MAGE-A1* Promotor wird häufig an den CpG-Stellen methyliert und dadurch inaktiviert. Die genauen Ursachen für ihre Reaktivierung in Karzinomen sind unbekannt. Da in früheren Versuchen gezeigt wurde, dass Boris (*Brother of Regulator of Imprinted Sites*) die *MAGE-A1* Expression induzieren kann, wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert, ob BORIS in der DNA-Demethylierung des *MAGE-A1* Promotors involviert ist.

MCF-7 Zellen wurden mit einem Boris Expressionsplasmid transfiziert und anschließend durchflusszytometrisch sortiert. Die Spezifität der Sortierung wurde anhand nicht gefärbter Zellen (Abb. 4.23A) und an Zellen, bei denen eine Isotyp-Kontrolle

anstelle des Boris Antikörpers eingesetzt wurde, verifiziert (Abb. 4.23B). Die nicht transfizierten MCF-7 Zellen sind heterogen in der Boris-Expression, da 0,7% dieser Zellen eine erhöhte Boris-Expression hatten (Abb. 4.23C). Es zeigte sich zudem, dass nur 7,4% der transfizierten Zellen positiv für Boris waren (Abb. 4.23D).

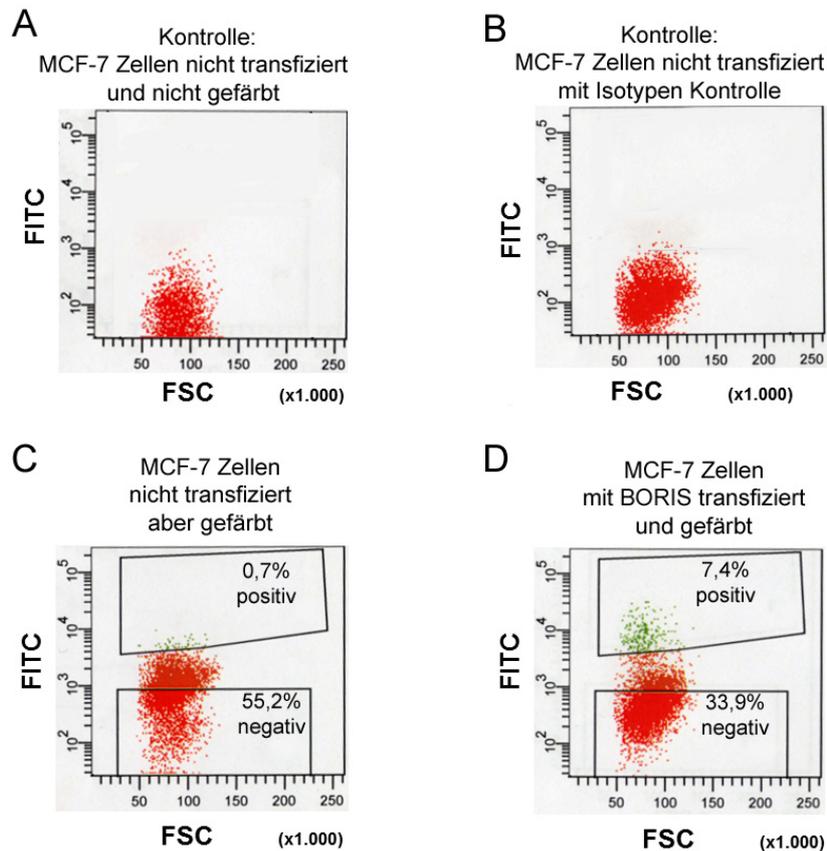


Abbildung 4.23: Durchflusszytometrische Analyse der Boris-Expression in MCF-7 Zellen. MCF-7 Zellen wurden an einem FACS-Aria III durchflusszytometrisch auf ihre Boris-Expression untersucht. Auf der Abszisse wird der *Forward Scatter* (FSC, 1000fach) aufgetragen, der das Zellvolumen wiedergibt. Die Ordinate stellt die Fluoreszenzintensität von Boris durch den FITC-gekoppelten Sekundärantikörper dar. Es wurden (A) nicht transfizierte und nicht gefärbte Zellen, sowie (B) nicht transfizierte und mit einer Isotypen-Kontrolle gefärbte Zellen als Negativkontrolle verwendet. (C) Die mit einem Boris-Antikörper gefärbten nicht transfizierten MCF-7 Zellen haben eine heterogene Boris Population (0,7% positiv und 55,2% negativ). (D) Die mit einem Boris Expressionsplasmid transfizierten und gefärbten Zellen werden gesortet um Boris positive (7,4%) und negative (33,9%) Populationen zu erhalten.

Im nächsten Schritt wurde von nicht sortierten und nicht transfizierten, sowie BORIS transfizierten und nicht sortierten Zellen DNA isoliert. Zusätzlich wurde die DNA von für BORIS negativ und positiv sortierten Zellen isoliert und mit Bisulfit umgewandelt.

Der *MAGE-A1* Promotor der Bisulfit umgewandelten DNA wurde sequenziert und die Methylierung der CpG Stellen ermittelt. Von besonderem Interesse waren dabei die Sequenzen um den Transkriptionsstart, sowie die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Sp-1 und Ets-1, die beide den *MAGE-A1* Promotor aktivieren können. In den nicht transfizierten und nicht sortierten Zellen waren im Schnitt 8-11 CpG Stellen methyliert. MCF-7 Zellen, die mit Boris transfiziert, aber nicht sortiert wurden, hatten 8-10 methylierte CpG Stellen. In transfizierte MCF-7 Zellen, die positiv für Boris sortiert wurden, waren nur noch 5-6 CpGs methyliert. Im Gegensatz dazu, waren in den negativ sortierten Zellen alle untersuchten CpG Stellen methyliert (Abb. 4.24).

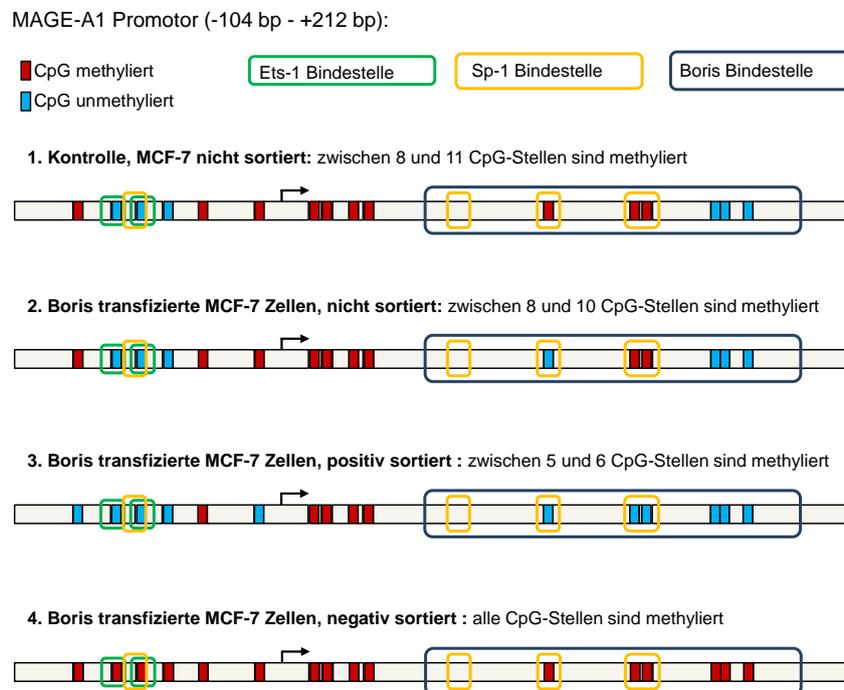


Abbildung 4.24: Epigenetischer Effekt von Boris auf den MAGE-A1 Promotor. Das Schema zeigt den MAGE-A1 Promotor in unterschiedlich behandelten MCF-7 Zellen, die mittels FACS sortiert wurden oder nicht sortiert untersucht wurden. Eingezeichnet ist der Transkriptionsstart (schwarzer Pfeil), sowie die Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1, Sp-1 und Boris. Die methylierten CpG Stellen sind rot und nicht methylierte Stellen blau unterlegt.

5 Diskussion

Das Mammakarzinom ist eine heterogene Erkrankung mit phänotypisch verschiedenen Tumorsubtypen und bedingt die meisten krebsverursachten Todesfälle bei Frauen trotz Fortschritten in der Früherkennung und Behandlung [122]. Eine große Herausforderung bei der Wahl der Therapie liegt in der pathologischen und molekularen Heterogenität des Mammakarzinoms. Die verschiedenen Subtypen zeigen sowohl klinische, als auch biologische, ein unterschiedliches Verhalten. Für eine optimale, individuelle Behandlung ist daher die Suche nach molekularen Markern zur genauen Klassifizierung des Tumors äußerst wichtig [52]. Um invasive Eingriffe bei Gewebebiopsien und Feinnadelaspirationen zu umgehen, liegt der Fokus auf Blut-basierenden Markern, die sich als „flüssige Biopsie“ eignen könnten.

Klinische und funktionelle Studien zeigen, dass die geänderten Expressionen bestimmter Gene mit der Tumorprogression und der metastatischen Rekurrenz der Tumorpatienten korrelieren. Die genaue Regulation, die eine solche geänderte Genexpression bewirkt, ist jedoch weitgehend unbekannt. MikroRNAs (miRs) könnten attraktive Tumor- und Metastasenmarker werden, weil sie posttranskriptionell die Expression spezifischer tumorassoziierter Gene reprimieren.

Auf Grund der aktuellen Erkenntnisse zur Stabilität der miRs im Blut und ihrer vielfältigen Aufgaben in der Karzinogenese, liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Quantifizierung von miRs im Serum von Mammakarzinompatientinnen und der Evaluation ihrer Eignung als diagnostischer und prognostischer Blut-basierter Tumormarker.

5.1 Die Serumkonzentrationen der zirkulierenden, zellfreien mikroRNAs miR-17, miR-34a, miR-155 und miR-373 sind in der Mammakarzinomentwicklung und -Progression verändert

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurden die relativen Serumkonzentrationen von sechs mikroRNAs miR-10b, miR-17, miR-34a, miR-93, miR-155 und miR-373 mittels *Real-Time* PCR bestimmt. Diese Quantifizierung wurde durchgeführt, um die Unterschiede der miRs zwischen gesunden Frauen und postoperativen Mammakarzinompatientinnen zu evaluieren. Von besonderem Interesse war es, zu ermitteln, ob die relativen Konzentrationen der miRs mit den verschiedenen Subtypen des heterogenen Mammakarzinoms assoziiert sind.

Zunächst wurde eine geeignete endogene Kontrolle zur Normalisierung der miR-Werte gesucht. Die miR-16 Konzentrationen waren in dem hier untersuchten Kollektiv zwischen gesunden Frauen und Patientinnen mit einem primären und metastasierten Mammakarzinom ähnlich. Auch in weiteren Studien wurde eine gleichmäßige Expression dieser miR gefunden, die ihre Verwendung als endogene Kontrolle unterstützen [289, 235].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Anstieg der zirkulierenden miR-34a, miR-93 und miR-373 Konzentrationen im Serum von postoperativen Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen gefunden, was auf das diagnostische Potential dieser miRs hinweist. MiR-17 und miR-155 wiesen im Gegensatz dazu keine Unterschiede in ihren Transkriptmengen zwischen gesunden Frauen und Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom (M0) auf. Ihre Konzentrationen waren hingegen wesentlich geringer bei Patientinnen mit Metastasen (M1). Des Weiteren konnte eine Assoziation des Estrogen- und Progesteron-Rezeptors (ER, PR), deren Expressionsprofil für die molekulare Klassifizierung des Mammakarzinoms verwendet wird, mit den zirkulierenden miR-17 und miR-34a detektiert werden. Die zellfreien miR-373 Konzentrationen waren dagegen mit dem HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*) Status der Mammakarzinome assoziiert.

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass miR-373, welche die Invasion und Metastasierung des Mammakarzinoms fördern kann [108], besonders vielversprechend war. Die miR-373 Konzentrationen waren im Serum der M0 und M1 Patientinnen signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Frauen, in

denen die Transkriptmengen äußerst gering waren. Das deutet auf einen tumorspezifischen Anstieg der miR-373 Level hin. Es wurde gezeigt, dass miR-373 die mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycin*) und SIRT1 Proteinexpression inhibiert und dadurch zu einer erhöhten Synthese von Matrix-Metalloproteinasen und zur Migration sowie zum Wachstum von Fibrosarkomazellen führt [163]. Zudem konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die CD44 Proteinmenge durch miR-373 in Brustadenokarzinomzellen und mikrometastatischen Mammakarzinomzelllinien verringert wurde. CD44 ist der Zelloberflächenrezeptor der Hyaluronsäure [118]. Für die Untersuchungen war die mikrometastatische Zelllinie BC-M1 deshalb von Bedeutung, da sie aus den disseminierten Tumorzellen des Knochenmarks einer Mammakarzinompatientin entwickelt wurde [205]. Ihre Invasivität wurde durch die konstitutive Expression mehrerer Adhäsionsmoleküle, die charakteristisch für die Metastasierung sind, belegt [221]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit über den tumorspezifischen Anstieg von miR-373 wurden durch Huang und Kollegen bestätigt, in deren Studie eine erhöhte miR-373 Konzentration in metastatischen Mammakarzinomproben invers mit der CD44 Expression korrelierte [108]. Bezüglich der CD44 Expression während der Metastasierung des Mammakarzinoms gibt es allerdings diskrepante Daten. Der Verlust von *CD44* wurde mit der Induktion von Lungenmetastasen assoziiert [164], was vermuten lässt, dass die durch miR-373 verursachte Verringerung der CD44 Proteinmenge zu Metastasen führen könnte. Im Gegensatz dazu korrelierte das Vorhandensein von CD44 und damit die Fähigkeit, die Hyaluronsäure zu binden und die Matrix-Metalloproteinase 9 zu relokalisieren, mit der Tumorinvasion und Metastasierung [209].

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten Serumkonzentrationen von miR-373 waren deutlich höher bei HER2-negativen als HER2-positiven Mammakarzinompatientinnen. Patientinnen mit einem HER2-negativen Karzinom sind resistent gegenüber den HER2-gerichteten Therapieansätzen und haben somit, vor allem bei den *triple negative*-Karzinomen, eine schlechtere Prognose als HER2-positive Mammakarzinompatientinnen [50]. Die HER2-positiven Mammatumore wachsen jedoch schneller als die HER2-negativen Karzinome [46]. Es wurde beschrieben, dass in HER2-positiven Mammakarzinomen hohe CD44 Serumkonzentrationen signifikant das Gesamtüberleben der Patientinnen beeinflussen können [9]. Die verringerten miR-373 Transkriptmengen im Serum der in der vorliegenden Arbeit untersuchten HER2-positiven Patientinnen könnten zu hohen CD44 Serumwerten bei HER2-positiven Patientinnen

führen. Auf Grund der geringen Anzahl der HER2-positiven Mammakarzinompatientinnen in dieser Studie, war eine statistische Evaluierung des Einflusses der miR-373 auf das Gesamtüberleben der Patientinnen nicht angemessen.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit für miR-10b eine inverse Korrelation mit dem HER2-Status nachgewiesen werden, die jedoch weniger ausgeprägt war als für miR-373. Erstaunlicherweise gab es keine weiteren Assoziationen der zirkulierenden miR-10b Transkriptmengen mit den klinischen und pathologischen Risikofaktoren. Dies steht im Kontrast zu den vorausgegangenen Daten der Arbeitsgruppe, in der diese Arbeit durchgeführt wurde [235]. Sie zeigte, dass erhöhte Serumkonzentrationen der zirkulierenden miR-10b mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen assoziiert war. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz liegt in den unterschiedlichen Patientinnenkohorten der beiden Studien. In den vorherigen Analysen wurden Mammakarzinompatientinnen mit Metastasen am Ende einer Chemotherapie untersucht und in der vorliegenden Arbeit handelte es sich um metastasierte Patientinnen, die noch keine Chemotherapie erhalten hatten. Auf Grund dieser Beobachtungen und der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, die zeigten, dass bei ER⁺/PR⁺ Mammakarzinompatientinnen nach einer Chemotherapie die miR-10b Werte leicht ansteigen, wäre es möglich, dass die zytotoxische Therapie die zirkulierenden miR-10b Konzentrationen beeinflusst. Die Daten der vorliegenden Arbeit bezüglich miR-10b stehen auch in Kontrast zu der Studie von Ma et al., in der gezeigt wurde, dass Patientinnen mit Metastasen erhöhte miR-10b Transkriptmengen aufwiesen. Diese Analysen wurden allerdings mit Tumorgewebeproben durchgeführt [171].

In den Analysen über die miR-155 Serumkonzentrationen, wurden signifikant niedrigere Werte bei Patientinnen mit Fernmetastasen als mit einem lokalisierten Mammakarzinom detektiert. Die geringen miR-155 Transkriptmengen werden möglicherweise durch die Promotor DNA-Methylierung des miR-155 Gens verursacht. Das Demethylierungsagens 5'-Aza-2'-Deoxycytidin konnte die miR-155 Expression in der hoch metastatischen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231, aber nicht in der gering metastatischen Zelllinie MCF-7, induzieren und somit den miR-155 Promotor demethylieren. Obwohl es keinen signifikanten Unterschied der miR-155 Konzentrationen zwischen gesunden Frauen und M0 Patientinnen gab und die Expression dieser miR nicht tumorspezifisch reguliert war, scheint miR-155 mit der Tumorprogression assoziiert zu sein. Ihre Assoziation mit fortgeschrittenen Karzinomen passt zu der Beobachtung, dass die miR an der EMT (Epitheliale-Mesenchymale Transition), einem

wichtigen Schritt in der Tumormetastasierung, beteiligt ist [217]. Es wurde gezeigt, dass miR-155 die Expression von Genen inhibiert, deren Proteinprodukte die EMT induzieren. Folglich konnte eine stabile miR-155 Überexpression signifikant die EMT in Mammakarzinomzelllinien inhibieren [318]. Für miR-155 wurde auch eine Assoziation mit der PR-Expression gefunden. Frauen mit einem PR-positiven Mammakarzinom hatten signifikant höhere zellfreie miR-155 Konzentrationen als Frauen mit einem PR-negativen Karzinom [332]. In dem hier untersuchten Kollektiv wurde eine solche Korrelation nicht gefunden, was durch das relativ kleine Kollektiv, das in der anderen Studie untersucht wurde, erklärt werden könnte [332]. Des Weiteren wurden im Gewebe von Mammakarzinompatientinnen erhöhte miR-155 Konzentrationen detektiert, verglichen mit gesundem Brustgewebe [117, 296, 300]. Die zirkulierenden miR-155 Transkriptmengen in der vorliegenden Arbeit sind dagegen bei Mammakarzinompatientinnen nicht signifikant höher. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass postoperative Proben untersucht wurden.

Darüber hinaus waren in der vorliegenden Arbeit die Serumkonzentrationen der miR-17 nicht tumorspezifisch verändert, aber signifikant niedriger bei Patientinnen mit Fernmetastasen. MiR-17 liegt im chromosomalen miR-17-92 Cluster, für das eine anti-invasive Funktion beschrieben wurde, die die Invasion und Metastasierung des Mammakarzinoms inhibiert. In hoch-invasiven Mammakarzinomzelllinien und Gewebeproben von Patientinnen mit Lymphknotenmetastasen war die Expression des miR-17-92 Clusters reduziert [324]. Diese Ergebnisse, die die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten unterstützen, lassen vermuten, dass die Verringerung der miR-17 Konzentration eine Rolle bei Metastasen spielt.

Die Untersuchungen der Serumproben in Bezug auf die Hormonrezeptoren ER und PR zeigten eine verringerte miR-17 Expression in ER⁺/PR⁺ Karzinomen und eine erhöhte miR-34a Konzentration in ER⁻, sowie ER⁻/PR⁻ Tumoren. Der Hormonrezeptorstatus ist essentiell bei der molekularen Einteilung der Mammakarzinome und in diesem Zusammenhang ein prognostischer und prädiktiver Marker. Die ER⁻/PR⁻ Karzinome repräsentieren ungefähr 30% der Brusttumore. Der Krankheitsverlauf ist gewöhnlich aggressiver, da diese Tumore hormonunabhängig und meist undifferenzierter mit einer höheren histologischen Graduierung sind [242]. Die Beobachtung der vorliegenden Arbeit über die Assoziation von miR-17 und miR-34a mit den Hormonrezeptoren unterstreicht, dass ihre veränderten Expressionslevel unterschiedliche Subtypen des Mammakarzinoms reflektieren können.

Die miR-34a Konzentrationen waren zudem höher bei Patientinnen mit einem primären Mammakarzinom als bei gesunden Frauen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse stehen wiederum im Widerspruch zu den vorherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe, die zeigten, dass die zirkulierenden miR-34a Transkriptmengen nicht signifikant verschieden zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen waren [235]. Auch in Gewebeproben wurde eine heterogene Expression dieser miR beschrieben. Es wurden sowohl höhere [211] als auch niedrigere [160] miR-34a Konzentrationen bei Mammakarzinompatientinnen entdeckt. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten höheren Konzentration der zirkulierenden miR-93 im Serum von Mammakarzinompatientinnen wurden jedoch durch die Literatur bestätigt, in der miR-93 als Onkomir beschrieben wird [69].

In der vorliegenden Studie waren mit Ausnahme der zirkulierenden miR-10b und miR-373 die Serumkonzentrationen der miR-17, miR-34a, miR-93 und miR-155 alle signifikant höher bei ER⁺/PR⁺ Patientinnen nach einer Chemotherapie im Vergleich zu Patientinnen vor einer Chemotherapie. Auch die miR-10b Konzentrationen wiesen erhöhte, allerdings nicht signifikante Transkriptmengen nach einer Chemotherapie auf. Die Konzentrationen der miR-17, miR-34a, miR-93 und miR-155 bei ER⁺/PR⁺ Patientinnen waren vor der Chemotherapie ähnlich denen von gesunden Frauen. Daher wäre es möglich, dass die Steigerung in den Messwerten auf die erhöhte Zelltodesrate, die durch die Chemotherapie verursacht wird, zurückzuführen ist. Für die zirkulierende miR-373, deren Serumkonzentrationen als einzige miR vor der Chemotherapie signifikant erhöht waren, sind die detektierten Transkriptmengen nach der Chemotherapie geringer. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die zelluläre miR-373 überwiegend bei ER⁺/PR⁺ Karzinomen in die Blutzirkulation abgegeben wird. Nach dem Absterben eines großen Teils der Tumorzellen hört die kontinuierliche Sekretion auf, wodurch nach der Chemotherapie nur noch die Restmengen detektiert werden können. Allerdings sind weitere Analysen mit einem größeren Kollektiv notwendig, um diese Vermutung zu belegen. Zudem wäre es interessant, die prognostische Relevanz der miRs auf das Ansprechen einer Chemotherapie zu ermitteln, was auf Grund der geringen Patientenzahl hier nicht statistisch evaluiert werden konnte.

Das Fazit dieses Teils der vorliegenden Arbeit ist, dass spezifische miRs als potenzielle Blut-basierte Biomarker eine Rolle in der Entwicklung und Progression des Mammakarzinoms spielen könnten. Weitere Analysen in präoperativen Serumproben, insbesondere der vielversprechenden miR-373, sind notwendig und wurden im zweiten Teil der Arbeit durchgeführt.

5.2 Die exosomalen miR-373 Serumkonzentrationen sind in basal-ähnlichen sowie Estrogen- und Progesteron-Rezeptor-negativen Mammakarzinompatientinnen erhöht

In den Analysen der postoperativen Mammakarzinompatientinnen des Kollektivs der MARIE-Studie ist besonders die zirkulierende miR-373 aufgefallen, deren relative Konzentrationen im postoperativen Serum der Mammakarzinompatientinnen und der Gruppe der HER2-negativen Patientinnen signifikant erhöht waren. Die Daten weisen auf das diagnostische Potential der miR-373 hin. Sie liegt in einem Cluster mit der miR-371 und miR-372. Um mehr über die Expression des Cluster zu erfahren, wurden die Serumkonzentrationen aller drei miRs in diesem Teil der vorliegenden Arbeit untersucht. Des Weiteren gab es eine aktuelle Studie, in der eine wichtige Rolle der miR-101 im Estrogen-unabhängigen Wachstum von Mammakarzinomen postuliert wurde [239]. Deshalb wurden die miR-371, miR-372, miR-373 und miR-101 in präoperativen Serumproben von Patientinnen mit einem invasivem Mammakarzinom, Patientinnen mit einer benignen Brustkrankung und gesunden Frauen mittels *Real-Time* PCR detektiert. Die Konzentrationen dieser miRs wurden zudem in den zirkulierenden Exosomen bestimmt.

Die zellfreien miR-101 und miR-373 Serumkonzentrationen unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit signifikant zwischen Patientinnen mit einem Mammakarzinom und einer gutartigen Brustkrankung, was ein diagnostisches Potential der miRs andeutet. Obwohl die zellfreien miR-101 Transkriptmengen höher bei Mammakarzinompatientinnen als bei gesunden Frauen waren, korrelierten ihre Serumkonzentrationen negativ mit dem Lymphknotenstatus. Geringere zirkulierende miR-101 Serumlevel sind somit vermutlich mit Lymphknotenmetastasen assoziiert und ein Anstieg in den Serumkonzentrationen spielt eher eine Rolle in nicht-fortgeschrittenen Tumoren. Des Weiteren wurde miR-373 im Plasma von Mammakarzinompatientinnen

als Marker für Lymphknotenmetastasen beschrieben [35]. Allerdings wurde beobachtet, dass die miR Quantifizierung von den Plasma-Komponenten beeinflusst werden könnten [129]. Im Rahmen dieser Arbeit, in der Serum als Ausgangsmaterial diente, wurde keine solche Assoziation der zirkulierenden miR-373 mit Lymphknotenmetastasen gefunden.

Obwohl miR-371, miR-372 und miR-373 alle im gleichen Cluster liegen, konnte miR-371 nicht im Serum nachgewiesen werden und in den zirkulierenden miR-372 Transkriptmengen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den benignen und malignen Mammakarzinompatientinnen detektiert. Interessant ist, dass die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen, relativen exosomalen miR-101, miR-372 und miR-373 Konzentrationen höher waren als die zellfreien Werte im gesamten Serum. Daher kann vermutet werden, dass die miR-101, miR-372 und miR-373, im Gegensatz zu ihren endogenen Kontroll-miRs (miR-16 und miR-484), vorwiegend in Exosomen im Blut zirkulieren. In den Exosomen waren die zirkulierenden miR-101 und miR-372 Mengen tumorspezifisch bei Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu gesunden Frauen erhöht. Für miR-101 konnte somit in der gesamten zellfreien und der exosomalen Fraktion ein tumorspezifischer Anstieg beobachtet werden. Die Daten für die zirkulierenden miR-372 und miR-373 Konzentrationen waren dagegen kontrovers. So war nur die exosomale miR-372 Konzentration bei Mammakarzinompatientinnen höher. Die miR-373 Transkriptmengen waren dagegen nur dann signifikant erhöht, wenn ihre Konzentration im gesamten Serum gemessen wurde. Insbesondere waren die exosomalen miR-373 Konzentrationen, obwohl sie nicht tumorspezifisch erhöht waren, höher bei basal-ähnlichen als bei luminalen Mammakarzinompatientinnen. Die Serumlevel der exosomalen miR-373 waren ebenso in ER⁻ und PR⁻ Tumoren erhöht im Vergleich zu den entsprechenden Rezeptor-positiven Tumoren. In funktionellen Studien, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte zudem gezeigt werden, dass miR-373 die ER Proteinexpression verringern kann, was die Assoziation zwischen der exosomalen miR-373 mit dem negativen Estrogen-Rezeptorstatus bestätigt. Interessant war auch, dass die miR-373 Überexpression eine durch Camptothecin induzierte Apoptose inhibieren konnte.

Die relativen Serumkonzentrationen der miR-101, miR-372 und miR-373 waren höher in den zirkulierenden Exosomen als in dem gesamten Serum. Das liegt daran, dass die Konzentrationen der miR-16 und miR-484 niedriger in den Exosomen waren, was erkennbar an den höheren CT-Werten war. Die nicht normalisierten, exosomalen miR-

101, miR-372 und miR-373 CT-Werte waren dagegen denen des gesamten, zellfreien Serums ähnlich, was darauf hindeutet, dass diese miRs hauptsächlich im Blut in Exosomen zirkulieren. Da alle Werte mit miR-16 und miR-484 normalisiert wurden, erscheinen die relativen exosomalen Transkriptmengen höher. Das unterschiedliche Vorkommen der miRs wird auch durch andere Studien belegt, in denen das Vorkommen der im Blut zirkulierenden miRs entweder hauptsächlich in Exosomen [79] oder proteingebunden [282] beschrieben wurde. Vermutlich ist die Form, in welcher eine miR zirkuliert, von der miR und dem Gesundheitszustand des Patienten abhängig. So wurde beobachtet, dass 17-26% der miR-16 in Komplexen mit dem Argonaut 2 Protein zirkuliert, aber andere miRs, wie let-7a, hauptsächlich in Mikrosvesikeln nachgewiesen wurden [7].

Mehrere Studien haben eine Verminderung der miR-101 Konzentration beschrieben, sowie eine negative Assoziation mit dem Tumowachstum und der Blutgefäßbildung bei verschiedenen Karzinomen, wie dem Glioblastom, dem kleinzelligen Lungenkarzinom oder dem Ovarialkarzinom, beobachtet [252, 262, 329]. Im Gegensatz zur Literatur wurde in der vorliegenden Arbeit ein tumorspezifischer Anstieg der miR-101 Transkriptmengen im Serum von Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu Patientinnen mit einer benignen Brustkrankung und gesunden Frauen gefunden. Die niedrigere miR-101 Serumkonzentration bei Patientinnen ohne Lymphknotenmetastasen deutet auf eine bivalente Funktion dieser miR beim Mammakarzinom hin. Eine solche duale Rolle wurde für die miR-101 auch im Zusammenhang mit Estradiol (E_2)-unabhängigem und -abhängigem Wachstum beschrieben. Während *in vitro* Versuchen wurde das Zellwachstum durch die miR-101 inhibiert, wenn das Medium E_2 enthielt, in E_2 -freiem Medium dagegen gefördert. Der Entzug von Estrogen verstärkte zudem die miR-101 vermittelte Aktivierung des Akt Signalweges [239], der das Zellüberleben, die maligne Transformation, die Invasivität und Metastasierung des Mammakarzinoms stimuliert [28]. Ein Anstieg der miR-101 Konzentrationen im Karzinom im Vergleich zu einer benignen Krankheit wurde, abgesehen von der vorliegenden Studie, auch im Phäochromozytom nachgewiesen [208].

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse bezüglich der zellfreien und exosomalen miR-372 und miR-373 Serumkonzentrationen bei präoperativen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen waren unterschiedlich. So war die zellfreie miR-373 im gesamten Serum signifikant bei den Mammakarzinompatientinnen erhöht im Vergleich zu den gesunden Frauen, während für die miR-372 Serumkon-

zentrationen nur in den Exosomen ein signifikanter Unterschied zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Frauen detektiert werden konnte. Um dieses Phänomen zu erklären, ist es notwendig, zuerst zwischen Exosomen, die von Tumorzellen und Exosomen, die von normalen Zellen stammen, zu unterscheiden. Es wurde zwar in einer anderen Studie eine erhöhte Menge an Exosomen bei Mammakarzinompatientinnen detektiert, aber auch berichtet, dass ein Marker für Exosomen, die von Tumorzellen stammen, fehlt [237]. Ohne einen solchen Marker kann die exosomale Herkunft dieser miRs nicht geklärt werden.

Obwohl kein tumorspezifischer Anstieg der exosomalen miR-373 Serumkonzentrationen detektiert wurde, waren die Konzentrationen mit einem negativen ER- und PR-Status assoziiert. Die zirkulierenden miR-373 Transkriptmengen waren höher bei ER⁻ und PR⁻ Patientinnen im Vergleich zu ER⁺ und PR⁺ Patientinnen, sowie bei basal-ähnlichen, verglichen mit luminalen Mammakarzinomen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass miR-373 die Rezeptoren herunterregulieren könnte. Allerdings ist laut Datenbankanalysen nur der ER, nicht aber der PR oder HER2, ein potenzielles Ziel für die miR-373. In funktionellen Studien, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte daraufhin gezeigt werden, dass miR-373 die Proteinexpression des ER herunterreguliert, was auch durch eine andere Studie bestätigt wurde [156]. Die erhöhte miR-373 Transkriptmenge im Serum der ER⁻ Mammakarzinompatientinnen könnte deshalb mit der ER Herunterregulierung verknüpft sein. Interessanterweise konnte der signifikante Anstieg der exosomalen miR-373 Konzentrationen bei Rezeptor-negativen Mammakarzinompatientinnen nicht im gesamten zellfreien Serum nachgewiesen werden. Basierend auf dem klinischen Verhalten der basal-ähnlichen Mammakarzinome [267], könnten somit die exosomalen miR-373 Serumkonzentrationen mit aggressiveren Tumoren assoziiert sein. Diese Annahme konnte auch durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transfektionsstudien unterstützt werden. Die Überexpression der miR-373 in MCF-7 Zellen konnte die durch Camptothecin induzierte Apoptose inhibieren, hatte aber keinen Effekt auf die Zellproliferation. Dagegen konnte in Speiseröhrekarzinomzellen gezeigt werden, dass miR-373 die Proliferation dieser Zellen erhöht [151]. Soweit bekannt, ist die vorliegende Studie die erste, in der gezeigt werden konnte, dass miR-373 in der Camptothecin induzierten Apoptose involviert ist. Es sind allerdings weitere Studien notwendig, um zu ermitteln, welche Proteine in diesem Prozess durch miR-373 reguliert werden.

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die zellfreien miR-101 und miR-373 Konzentrationen als Mammakarzinom-spezifische Marker dienen könnten. Außerdem weist die Assoziation der exosomalen miR-373 mit den Rezeptor-negativen Tumoren und ihr anti-apoptotischer Effekt auf eine potenzielle Funktion dieser miR als Blut-basierender Marker für aggressivere Mammakarzinome hin. Weitere Studien mit größeren Patientenkohorten werden benötigt um die diagnostische Rolle der exosomalen miRs im Vergleich zu zellfreien miRs zu ermitteln. In zukünftigen Studien ist es allerdings äußerst wichtig, einheitliche Normen bei der Analyse der zirkulierenden miRs festzulegen, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten. Dabei spielen sowohl preanalytische Verfahren eine Rolle, wie die Entnahme, Aufarbeitung und Lagerung der Plasma- bzw. Serumproben, als auch analytische Verfahren, zu denen die Isolation der Nukleinsäuren, Techniken der Quantifizierung, sowie die Validierung der Qualität und Konzentration mittels definierter endogener Kontrollgene gehören [134].

5.3 Der Verlust der Heterozygotität von Tumorsuppressorgenen in fraktionierter, zirkulierender Tumor-DNA als Indikator für die Mammakarzinomprogression

In einem Nebenprojekt, das nicht den Fokus der vorliegenden Arbeit bildete, wurde der Verlust der Heterozygotität (LOH, *Loss of Heterozygosity*) an acht verschiedenen Mikrosatellitenmarkern im Plasma von Mammakarzinompatientinnen untersucht. Die Marker liegen in der Nähe von bekannten Tumorsuppressorgenen. Die LOH-Frequenz an diesen Markern wurde in einer hochmolekularen, niedrigmolekularen und kombinierten Plasma-DNA Fraktion untersucht. In den Analysen wurden signifikante Korrelationen zwischen einem LOH an den Markern D3S1605, D10S1765, D12S1725, D13S218 und D17S855 und den klinischen und pathologischen Risikofaktoren gefunden. Besonders interessant ist die Assoziation von LOH am Marker D12S1725, der bei *Cyclin D2* liegt, mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Mammakarzinompatientinnen.

Die Fraktionierung in hoch- und niedrigmolekulare DNA verbesserte die Detektion von LOH. Die Detektionsrate von LOH war höher in der niedrigmolekularen als in der hochmolekularen Plasma DNA-Fraktion, was die Ergebnisse einer vorherigen Studie

aus der Arbeitsgruppe belegt [191]. Die heterogene Verteilung von LOH in beiden Fraktionen kann durch das Vorhandensein von Wildtyp-DNA im Blut erklärt werden, die LOH maskieren kann. Des Weiteren kann der höhere LOH-Anteil in der niedrigmolekularen DNA Fraktion durch einen höheren Anteil an Tumor-DNA erklärt werden. Interessant wäre es auch gewesen zu untersuchen, ob das LOH-Muster im Plasma dem des Primärtumors entspricht. Allerdings waren in der SUCCESS-Studie keine Gewebeproben vorhanden, um diese Analysen durchzuführen. Die Methode, kleine DNA-Fragmente aus dem Durchfluss des QIAamp DNA Blood Mini Kits zu isolieren, wurde von Wang und Kollegen übernommen. Sie basiert auf einer modifizierten Guanidin/Promega Methode unter der Verwendung von Säulen [301]. Wang und Kollegen konnten zeigen, dass zirkulierende, mutierte *KRAS* Moleküle in der niedrigmolekularen DNA-Fraktion von kolorektalen Karzinompatienten angereichert waren. Daher empfahlen sie eine Methode, um die Sensitivität der Detektion von somatischen Mutationen oder epigenetischen Modifikationen zu erhöhen [301]. In einer anderen Studie wurde die Länge von löslichen Plasma DNA-Fragmenten durch Elektronenmikroskopie ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass ein signifikanter Anteil der DNA von apoptotischen Prozessen in neoplastischen und/oder normalen Zellen stammt [81]. Außerdem führt die abnormale Zellproliferation in Karzinomen zu einer erhöhten apoptotischen Zellrate, wodurch sich kleine DNA-Fragmente in der Blutzirkulation anreichern [245]. Diese Beobachtungen unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, die mehr LOH in der niedrigmolekularen DNA-Fraktion zeigen. Die tumorspezifische DNA könnte deshalb vorwiegend niedrigmolekular sein.

Die statistischen Auswertungen ergaben, dass die Detektion von LOH am Marker D12S1725 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, erhöhter Tumorgröße, dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und positivem HER2-Status assoziiert war. Bei HER2⁺ Mammakarzinompatientinnen mit LOH am Marker D12S1725 war zudem das Gesamtüberleben der Patientinnen kürzer. Der Marker liegt in der Nähe des *Cyclin D2* Gens, das gemeinsam mit der Cyklin-abhängigen Kinase ein wichtiger Bestandteil der Zellproliferation ist. Cyclin D2 ist außerdem an der Zelldifferenzierung beteiligt, und der Verlust des Gens kann eine Fehlregulierung des Zellzyklus beim Übergang der G1/S-Phase zur Folge haben. Beim Mammakarzinom wurde gezeigt, dass die Inaktivierung von Cyclin D2 durch DNA-Methylierung seines Promotors mit der Tumoraggressivität korreliert [253]. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal ein Zusammenhang von LOH am Marker D12S1725 mit der Tumorlast und Tumorprogression gezeigt, was darauf schließen lässt, dass die Störung

des Zellzykluses eine wichtige Rolle in diesen Prozessen spielt. Außerdem korrelierte die Anzahl der LOH-Ereignisse an diesem Marker mit einem positiven HER2-Status. HER2-überexprimierende Tumore sind histologisch undifferenziert, hoch graduiert, mit einer gesteigerten Proliferationsrate und einem schlechten Behandlungsergebnis assoziiert [10]. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten stimmen auch mit der Beobachtung überein, dass eine erhöhte genetische Instabilität, die durch LOH reflektiert wird, mit den aggressiven Eigenschaften der HER2⁺ Mammakarzinome assoziiert ist [280]. Auf Grund der geringen Anzahl an *triple negative*-Patientinnen in der Kohorte waren statistische Berechnungen für diesen aggressiven Subtyp nicht angemessen.

In HER2⁺ Karzinomen wurde in der vorliegenden Arbeit auch ein häufiger Verlust der Heterozygotität am Marker D17S855, der in der Nähe des *BRCA1* Gens liegt, detektiert. *BRCA1* ist als Tumorsuppressor in verschiedene zelluläre Prozesse involviert, wie DNA Reparatur, Rekombination, Zellzyklus-Kontrolle, Chromatin-Umgestaltung, Ubiquitinierung von Proteinen und Apoptose [192]. *BRCA1*-Deletionen werden außerdem mit lokalen Rezidiven und einer schlechten Prognose assoziiert [250, 229, 255]. Die Repression von *BRCA1* könnte so eine erhöhte genomische Instabilität verursachen und somit zu den aggressiven Eigenschaften der HER2⁺ Mammakarzinome beitragen.

Eine Anhäufung des Verlustes der Heterozygotität am Marker D3S1605, der in der Nähe von *TIG1* (*Tazarotene Induced Gene 1*) liegt, korrelierte mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium, Lymphknotenmetastasen und einem PR⁺ Status. Der Tumorsuppressor *TIG1* wird durch das synthetische Retinoid Tazaroten induziert und inhibiert das Wachstum sowie die Invasion von Krebszellen. Die häufige Hypermethylierung des *TIG1* Promotors in Karzinomen wurde mit einem schlechten Behandlungsergebnis assoziiert [64, 65]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern somit einen Hinweis, dass nicht nur die Inaktivierung des *TIG1* Gens durch Hypermethylierung [323], sondern auch der Verlust der Heterozygotität des Gens eine Rolle in der Tumorprogression des Mammakarzinoms spielt.

Für LOH am Marker D10S1765, der im *PTEN* (*Phosphatase and Tensin Homologue*) Gen liegt, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Assoziation mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und einer erhöhten Tumorgröße gefunden. Daraus resultierend kann vermutet werden, dass die Lipid- und Proteinphosphatase Aktivität von *PTEN* eine Rolle in der Pathogenese des Mammakarzinoms spielt. *PTEN* ist ein bekannter Tumorsuppressor, der die Zellproliferation und Migration inhibiert, indem es dem

PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) Signalweg entgegenwirkt [18]. In primären sowie metastasierten Karzinomen ist PTEN durch Mutationen, Deletionen oder Promotor Hypermethylierung inaktiviert [58, 174]. Dadurch wird der PI3K-Akt Signalweg aktiviert, der das Zellüberleben verbessert. Der Verlust von PTEN kann zu malignen Transformationen führen und ist beim Mammakarzinom mit der Invasivität und Metastasierung assoziiert [58]. Der Verlust der Heterozygotität am Marker D10S1765 wurde auch in anderen Tumorentitäten untersucht und in diesen Studien wurde seine Bedeutung bei der Regulation der Zellproliferation entdeckt [55, 210, 248].

Auch für den Verlust der Heterozygotität am Marker D12S218, der in der chromosomalen Region von *RB1* (*Retinoblastoma 1*) liegt, konnte eine Assoziation mit fortgeschrittenen Tumorstadien entdeckt werden. Dies lässt vermuten, dass *RB1* bei der Progression des Mammakarzinoms relevant ist. Eine *RB1* Inaktivierung wurde in 20% der Mammakarzinome detektiert [76]. Zudem sind genetische Aberrationen im *RB1* Gen mit der Tumorprogression, einer schlechten Prognose [250, 62] und dem Verlust der Fähigkeit zur Zelldifferenzierung, assoziiert [76]. *RB1* interagiert und kontrolliert verschiedene Proteine in der Zellzyklus-Initiierung und -Progression [155].

Zusätzlich wurden in dieser Arbeit Unterschiede im LOH-Muster in seriellen Plasmaproben vor und nach einer Chemotherapie gefunden. Nur 19% der detektierten Verluste der Heterozygotität in der hochmolekularen und 27% in der niedrigmolekularen DNA Fraktion stimmten vor und nach der Chemotherapie überein. Das deutet darauf hin, dass die Chemotherapie zu deutlichen Veränderungen des LOH-Musters führen kann. Eine ähnliche Beobachtung wurde bei Patienten mit einem kleinzelligen Lungenkarzinom beschrieben, bei denen sich das LOH-Muster der zellfreien DNA nach der Chemotherapie geändert hatte und mit dem Rezidivrisiko korrelierte [83]. Des Weiteren wurde bei Mammakarzinompatientinnen nach einer Mastektomie die LOH-Persistenz in der Plasma-DNA mit einer schlechten Prognose assoziiert [254]. Da in dieser Studie nur eine limitierte Anzahl an Proben nach Chemotherapie analysiert wurde, kann keine Aussage über die klinische Bedeutung der geänderten LOH-Muster getroffen werden. Die zellfreie DNA stammt teilweise von zirkulierenden Tumorzellen und verborgenen mikrometastatischen Zellen, die resistent gegenüber der systemischen Behandlung sein können, und daher die heterogene Verteilung der Verluste der Heterozygotität bedingen. Zudem ist die biologische Halbwertszeit der zirkulierenden DNA eher kurz [249]. Somit sind die verschiedenen Quellen, die DNA zu den

unterschiedlichen Zeitpunkten ins periphere Blut abgeben, eine weitere mögliche Erklärung für die heterogenen LOH-Muster, die in der vorliegenden und anderen Studien vor und nach der Chemotherapie gefunden wurden.

Zusammenfassend wurde in diesem Teilprojekt gezeigt, dass die Fraktionierung in hoch- und niedrigmolekulare Plasma-DNA die Detektion der zellfreien Tumor-DNA bei Mammakarzinompatientinnen verbessert. Die erhöhte LOH-Anzahl an den Tumorsuppressorgenen *TIG1*, *PTEN*, *Cyclin D2*, *RB1* und *BRCA1* waren mit den aggressiveren HER2-überexprimierenden Karzinomen, Lymphknotenmetastasen und einem kürzeren Gesamtüberleben der Patientinnen assoziiert. Die verbesserte Detektion der zirkulierenden Tumor-DNA könnte somit klinisch relevante Informationen über die heterogene Biologie des Mammakarzinoms liefern. Von Interesse ist die Verbesserung der Fraktionierung, um die Größe der DNA-Fragmente genau festlegen zu können.

5.4 BORIS ist ein epigenetischer Regulator von MAGE-A1

In einem weiteren Teilprojekt dieser Arbeit wurde untersucht, ob BORIS epigenetische Auswirkungen auf den Promotor des MAGE-A1 Gens in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 hat. MAGE-A1 und BORIS (*Brother of Regulator of Imprinted Sites*) gehören zu den CTAs (*Cancer-Testis Antigene*), die im normalen Gewebe nur in der Plazenta und dem Hoden exprimiert werden. In den anderen Organen sorgt die DNA-Methylierung des Promotors zu einer Inaktivierung der Genexpression. Während der Karzinogenese kann das MAGE-A1 Gen demethyliert und seine Expression aktiviert werden. In vorhergehenden Analysen der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die MAGE-A1 Expression durch DNA-Demethylierung, Histonazytylierung [314, 313] und eine BORIS-Überexpression aktiviert werden konnte. Um zu untersuchen, ob BORIS die MAGE-A1 Expression auf epigenetischer Ebene reguliert, wurde das DNA-Methylierungsmuster des MAGE-A1 Promotors untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass Boris die untersuchte MAGE-A1 Promotorregion demethylieren konnte, was zu einer Aktivierung der Genexpression führte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden auch von einer anderen Studie bestätigt, in der BORIS für die DNA-Demethylierung und Aktivierung vieler CTAs, darunter auch MAGE-A1, verantwortlich ist [291].

5.5 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich die Quantifizierung zellfreier, zirkulierender miRs im Serum von Mammakarzinompatientinnen eignet, neue Tumormarker zu etablieren. Ein Vorteil dieser Blut-basierten Methode ist der minimal invasive Eingriff, der im Gegensatz zu einer Gewebebiopsie, in regelmäßigen Abständen durchgeführt werden kann. Dadurch würden sich solche Blut-basierte Marker nicht nur für diagnostische sondern auch prognostische und prädiktive Analysen eignen, wie dem Ansprechen der Patientinnen auf eine Therapie. Da miRs auch direkt an der Karzinogenese beteiligt sein können, indem sie beispielsweise Tumorsuppressoren inhibieren, könnten sie Informationen über die molekularen Eigenschaften des heterogenen Mammakarzinoms liefern. Dadurch wäre eine bessere Anpassung der Therapie an die Patientin möglich. In dieser Arbeit ist vor allem die zirkulierende miR-373 von besonderem Interesse, da sowohl bei prä- als auch bei postoperativen Patientinnen ihre Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Frauen stark erhöht waren. Allerdings überlappen die Werte zwischen den gesunden Frauen und den Mammakarzinompatientinnen, wodurch die Serumlevel der miR-373 weder eine 100%ige Sensitivität noch eine 100%ige Spezifität zeigen.

Um die Quantifizierung der miRs weiter zu präzisieren, war es von Interesse, die miRs in den Exosomen der Patientinnen zu messen. Bei diesen kleinen Vesikeln, die vermutlich miRs, mRNAs und Proteine zwischen den Zellen transportieren können, handelt es sich um wichtige neue Transportmoleküle, deren Funktion zur Zeit erforscht wird. Die Publikationen über Exosomen sind heterogen, so gibt es Hinweise auf Tumor-inhibierende als auch -fördernde Eigenschaften der Exosomen. Daher wäre es wichtig, gezielt die Exosomen aus dem Blut zu untersuchen, die vom Primärtumor oder von Metastasen stammen. Allerdings existiert für das Mammakarzinom noch kein geeigneter Marker, um tumorspezifische Exosomen zu extrahieren, weshalb in der vorliegenden Arbeit die gesamte Fraktion der Exosomen von Tumorzellen und Wildtyp-Zellen untersucht wurde. Anhand der gewonnenen Ergebnisse ist ersichtlich, dass nicht alle miRs, die im Blut zirkulieren, auch in den Exosomen eingeschlossen sind. Außerdem sind nicht alle miRs in Exosomen gleichverteilt. Ein großer Anteil der miR-373 Konzentrationen wurde in den Exosomen detektiert. Allerdings waren die Konzentrationen der miR-16, die als endogene Kontrolle genutzt wurde, im Verhältnis zur miR-373 geringer in den Exosomen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen daher,

dass es wichtig ist, mehr über die Grundlagen der Exosomen-Entstehung zu erfahren. Zudem ist es notwendig, die genauen Ziele und Mechanismen der miRs und ihrer Deregulation während der Pathogenese der Karzinome zu erforschen.

Die miR-Konzentrationen, die in den Publikationen verschiedener Labore beschrieben wurden, sind sehr unterschiedlich. Daher ist es wichtig, Normen festzulegen, die in allen Studien eingehalten werden sollten. Das beginnt mit der Probenentnahme, bei der sowohl der Ort der Entnahme, die Art des Röhrchens (Heparin, EDTA oder Serum) und der Kanüle, die Zeit von der Entnahme bis zur Weiterverarbeitung, die genaue Methode der Weiterverarbeitung und die Lagerbedingungen entscheidend sind. Bei der Qualität der Proben sollte auf ihr Alter und eine mögliche Hämolyse geachtet werden. Die RNA-Isolation selbst ist dann abhängig vom Probenvolumen, dem verwendeten Kit, Carrier und der Spike-in Kontrolle sowie dem Elutionsvolumen. Aber auch bei der Reversen Transkription und anschließenden *Real-Time* PCR sollten einheitliche Normen gelten, um möglichst vergleichbare Daten zu erhalten. Darunter fallen die verwendeten Primer, die eingesetzte RNA-Menge, die Reagenzien und Reaktionsbedingungen sowie die verwendeten Geräte und die genutzte Software. Besonders entscheidend ist auch Normalisierung der Daten. Bisher gibt es noch keinen goldenen Standard für die Normalisierung der Daten der zirkulierenden miRs im Serum oder Plasma. Wenn die hier genannten Bedingungen alle einheitlich gehandhabt werden könnten, wäre es leichter vergleichbare Ergebnisse zu erhalten und somit einen neuen molekularen Marker für das Mammakarzinom zu etablieren.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Adams, L. Greeder, E. Reich, Y. Shao, D. Fosina, N. Hanson, J. Tassello, B. Singh, G. C. Spagnoli, S. Demaria, and A. A. Jungbluth. Expression of cancer testis antigens in human BRCA-associated breast cancers: potential targets for immunoprevention? *Cancer Immunol. Immunother.*, 60(7):999–1007, Jul 2011.
- [2] C. Admyre, S. M. Johansson, S. Paulie, and S. Gabrielsson. Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur. J. Immunol.*, 36(7):1772–1781, Jul 2006.
- [3] K. Al-Nedawi, B. Meehan, R. S. Kerbel, A. C. Allison, and J. Rak. Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106(10):3794–3799, Mar 2009.
- [4] K. Al-Nedawi, B. Meehan, J. Micallef, V. Lhotak, L. May, A. Guha, and J. Rak. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat. Cell Biol.*, 10(5):619–624, May 2008.
- [5] S. M. Anderson, M. C. Rudolph, J. L. McManaman, and M. C. Neville. Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Res.*, 9(1):204, 2007.
- [6] A. Antoniou, P. D. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord, J. L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D. M. Eccles, N. Tang, E. Olah, H. Anton-Culver, E. Warner, J. Lubinski, J. Gronwald, B. Gorski, H. Tulinius, S. Thorlacius, H. Eerola, H. Nevanlinna, K. Syrjakoski, O. P. Kallioniemi, D. Thompson, C. Evans, J. Peto, F. Lalloo, D. G. Evans, and D. F. Easton. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am. J. Hum. Genet.*, 72(5):1117–1130, May 2003.
- [7] J. D. Arroyo, J. R. Chevillet, E. M. Kroh, I. K. Ruf, C. C. Pritchard, D. F. Gibson, P. S. Mitchell, C. F. Bennett, E. L. Pogosova-Agadjanyan, D. L. Stirewalt, J. F. Tait, and M. Tewari. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(12):5003–5008, Mar 2011.
- [8] No authors listed. INTERNATIONAL Union against Cancer. Clinical stage classification. Malignant tumours of the breast. 1960-1964. *Br J Radiol*, 32:824–826, Dec 1959.
- [9] J. M. Baek, Q. Jin, J. Ensor, D. R. Boulbes, and F. J. Esteva. Serum CD44 levels and overall survival in patients with HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*, 130(3):1029–1036, Dec 2011.

- [10] F. F. Barros, D. G. Powe, I. O. Ellis, and A. R. Green. Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. *Histopathology*, 56(5):560–572, Apr 2010.
- [11] D. P. Bartel. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281–297, Jan 2004.
- [12] D. P. Bartel. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215–233, Jan 2009.
- [13] Volker Bartsch. Wirkmechanismus der Taxane: Angriff auf die mitotische Spindel. *Pharmazie in unserer Zeit*, 34(2):104–108, 2005.
- [14] I. Behm-Ansmant, J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, and E. Izaurralde. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.*, 20(14):1885–1898, Jul 2006.
- [15] E. Berezikov, W. J. Chung, J. Willis, E. Cuppen, and E. C. Lai. Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell*, 28(2):328–336, Oct 2007.
- [16] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818):363–366, Jan 2001.
- [17] S. N. Bhattacharyya, R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs, and W. Filipowicz. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125(6):1111–1124, Jun 2006.
- [18] C. Blanco-Aparicio, O. Renner, J. F. Leal, and A. Carnero. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis*, 28(7):1379–1386, Jul 2007.
- [19] C. Blenkiron, L. D. Goldstein, N. P. Thorne, I. Spiteri, S. F. Chin, M. J. Dunning, N. L. Barbosa-Morais, A. E. Teschendorff, A. R. Green, I. O. Ellis, S. Tavare, C. Caldas, and E. A. Miska. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. *Genome Biol.*, 8(10):R214, 2007.
- [20] A. Bobrie, M. Colombo, G. Raposo, and C. Thery. Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12(12):1659–1668, Dec 2011.
- [21] W. P. Bocchinfuso, J. K. Lindzey, S. C. Hewitt, J. A. Clark, P. H. Myers, R. Cooper, and K. S. Korach. Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology*, 141(8):2982–2994, Aug 2000.
- [22] J. L. Boddy, S. Gal, P. R. Malone, A. L. Harris, and J. S. Wainscoat. Prospective study of quantitation of plasma DNA levels in the diagnosis of malignant versus benign prostate disease. *Clin. Cancer Res.*, 11(4):1394–1399, Feb 2005.
- [23] G. M. Borchert, W. Lanier, and B. L. Davidson. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(12):1097–1101, Dec 2006.
- [24] L. Brannon-Peppas and J. O. Blanchette. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56(11):1649–1659, Sep 2004.

- [25] S. Braun, F. D. Vogl, B. Naume, W. Janni, M. P. Osborne, R. C. Coombes, G. Schlimok, I. J. Diel, B. Gerber, G. Gebauer, J. Y. Pierga, C. Marth, D. Oruzio, G. Wiedswang, E. F. Solomayer, G. Kundt, B. Strobl, T. Fehm, G. Y. Wong, J. Bliss, A. Vincent-Salomon, and K. Pantel. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 353(8):793–802, Aug 2005.
- [26] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(24):15524–15529, Nov 2002.
- [27] E. E. Cameron, K. E. Bachman, S. Myohanen, J. G. Herman, and S. B. Baylin. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat. Genet.*, 21(1):103–107, Jan 1999.
- [28] A. Carnero, C. Blanco-Aparicio, O. Renner, W. Link, and J. F. Leal. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets*, 8(3): 187–198, May 2008.
- [29] M. Cesana, D. Cacchiarelli, I. Legnini, T. Santini, O. Sthandier, M. Chinappi, A. Tramontano, and I. Bozzoni. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 147(2):358–369, Oct 2011.
- [30] M. Chan, C. S. Liaw, S. M. Ji, H. H. Tan, C. Y. Wong, A. A. Thike, P. H. Tan, G. H. Ho, and A. S. Lee. Identification of Circulating MicroRNA Signatures for Breast Cancer Detection. *Clin. Cancer Res.*, 19(16):4477–4487, Aug 2013.
- [31] S. Chang, R. H. Wang, K. Akagi, K. A. Kim, B. K. Martin, L. Cavallone, D. C. Haines, M. Basik, P. Mai, E. Poggi, C. Isaacs, L. M. Looi, K. S. Mun, M. H. Greene, S. W. Byers, S. H. Teo, C. X. Deng, and S. K. Sharan. Tumor suppressor BRCA1 epigenetically controls oncogenic microRNA-155. *Nat. Med.*, 17(10):1275–1282, Oct 2011.
- [32] T. C. Chang, E. A. Wentzel, O. A. Kent, K. Ramachandran, M. Mullendore, K. H. Lee, G. Feldmann, M. Yamakuchi, M. Ferlito, C. J. Lowenstein, D. E. Arking, M. A. Beer, A. Maitra, and J. T. Mendell. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol. Cell*, 26(5):745–752, Jun 2007.
- [33] N. Chaput and C. Thery. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*, 33(5):419–440, Sep 2011.
- [34] J. Chen, B. C. Wang, and J. H. Tang. Clinical significance of microRNA-155 expression in human breast cancer. *J Surg Oncol*, 106(3):260–266, Sep 2012.
- [35] W. Chen, F. Cai, B. Zhang, Z. Barekati, and X. Y. Zhong. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. *Tumour Biol.*, 34(1):455–462, Feb 2013.
- [36] X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, and C. Y. Zhang. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*, 18(10):997–1006, Oct 2008.

- [37] T. P. Chendrimada, R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, and R. Shiekhattar. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436(7051):740–744, Aug 2005.
- [38] S. W. Chi, J. B. Zang, A. Mele, and R. B. Darnell. Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature*, 460(7254):479–486, Jul 2009.
- [39] S. S. Chim, T. K. Shing, E. C. Hung, T. Y. Leung, T. K. Lau, R. W. Chiu, and Y. M. Lo. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.*, 54(3):482–490, Mar 2008.
- [40] R. W. Chiu, L. Y. Chan, N. Y. Lam, N. B. Tsui, E. K. Ng, T. H. Rainer, and Y. M. Lo. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin. Chem.*, 49(5):719–726, May 2003.
- [41] T. W. Chiu, R. Young, L. Y. Chan, A. Burd, and D. Y. Lo. Plasma cell-free DNA as an indicator of severity of injury in burn patients. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 44(1):13–17, 2006.
- [42] S. H. Choi, K. Takahashi, H. Eto, S. S. Yoon, and K. K. Tanabe. CD44s expression in human colon carcinomas influences growth of liver metastases. *Int. J. Cancer*, 85(4):523–526, Feb 2000.
- [43] F. K. Chun, I. Muller, I. Lange, M. G. Friedrich, A. Erbersdobler, P. I. Karakiewicz, M. Graefen, K. Pantel, H. Huland, and H. Schwarzenbach. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int.*, 98(3):544–548, Sep 2006.
- [44] V. Ciravolo, V. Huber, G. C. Ghedini, E. Venturelli, F. Bianchi, M. Campiglio, D. Morelli, A. Villa, P. Della Mina, S. Menard, P. Filipazzi, L. Rivoltini, E. Tagliabue, and S. M. Pupa. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J. Cell. Physiol.*, 227(2):658–667, Feb 2012.
- [45] M. Clarke, R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, E. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor, and Y. Wang. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*, 366(9503):2087–2106, Dec 2005.
- [46] M. Colozza, F. Cardoso, C. Sotiriou, D. Larsimont, and M. J. Piccart. Bringing molecular prognosis and prediction to the clinic. *Clin. Breast Cancer*, 6(1):61–76, Apr 2005.
- [47] C. Corcoran, A. M. Friel, M. J. Duffy, J. Crown, and L. O’Driscoll. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clin. Chem.*, 57(1):18–32, Jan 2011.
- [48] F. Coulet, H. Blons, A. Cabelguenne, T. Lecomte, O. Lacourreye, D. Brasnu, P. Beaune, J. Zucman, and P. Laurent-Puig. Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis. *Cancer Res.*, 60(3):707–711, Feb 2000.

- [49] S. Dai, X. Zhou, B. Wang, Q. Wang, Y. Fu, T. Chen, T. Wan, Y. Yu, and X. Cao. Enhanced induction of dendritic cell maturation and HLA-A*0201-restricted CEA-specific CD8(+) CTL response by exosomes derived from IL-18 gene-modified CEA-positive tumor cells. *J. Mol. Med.*, 84(12):1067–1076, Dec 2006.
- [50] M. Damasceno. Bevacizumab for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative advanced breast cancer. *Curr Opin Oncol*, 23 Suppl:3–9, Apr 2011.
- [51] C. W. Daniel and G. H. Smith. The mammary gland: a model for development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 4(1):3–8, Jan 1999.
- [52] S. J. Dawson, O. M. Rueda, S. Aparicio, and C. Caldas. A new genome-driven integrated classification of breast cancer and its implications. *EMBO J.*, 32(5):617–628, Mar 2013.
- [53] E. De Plaen, K. Arden, C. Traversari, J. J. Gaforio, J. P. Szikora, C. De Smet, F. Brasseur, P. van der Bruggen, B. Lethe, and C. Lurquin. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40(5):360–369, 1994.
- [54] A. M. Denli, B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting, and G. J. Hannon. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014):231–235, Nov 2004.
- [55] D. Di Vizio, L. Cito, A. Boccia, P. Chieffi, L. Insabato, G. Pettinato, M. L. Motti, F. Schepis, W. D'Amico, F. Fabiani, B. Tavernise, S. Venuta, A. Fusco, and G. Viglietto. Loss of the tumor suppressor gene PTEN marks the transition from intratubular germ cell neoplasias (ITGCN) to invasive germ cell tumors. *Oncogene*, 24(11):1882–1894, Mar 2005.
- [56] S. Diederichs and D. A. Haber. Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131(6):1097–1108, Dec 2007.
- [57] F. Diehl, M. Li, D. Dressman, Y. He, D. Shen, S. Szabo, L. A. Diaz, S. N. Goodman, K. A. David, H. Juhl, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(45):16368–16373, Nov 2005.
- [58] R. L. Dillon, D. E. White, and W. J. Muller. The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene*, 26(9):1338–1345, Feb 2007.
- [59] J. Downward. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 3(1):11–22, Jan 2003.
- [60] S. B. Edge and C. C. Compton. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.*, 17(6):1471–1474, Jun 2010.
- [61] P. Eifel, J. A. Axelson, J. Costa, J. Crowley, W. J. Curran, A. Deshler, S. Fulton, C. B. Hendricks, M. Kemeny, A. B. Kornblith, T. A. Louis, M. Markman, R. Mayer, and D. Roter. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J. Natl. Cancer Inst.*, 93(13): 979–989, Jul 2001.

- [62] G. Eiriksdottir, G. Johannesdottir, S. Ingvarsson, I. B. Bjornsdottir, J. G. Jonasson, B. A. Agnarsson, J. Hallgrimsson, J. Gudmundsson, V. Egilsson, H. Sigurdsson, and R. B. Barkardottir. Mapping loss of heterozygosity at chromosome 13q: loss at 13q12-q13 is associated with breast tumour progression and poor prognosis. *Eur. J. Cancer*, 34(13):2076-2081, Dec 1998.
- [63] S. EL Andaloussi, I. Mager, X. O. Breakefield, and M. J. Wood. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov*, 12(5):347-357, May 2013.
- [64] J. Ellinger, N. El Kassem, L. C. Heukamp, S. Matthews, F. Cubukluoz, P. Kahl, F. G. Perabo, S. C. Muller, A. von Ruecker, and P. J. Bastian. Hypermethylation of cell-free serum DNA indicates worse outcome in patients with bladder cancer. *J. Urol.*, 179(1): 346-352, Jan 2008.
- [65] J. Ellinger, K. Haan, L. C. Heukamp, P. Kahl, R. Buttner, S. C. Muller, A. von Ruecker, and P. J. Bastian. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *Prostate*, 68(1):42-49, Jan 2008.
- [66] C. W. Elston 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*, 19(5):403-410, Nov 1991.
- [67] M. Esteller and J. G. Herman. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J. Pathol.*, 196(1):1-7, Jan 2002.
- [68] A. Eulalio, E. Huntzinger, T. Nishihara, J. Rehwinkel, M. Fauser, and E. Izaurralde. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA*, 15(1):21-32, Jan 2009.
- [69] L. Fang, W. W. Du, W. Yang, Z. J. Rutnam, C. Peng, H. Li, Y. Q. O'Malley, R. W. Askeland, S. Sugg, M. Liu, T. Mehta, Z. Deng, and B. B. Yang. MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle*, 11(23):4352-4365, Dec 2012.
- [70] T. Fehm, V. Muller, C. Alix-Panabieres, and K. Pantel. Micrometastatic spread in breast cancer: detection, molecular characterization and clinical relevance. *Breast Cancer Res.*, 10 Suppl 1:S1, 2008.
- [71] I. J. Fidler. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 45(4):773-782, Oct 1970.
- [72] I. J. Fidler, D. M. Gersten, and I. R. Hart. The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv. Cancer Res.*, 28:149-250, 1978.
- [73] M. Fleischhacker and B. Schmidt. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta*, 1775(1):181-232, Jan 2007.
- [74] J. Folkman and M. Klagsbrun. Angiogenic factors. *Science*, 235(4787):442-447, Jan 1987.
- [75] L. G. Fulford, J. S. Reis-Filho, K. Ryder, C. Jones, C. E. Gillett, A. Hanby, D. Easton, and S. R. Lakhani. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res.*, 9(1):R4, 2007.

- [76] Y. K. Fung and A. T'Ang. The role of the retinoblastoma gene in breast cancer development. *Cancer Treat. Res.*, 61:59–68, 1992.
- [77] P. B. Gahan. Circulating nucleic acids in plasma and serum: diagnosis and prognosis in cancer. *EPMA J*, 1(3):503–512, Sep 2010.
- [78] P. B. Gahan and M. Stroun. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem. Funct.*, 28(7):529–538, Oct 2010.
- [79] A. Gallo, M. Tandon, I. Alevizos, and G. G. Illei. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE*, 7(3):e30679, 2012.
- [80] H. E. Gee, C. Camps, F. M. Buffa, S. Colella, H. Sheldon, J. M. Gleadle, J. Ragoussis, and A. L. Harris. MicroRNA-10b and breast cancer metastasis. *Nature*, 455(7216):8–9, Oct 2008.
- [81] M. B. Giacona, G. C. Ruben, K. A. Iczkowski, T. B. Roos, D. M. Porter, and G. D. Sorenson. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17(1):89–97, Jul 1998.
- [82] A. Goldhirsch, E. P. Winer, A. S. Coates, R. D. Gelber, M. Piccart-Gebhart, B. Thurlimann, and H. J. Senn. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.*, Aug 2013.
- [83] R. Gonzalez, J. M. Silva, A. Sanchez, G. Dominguez, J. M. Garcia, X. Q. Chen, M. Stroun, M. Provencio, P. Espana, P. Anker, and F. Bonilla. Microsatellite alterations and TP53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance. *Ann. Oncol.*, 11(9):1097–1104, Sep 2000.
- [84] R. I. Gregory, T. P. Chendrimada, N. Cooch, and R. Shiekhattar. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123(4):631–640, Nov 2005.
- [85] S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A. J. Enright. miR-Base: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, 34 (Database issue):D140–144, Jan 2006.
- [86] B. L. Grosshans, D. Ortiz, and P. Novick. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(32):11821–11827, Aug 2006.
- [87] J. Gruenberg and H. Stenmark. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5(4):317–323, Apr 2004.
- [88] K. Gudmundsdottir and A. Ashworth. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*, 25(43):5864–5874, Sep 2006.
- [89] H. Guo, N. T. Ingolia, J. S. Weissman, and D. P. Bartel. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308):835–840, Aug 2010.

- [90] M. Hafner, M. Landthaler, L. Burger, M. Khorshid, J. Hausser, P. Berninger, A. Rothballer, M. Ascano, A. C. Jungkamp, M. Munschauer, A. Ulrich, G. S. Wardle, S. Dewell, M. Zavolan, and T. Tuschl. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 141(1):129–141, Apr 2010.
- [91] J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom, J. W. Nam, I. Heo, J. K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B. T. Zhang, and V. N. Kim. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5):887–901, Jun 2006.
- [92] D. Hanahan and R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646–674, Mar 2011.
- [93] P. I. Hanson and A. Cashikar. Multivesicular body morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 28:337–362, 2012.
- [94] L. He, X. He, L. P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A. L. Jackson, P. S. Linsley, C. Chen, S. W. Lowe, M. A. Cleary, and G. J. Hannon. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148):1130–1134, Jun 2007.
- [95] N. A. Healy, H. M. Heneghan, N. Miller, C. K. Osborne, R. Schiff, and M. J. Kerin. Systemic mirnas as potential biomarkers for malignancy. *Int. J. Cancer*, 131(10):2215–2222, Nov 2012.
- [96] J. P. Hegmans, M. P. Bard, A. Hemmes, T. M. Luiders, M. J. Kleijmeer, J. B. Prins, L. Zitvogel, S. A. Burgers, H. C. Hoogsteden, and B. N. Lambrecht. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am. J. Pathol.*, 164(5):1807–1815, May 2004.
- [97] C. U. Hellen and P. Sarnow. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.*, 15(13):1593–1612, Jul 2001.
- [98] S. Hellman and J. R. Harris. *Diseases of the breast*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2012. 407–423 pp.
- [99] H. M. Heneghan, N. Miller, R. Kelly, J. Newell, and M. J. Kerin. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist*, 15(7):673–682, 2010.
- [100] H. M. Heneghan, N. Miller, A. J. Lowery, K. J. Sweeney, J. Newell, and M. J. Kerin. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann. Surg.*, 251(3):499–505, Mar 2010.
- [101] L. Hennighausen and G. W. Robinson. Information networks in the mammary gland. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(9):715–725, Sep 2005.
- [102] J. R. Hens, P. Dann, J. P. Zhang, S. Harris, G. W. Robinson, and J. Wysolmerski. BMP4 and PTHrP interact to stimulate ductal outgrowth during embryonic mammary development and to inhibit hair follicle induction. *Development*, 134(6):1221–1230, Mar 2007.

- [103] K. Hibi, C. R. Robinson, S. Booker, L. Wu, S. R. Hamilton, D. Sidransky, and J. Jen. Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res.*, 58(7):1405–1407, Apr 1998.
- [104] S. Holdenrieder, D. Nagel, A. Schalhorn, V. Heinemann, R. Wilkowski, J. von Pawel, H. Raith, K. Feldmann, A. E. Kremer, S. Muller, S. Geiger, G. F. Hamann, D. Seidel, and P. Stieber. Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1137:180–189, Aug 2008.
- [105] A. Hossain, M. T. Kuo, and G. F. Saunders. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, 26(21):8191–8201, Nov 2006.
- [106] C. Hsu, Y. Morohashi, S. Yoshimura, N. Manrique-Hoyos, S. Jung, M. A. Lauterbach, M. Bakhti, M. Grønborg, W. Mobius, J. Rhee, F. A. Barr, and M. Simons. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.*, 189(2):223–232, Apr 2010.
- [107] Z. Hu, J. Dong, L. E. Wang, H. Ma, J. Liu, Y. Zhao, J. Tang, X. Chen, J. Dai, Q. Wei, C. Zhang, and H. Shen. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*, 33(4):828–834, Apr 2012.
- [108] Q. Huang, K. Gumireddy, M. Schrier, C. le Sage, R. Nagel, S. Nair, D. A. Egan, A. Li, G. Huang, A. J. Klein-Szanto, P. A. Gimotty, D. Katsaros, G. Coukos, L. Zhang, E. Pure, and R. Agami. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat. Cell Biol.*, 10(2):202–210, Feb 2008.
- [109] V. Huber, S. Fais, M. Iero, L. Lugini, P. Canese, P. Squarcina, A. Zaccheddu, M. Colone, G. Arancia, M. Gentile, E. Seregini, R. Valenti, G. Ballabio, F. Belli, E. Leo, G. Parmiani, and L. Rivoltini. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*, 128(7):1796–1804, Jun 2005.
- [110] C. A. Hudis. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.*, 357(1):39–51, Jul 2007.
- [111] D. T. Humphreys, B. J. Westman, D. I. Martin, and T. Preiss. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102(47):16961–16966, Nov 2005.
- [112] R. C. Humphreys, M. Krajewska, S. Krnacik, R. Jaeger, H. Weiher, S. Krajewski, J. C. Reed, and J. M. Rosen. Apoptosis in the terminal endbud of the murine mammary gland: a mechanism of ductal morphogenesis. *Development*, 122(12):4013–4022, Dec 1996.
- [113] E. Huntzinger and E. Izaurralde. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.*, 12(2):99–110, Feb 2011.
- [114] J. Huotari and A. Helenius. Endosome maturation. *EMBO J.*, 30(17):3481–3500, Aug 2011.

- [115] G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, and P. D. Zamore. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531):834–838, Aug 2001.
- [116] H. W. Hwang, E. A. Wentzel, and J. T. Mendell. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*, 315(5808):97–100, Jan 2007.
- [117] M. V. Iorio, M. Ferracin, C. G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, and C. M. Croce. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.*, 65(16):7065–7070, Aug 2005.
- [118] C. M. Isacke and H. Yarwood. The hyaluronan receptor, CD44. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34(7):718–721, Jul 2002.
- [119] E. B. Jaeger, R. S. Samant, and C. W. Rinker-Schaeffer. Metastasis suppression in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, 20(3-4):279–286, 2001.
- [120] T. B. Jensen, N. Langkjaer, and J. Wengel. Unlocked nucleic acid (UNA) and UNA derivatives: thermal denaturation studies. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 1(52):133–134, 2008.
- [121] S. Jiang, H. W. Zhang, M. H. Lu, X. H. He, Y. Li, H. Gu, M. F. Liu, and E. D. Wang. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.*, 70(8):3119–3127, Apr 2010.
- [122] P. Kaatsch, c. Spix, A. Katalinic, and S. Hentschel. *Krebs in Deutschland 2007/2008*, volume 8. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg), 2012.
- [123] A. A. Kamat, M. Baldwin, D. Urbauer, D. Dang, L. Y. Han, A. Godwin, B. Y. Karlan, J. L. Simpson, D. M. Gershenson, R. L. Coleman, F. Z. Bischoff, and A. K. Sood. Plasma cell-free DNA in ovarian cancer: an independent prognostic biomarker. *Cancer*, 116(8):1918–1925, Apr 2010.
- [124] T. Katoh, Y. Sakaguchi, K. Miyauchi, T. Suzuki, S. Kashiwabara, T. Baba, and T. Suzuki. Selective stabilization of mammalian microRNAs by 3' adenylation mediated by the cytoplasmic poly(A) polymerase GLD-2. *Genes Dev.*, 23(4):433–438, Feb 2009.
- [125] Y. Kawahara, B. Zinshteyn, P. Sethupathy, H. Iizasa, A. G. Hatzigeorgiou, and K. Nishikura. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. *Science*, 315(5815):1137–1140, Feb 2007.
- [126] O. Kholmanskikh, A. Lorient, F. Brasseur, E. De Plaen, and C. De Smet. Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. *Int. J. Cancer*, 122(4):777–784, Feb 2008.
- [127] A. Khvorova, A. Reynolds, and S. D. Jayasena. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115(2):209–216, Oct 2003.

- [128] D. H. Kim, P. Saetrom, O. Sn?ve, and J. J. Rossi. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(42):16230–16235, Oct 2008.
- [129] D. J. Kim, S. Linnstaedt, J. Palma, J. C. Park, E. Ntrivalas, J. Y. Kwak-Kim, A. Gilman-Sachs, K. Beaman, M. L. Hastings, J. N. Martin, and D. M. Duelli. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J Mol Diagn*, 14(1): 71–80, Jan 2012.
- [130] K. Kim, G. Chadalapaka, S. O. Lee, D. Yamada, X. Sastre-Garau, P. A. Defossez, Y. Y. Park, J. S. Lee, and S. Safe. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene*, 31(8):1034–1044, Feb 2012.
- [131] H. W. King, M. Z. Michael, and J. M. Gleadle. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer*, 12:421, 2012.
- [132] M. C. King, J. H. Marks, and J. B. Mandell. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*, 302(5645):643–646, Oct 2003.
- [133] T. Kirkegaard, C. J. Witton, L. M. McGlynn, S. M. Tovey, B. Dunne, A. Lyon, and J. M. Bartlett. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J. Pathol.*, 207(2):139–146, Oct 2005.
- [134] M. B. Kirschner, N. van Zandwijk, and G. Reid. Cell-free microRNAs: potential biomarkers in need of standardized reporting. *Front Genet*, 4:56, 2013.
- [135] D. Koffler, V. Agnello, R. Winchester, and H. G. Kunkel. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J. Clin. Invest.*, 52(1):198–204, Jan 1973.
- [136] K. Koga, K. Matsumoto, T. Akiyoshi, M. Kubo, N. Yamanaka, A. Tasaki, H. Nakashima, M. Nakamura, S. Kuroki, M. Tanaka, and M. Katano. Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res.*, 25(6A):3703–3707, 2005.
- [137] G. Konecny, G. Pauletti, M. Pegram, M. Untch, S. Dandekar, Z. Aguilar, C. Wilson, H. M. Rong, I. Bauerfeind, M. Felber, H. J. Wang, M. Beryt, R. Seshadri, H. Hepp, and D. J. Slamon. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 95(2):142–153, Jan 2003.
- [138] Y. W. Kong, D. Ferland-McCollough, T. J. Jackson, and M. Bushell. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.*, 13(6):e249–258, Jun 2012.
- [139] E. M. Kroh, R. K. Parkin, P. S. Mitchell, and M. Tewari. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*, 50(4):298–301, Apr 2010.
- [140] J. Krol, I. Loedige, and W. Filipowicz. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.*, 11(9):597–610, Sep 2010.

- [141] J. Krol, K. Sobczak, U. Wilczynska, M. Drath, A. Jasinska, D. Kaczynska, and W. J. Krzyzosiak. Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J. Biol. Chem.*, 279(40):42230–42239, Oct 2004.
- [142] P. Kucharzewska, H. C. Christianson, J. E. Welch, K. J. Svensson, E. Fredlund, M. Ringner, M. Morgelin, E. Bourseau-Guilmain, J. Bengzon, and M. Belting. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(18):7312–7317, Apr 2013.
- [143] M. Laakso, N. Loman, A. Borg, and J. Isola. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod. Pathol.*, 18(10):1321–1328, Oct 2005.
- [144] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [145] P. P. Laktionov, S. N. Tamkovich, E. Y. Rykova, O. E. Bryzgunova, A. V. Starikov, N. P. Kuznetsova, and V. V. Vlassov. Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1022:221–227, Jun 2004.
- [146] N. Y. Lam, T. H. Rainer, L. Y. Chan, G. M. Joynt, and Y. M. Lo. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.*, 49(8):1286–1291, Aug 2003.
- [147] M. Landthaler, A. Yalcin, and T. Tuschl. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr. Biol.*, 14(23):2162–2167, Dec 2004.
- [148] A. A. Lane and B. A. Chabner. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J. Clin. Oncol.*, 27(32):5459–5468, Nov 2009.
- [149] V. Le Doussal, M. Tubiana-Hulin, S. Friedman, K. Hacene, F. Spyrtos, and M. Brunet. Prognostic value of histologic grade nuclear components of Scarff-Bloom-Richardson (SBR). An improved score modification based on a multivariate analysis of 1262 invasive ductal breast carcinomas. *Cancer*, 64(9):1914–1921, Nov 1989.
- [150] S. Lebedeva, M. Jens, K. Theil, B. Schwanhausser, M. Selbach, M. Landthaler, and N. Rajewsky. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol. Cell*, 43(3):340–352, Aug 2011.
- [151] K. H. Lee, Y. G. Goan, M. Hsiao, C. H. Lee, S. H. Jian, J. T. Lin, Y. L. Chen, and P. J. Lu. MicroRNA-373 (miR-373) post-transcriptionally regulates large tumor suppressor, homolog 2 (LATS2) and stimulates proliferation in human esophageal cancer. *Exp. Cell Res.*, 315(15):2529–2538, Sep 2009.
- [152] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843–854, Dec 1993.

- [153] Y. Lee, I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh, and V. N. Kim. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.*, 25(3):522–532, Feb 2006.
- [154] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, 23(20):4051–4060, Oct 2004.
- [155] Y. I. Leiderman, S. Kiss, and S. Mukai. Molecular genetics of RB1—the retinoblastoma gene. *Semin Ophthalmol*, 22(4):247–254, 2007.
- [156] S. K. Leivonen, R. Makela, P. Ostling, P. Kohonen, S. Haapa-Paananen, K. Kleivi, E. Enerly, A. Aakula, K. Hellstrom, N. Sahlberg, V. N. Kristensen, A. L. B?rresen-Dale, P. Saviranta, M. Perala, and O. Kallioniemi. Protein lysate microarray analysis to identify microRNAs regulating estrogen receptor signaling in breast cancer cell lines. *Oncogene*, 28(44):3926–3936, Nov 2009.
- [157] S. F. Leung, B. Zee, B. B. Ma, E. P. Hui, F. Mo, M. Lai, K. C. Chan, L. Y. Chan, W. H. Kwan, Y. M. Lo, and A. T. Chan. Plasma Epstein-Barr viral deoxyribonucleic acid quantitation complements tumor-node-metastasis staging prognostication in nasopharyngeal carcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 24(34):5414–5418, Dec 2006.
- [158] A. J. Levine and M. Oren. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer*, 9(10):749–758, Oct 2009.
- [159] H. Li, C. Bian, L. Liao, J. Li, and R. C. Zhao. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast Cancer Res. Treat.*, 126(3):565–575, Apr 2011.
- [160] L. Li, L. Yuan, J. Luo, J. Gao, J. Guo, and X. Xie. MiR-34a inhibits proliferation and migration of breast cancer through down-regulation of Bcl-2 and SIRT1. *Clin. Exp. Med.*, 13(2):109–117, May 2013.
- [161] L. A. Liotta. Tumor invasion and metastases—role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res.*, 46(1):1–7, Jan 1986.
- [162] C. Liu, S. Yu, K. Zinn, J. Wang, L. Zhang, Y. Jia, J. C. Kappes, S. Barnes, R. P. Kimberly, W. E. Grizzle, and H. G. Zhang. Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *J. Immunol.*, 176(3):1375–1385, Feb 2006.
- [163] P. Liu and M. J. Wilson. miR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF-kappaB factor in human fibrosarcoma cells. *J. Cell. Physiol.*, 227(2):867–876, Feb 2012.
- [164] J. I. Lopez, T. D. Camenisch, M. V. Stevens, B. J. Sands, J. McDonald, and J. A. Schroeder. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res.*, 65(15):6755–6763, Aug 2005.
- [165] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1):265–275, Nov 1951.
- [166] D. J. Luciano, H. Mirsky, N. J. Vendetti, and S. Maas. RNA editing of a miRNA precursor. *RNA*, 10(8):1174–1177, Aug 2004.

- [167] F. Lumachi, A. Brunello, M. Maruzzo, U. Basso, and S. M. Basso. Treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *Curr. Med. Chem.*, 20(5):596-604, 2013.
- [168] E. Lund, S. Guttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, and U. Kutay. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654):95-98, Jan 2004.
- [169] J. P. Lydon, F. J. DeMayo, C. R. Funk, S. K. Mani, A. R. Hughes, C. A. Montgomery, G. Shyamala, O. M. Conneely, and B. W. O'Malley. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev.*, 9(18):2266-2278, Sep 1995.
- [170] L. Ma, F. Reinhardt, E. Pan, J. Soutschek, B. Bhat, E. G. Marcusson, J. Teruya-Feldstein, G. W. Bell, and R. A. Weinberg. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat. Biotechnol.*, 28(4):341-347, Apr 2010.
- [171] L. Ma, J. Teruya-Feldstein, and R. A. Weinberg. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449(7163):682-688, Oct 2007.
- [172] L. Ma and R. A. Weinberg. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet.*, 24(9):448-456, Sep 2008.
- [173] H. Maeda, J. Fang, T. Inutsuka, and Y. Kitamoto. Vascular permeability enhancement in solid tumor: various factors, mechanisms involved and its implications. *Int. Immunopharmacol.*, 3(3):319-328, Mar 2003.
- [174] P. K. Majumder and W. R. Sellers. Akt-regulated pathways in prostate cancer. *Oncogene*, 24(50):7465-7474, Nov 2005.
- [175] P. MANDEL and P. METAIS. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 142(3-4):241-243, Feb 1948.
- [176] J. Manikandan, J. J. Aarthi, S. D. Kumar, and P. N. Pushparaj. Oncomirs: the potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformation*, 2(8):330-334, 2008.
- [177] Y. Martineau, M. C. Derry, X. Wang, A. Yanagiya, J. J. Berlanga, A. B. Shyu, H. Imataka, K. Gehring, and N. Sonenberg. Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell. Biol.*, 28(21):6658-6667, Nov 2008.
- [178] G. Mathonnet, M. R. Fabian, Y. V. Svitkin, A. Parsyan, L. Huck, T. Murata, S. Biffo, W. C. Merrick, E. Darzynkiewicz, R. S. Pillai, W. Filipowicz, T. F. Duchaine, and N. Sonenberg. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317(5845):1764-1767, Sep 2007.
- [179] F. R. Maxfield and T. E. McGraw. Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5(2):121-132, Feb 2004.
- [180] F. R. Maxfield and D. J. Yamashiro. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 225:189-198, 1987.
- [181] L. M. McShane, D. G. Altman, W. Sauerbrei, S. E. Taube, M. Gion, and G. M. Clark. REporting recommendations for tumor MARKer prognostic studies (REMARK). *Breast Cancer Res. Treat.*, 100(2):229-235, Nov 2006.

- [182] D. Medina. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1(1):5-19, Jan 1996.
- [183] N. C. Meisner and W. Filipowicz. Properties of the regulatory RNA-binding protein HuR and its role in controlling miRNA repression. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 700:106-123, 2010.
- [184] J. T. Mendell. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*, 133(2):217-222, Apr 2008.
- [185] H. Min and S. Yoon. Got target? Computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp. Mol. Med.*, 42(4):233-244, Apr 2010.
- [186] P. S. Mitchell, R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, and M. Tewari. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(30):10513-10518, Jul 2008.
- [187] F. Moinfar. Is 'basal-like' carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology*, 75(2):119-131, 2008.
- [188] A. Mordente, E. Meucci, A. Silvestrini, G. E. Martorana, and B. Giardina. Anthracyclines and mitochondria. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 942:385-419, 2012.
- [189] N. Mukherjee, D. L. Corcoran, J. D. Nusbaum, D. W. Reid, S. Georgiev, M. Hafner, M. Ascano, T. Tuschl, U. Ohler, and J. D. Keene. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol. Cell*, 43(3):327-339, Aug 2011.
- [190] T. G. Muldoon. Prolactin mediation of estrogen-induced changes in mammary tissue estrogen and progesterone receptors. *Endocrinology*, 121(1):141-149, Jul 1987.
- [191] I. Muller, C. Beeger, C. Alix-Panabieres, X. Rebillard, K. Pantel, and H. Schwarzenbach. Identification of loss of heterozygosity on circulating free DNA in peripheral blood of prostate cancer patients: potential and technical improvements. *Clin. Chem.*, 54(4):688-696, Apr 2008.
- [192] M. M. Murray, P. B. Mullan, and D. P. Harkin. Role played by BRCA1 in transcriptional regulation in response to therapy. *Biochem. Soc. Trans.*, 35(Pt 5):1342-1346, Nov 2007.
- [193] C. M. Nelson, M. M. Vanduijn, J. L. Inman, D. A. Fletcher, and M. J. Bissell. Tissue geometry determines sites of mammary branching morphogenesis in organotypic cultures. *Science*, 314(5797):298-300, Oct 2006.
- [194] E. L. Ng, B. Q. Gan, F. Ng, and B. L. Tang. Rab GTPases regulating receptor trafficking at the late endosome-lysosome membranes. *Cell Biochem. Funct.*, 30(6):515-523, Aug 2012.
- [195] E. N. Nolte-'t Hoen, S. I. Buschow, S. M. Anderton, W. Stoorvogel, and M. H. Wauben. Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1. *Blood*, 113(9):1977-1981, Feb 2009.

- [196] K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, and J. T. Mendell. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043):839–843, Jun 2005.
- [197] Faculty of Life Sciences. miRBase: the microRNA database @ONLINE. Available online at <http://www.mirbase.org/>; visited on August 8th 2013.
- [198] K. Okamura, J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler, and E. C. Lai. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1):89–100, Jul 2007.
- [199] C. J. Ormandy, N. Binart, and P. A. Kelly. Mammary gland development in prolactin receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2(4):355–364, Oct 1997.
- [200] M. Ostrowski, N. B. Carmo, S. Krumeich, I. Fanget, G. Raposo, A. Savina, C. F. Moita, K. Schauer, A. N. Hume, R. P. Freitas, B. Goud, P. Benaroch, N. Hacohen, M. Fukuda, C. Desnos, M. C. Seabra, F. Darchen, S. Amigorena, L. F. Moita, and C. Thery. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.*, 12(1):19–30, Jan 2010.
- [201] M. Otte, M. Zafrakas, L. Riethdorf, U. Pichlmeier, T. Loning, F. Janicke, and K. Pantel. *MAGE-A* gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res.*, 61(18):6682–6687, Sep 2001.
- [202] D. Ovcharenko, K. Kelnar, C. Johnson, N. Leng, and D. Brown. Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res.*, 67(22):10782–10788, Nov 2007.
- [203] B. T. Pan and R. M. Johnstone. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3):967–978, Jul 1983.
- [204] K. Pantel and R. H. Brakenhoff. Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer*, 4(6):448–456, Jun 2004.
- [205] K. Pantel, A. Dickmanns, A. Zippelius, C. Klein, J. Shi, W. Hoechtlen-Vollmar, G. Schlimok, D. Weckermann, R. Oberneder, and E. Fanning. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 87(15):1162–1168, Aug 1995.
- [206] I. Parolini, C. Federici, C. Raggi, L. Lugini, S. Palleschi, A. De Milito, C. Coscia, E. Iessi, M. Logozzi, A. Molinari, M. Colone, M. Tatti, M. Sargiacomo, and S. Fais. Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 284(49):34211–34222, Dec 2009.
- [207] A. E. Pasquinelli. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.*, 13(4):271–282, Apr 2012.
- [208] E. Patterson, R. Webb, A. Weisbrod, B. Bian, M. He, L. Zhang, A. K. Holloway, R. Krishna, N. Nilubol, K. Pacak, and E. Kebebew. The microRNA expression changes associated with malignancy and SDHB mutation in pheochromocytoma. *Endocr. Relat. Cancer*, 19(2):157–166, Apr 2012.

- [209] S. T. Peng, C. H. Su, C. C. Kuo, C. F. Shaw, and H. S. Wang. CD44 crosslinking-mediated matrix metalloproteinase-9 relocation in breast tumor cells leads to enhanced metastasis. *Int. J. Oncol.*, 31(5):1119–1126, Nov 2007.
- [210] S. Pesche, A. Latil, F. Muzeau, O. Cussenot, G. Fournier, M. Longy, C. Eng, and R. Lidereau. PTEN/MMAC1/TEP1 involvement in primary prostate cancers. *Oncogene*, 16(22):2879–2883, Jun 1998.
- [211] H. Peurala, D. Greco, T. Heikkinen, S. Kaur, J. Bartkova, M. Jamshidi, K. Aittomaki, P. Heikkila, J. Bartek, C. Blomqvist, R. Butzow, and H. Nevanlinna. MiR-34a expression has an effect for lower risk of metastasis and associates with expression patterns predicting clinical outcome in breast cancer. *PLoS ONE*, 6(11):e26122, 2011.
- [212] M. J. Piccart-Gebhart. Anthracyclines and the tailoring of treatment for early breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 354(20):2177–2179, May 2006.
- [213] L. Pigati, S. C. Yaddanapudi, R. Iyengar, D. J. Kim, S. A. Hearn, D. Danforth, M. L. Hastings, and D. M. Duelli. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS ONE*, 5(10):e13515, 2010.
- [214] R. S. Pillai, S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309(5740):1573–1576, Sep 2005.
- [215] R. F. Place, L. C. Li, D. Pookot, E. J. Noonan, and R. Dahiya. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(5):1608–1613, Feb 2008.
- [216] L. Poliseno, L. Salmena, J. Zhang, B. Carver, W. J. Haveman, and P. P. Pandolfi. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301):1033–1038, Jun 2010.
- [217] K. Polyak and R. A. Weinberg. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer*, 9(4):265–273, Apr 2009.
- [218] H. Ponta, L. Sherman, and P. A. Herrlich. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 4(1):33–45, Jan 2003.
- [219] A. Prat, M. C. Cheang, M. Martin, J. S. Parker, E. Carrasco, R. Caballero, S. Tyldesley, K. Gelmon, P. S. Bernard, T. O. Nielsen, and C. M. Perou. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 31(2):203–209, Jan 2013.
- [220] J. E. Price, S. Naito, and I. J. Fidler. Growth in an organ microenvironment as a selective process in metastasis. *Clin. Exp. Metastasis*, 6(1):91–102, 1988.
- [221] E. Putz, K. Witter, S. Offner, P. Stosiek, A. Zippelius, J. Johnson, R. Zahn, G. Riethmüller, and K. Pantel. Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res.*, 59(1):241–248, Jan 1999.

- [222] H. H. Qi, P. P. Ongusaha, J. Myllyharju, D. Cheng, O. Pakkanen, Y. Shi, S. W. Lee, J. Peng, and Y. Shi. Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. *Nature*, 455 (7211):421–424, Sep 2008.
- [223] B. Rack, C. Schindlbeck, J. Juckstock, E. M. Genss, P. Hepp, R. Lorenz, H. Tesch, A. Schneeweiss, M. W. Beckmann, W. Lichtenegger, H. Sommer, K. Friese, and W. Janni. Prevalence of CA 27.29 in primary breast cancer patients before the start of systemic treatment. *Anticancer Res.*, 30(5):1837–1841, May 2010.
- [224] C. Raiborg, K. G. Bache, D. J. Gillyooly, I. H. Madshus, E. Stang, and H. Stenmark. Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat. Cell Biol.*, 4(5):394–398, May 2002.
- [225] T. H. Rainer, L. K. Wong, W. Lam, E. Yuen, N. Y. Lam, C. Metreweli, and Y. M. Lo. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin. Chem.*, 49(4):562–569, Apr 2003.
- [226] E. A. Rakha, J. S. Reis-Filho, and I. O. Ellis. Basal-like breast cancer: a critical review. *J. Clin. Oncol.*, 26(15):2568–2581, May 2008.
- [227] G. Raposo, H. W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C. V. Harding, C. J. Melief, and H. J. Geuze. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.*, 183 (3):1161–1172, Mar 1996.
- [228] N. Raver-Shapira, E. Marciano, E. Meiri, Y. Spector, N. Rosenfeld, N. Moskovits, Z. Bentwich, and M. Oren. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell*, 26(5):731–743, Jun 2007.
- [229] P. Regitnig, R. Moser, M. Thalhammer, G. Luschin-Ebengreuth, F. Ploner, H. Papadi, O. Tsybrovskyy, and S. F. Lax. Microsatellite analysis of breast carcinoma and corresponding local recurrences. *J. Pathol.*, 198(2):190–197, Oct 2002.
- [230] J. Rehwinkel, I. Behm-Ansmant, D. Gatfield, and E. Izaurralde. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, 11 (11):1640–1647, Nov 2005.
- [231] B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvié, H. R. Horvitz, and G. Ruvkun. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772):901–906, Feb 2000.
- [232] W. Remmele and H. E. Stegner. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8(3):138–140, May 1987.
- [233] I. Rigoutsos. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res.*, 69(8):3245–3248, Apr 2009.
- [234] S. Ro, C. Park, D. Young, K. M. Sanders, and W. Yan. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 35(17):5944–5953, 2007.
- [235] C. Roth, B. Rack, V. Muller, W. Janni, K. Pantel, and H. Schwarzenbach. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 12(6):R90, 2010.

- [236] S. Rudel, Y. Wang, R. Lenobel, R. Korner, H. H. Hsiao, H. Urlaub, D. Patel, and G. Meister. Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Res.*, 39(6):2330–2343, Mar 2011.
- [237] A. K. Rupp, C. Rupp, S. Keller, J. C. Brase, R. Ehehalt, M. Fogel, G. Moldenhauer, F. Marme, H. Sultmann, and P. Altevogt. Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. *Gynecol. Oncol.*, 122(2):437–446, Aug 2011.
- [238] A. Rybak, H. Fuchs, K. Hadian, L. Smirnova, E. A. Wulczyn, G. Michel, R. Nitsch, D. Krappmann, and F. G. Wulczyn. The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. *Nat. Cell Biol.*, 11(12):1411–1420, Dec 2009.
- [239] M. Sachdeva, H. Wu, P. Ru, L. Hwang, V. Trieu, and Y. Y. Mo. MicroRNA-101-mediated Akt activation and estrogen-independent growth. *Oncogene*, 30(7):822–831, Feb 2011.
- [240] M. Sachse, S. Urbe, V. Oorschot, G. J. Strous, and J. Klumperman. Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol. Biol. Cell*, 13(4):1313–1328, Apr 2002.
- [241] R. Safaei, B. J. Larson, T. C. Cheng, M. A. Gibson, S. Otani, W. Naerdemann, and S. B. Howell. Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Mol. Cancer Ther.*, 4(10):1595–1604, Oct 2005.
- [242] B. J. Sakr and D. S. Dizon. Breast cancer: adjuvant modalities. *Clin Obstet Gynecol*, 54(1):150–156, Mar 2011.
- [243] F. Sanger, S. Nicklen, and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74(12):5463–5467, Dec 1977.
- [244] S. J. Schnitt. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod. Pathol.*, 23 Suppl 2:S60–64, May 2010.
- [245] R. Schulte-Hermann, W. Bursch, B. Grasl-Kraupp, L. Torok, A. Ellinger, and L. Mullauer. Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, 82-83:143–148, Dec 1995.
- [246] S. L. Schwartz, C. Cao, O. Pylypenko, A. Rak, and A. Wandinger-Ness. Rab GTPases at a glance. *J. Cell. Sci.*, 120(Pt 22):3905–3910, Nov 2007.
- [247] H. Schwarzenbach, C. Alix-Panabieres, I. Muller, N. Letang, J. P. Vendrell, X. Rebillard, and K. Pantel. Cell-free tumor DNA in blood plasma as a marker for circulating tumor cells in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 15(3):1032–1038, Feb 2009.
- [248] H. Schwarzenbach, F. K. Chun, I. Lange, S. Carpenter, M. Gottberg, A. Erbersdobler, M. G. Friedrich, H. Huland, and K. Pantel. Detection of tumor-specific DNA in blood and bone marrow plasma from patients with prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 120(7):1465–1471, Apr 2007.
- [249] H. Schwarzenbach, D. S. Hoon, and K. Pantel. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer*, 11(6):426–437, Jun 2011.

- [250] H. Schwarzenbach, V. Muller, C. Beeger, M. Gottberg, N. Stahmann, and K. Pantel. A critical evaluation of loss of heterozygosity detected in tumor tissues, blood serum and bone marrow plasma from patients with breast cancer. *Breast Cancer Res.*, 9(5):R66, 2007.
- [251] H. Schwarzenbach, J. Stoehlmacher, K. Pantel, and E. Goekkurt. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1137:190-196, Aug 2008.
- [252] A. Semaan, A. M. Qazi, S. Seward, S. Chamala, C. S. Bryant, S. Kumar, R. Morris, C. P. Steffes, D. L. Bouwman, A. R. Munkarah, D. W. Weaver, S. A. Gruber, and R. B. Batchu. MicroRNA-101 inhibits growth of epithelial ovarian cancer by relieving chromatin-mediated transcriptional repression of p21(waf¹/cip¹). *Pharm. Res.*, 28(12):3079-3090, Dec 2011.
- [253] G. Sharma, S. Mirza, C. P. Prasad, A. Srivastava, S. D. Gupta, and R. Ralhan. Promoter hypermethylation of p16INK4A, p14ARF, CyclinD2 and Slit2 in serum and tumor DNA from breast cancer patients. *Life Sci.*, 80(20):1873-1881, Apr 2007.
- [254] J. M. Silva, J. M. Garcia, G. Dominguez, J. Silva, C. Miralles, B. Cantos, S. Coca, M. Provencio, P. Espana, and F. Bonilla. Persistence of tumor DNA in plasma of breast cancer patients after mastectomy. *Ann. Surg. Oncol.*, 9(1):71-76, 2002.
- [255] J. M. Silva, J. Silva, A. Sanchez, J. M. Garcia, G. Dominguez, M. Provencio, L. Sanfrutos, E. Jareno, A. Colas, P. Espana, and F. Bonilla. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clin. Cancer Res.*, 8(12):3761-3766, Dec 2002.
- [256] R. J. Simpson, S. S. Jensen, and J. W. Lim. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics*, 8(19):4083-4099, Oct 2008.
- [257] B. Singh, A. M. Ronghe, A. Chatterjee, N. K. Bhat, and H. K. Bhat. MicroRNA-93 regulates NRF2 expression and is associated with breast carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 34(5):1165-1172, May 2013.
- [258] S. E. Singletary, C. Allred, P. Ashley, L. W. Bassett, D. Berry, K. I. Bland, P. I. Borgen, G. Clark, S. B. Edge, D. F. Hayes, L. L. Hughes, R. V. Hutter, M. Morrow, D. L. Page, A. Recht, R. L. Theriault, A. Thor, D. L. Weaver, H. S. Wieand, and F. L. Greene. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 20(17):3628-3636, Sep 2002.
- [259] H. P. Sinn, B. Helmchen, and C. H. Wittekind. [TNM classification of breast cancer: changes and comments on the 7th edition]. *Pathologe*, 31(5):361-366, Sep 2010.
- [260] J. Skog, T. Wurdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W. T. Curry, B. S. Carter, A. M. Krichevsky, and X. O. Breakefield. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.*, 10(12):1470-1476, Dec 2008.

- [261] B. D. Smith, D. W. Arthur, T. A. Buchholz, B. G. Haffty, C. A. Hahn, P. H. Hardenbergh, T. B. Julian, L. B. Marks, D. A. Todor, F. A. Vicini, T. J. Whelan, J. White, J. Y. Wo, and J. R. Harris. Accelerated partial breast irradiation consensus statement from the American Society for Radiation Oncology (ASTRO). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 74(4):987–1001, Jul 2009.
- [262] M. Smits, J. Nilsson, S. E. Mir, P. M. van der Stoop, E. Hulleman, J. M. Niers, P. C. de Witt Hamer, V. E. Marquez, J. Cloos, A. M. Krichevsky, D. P. Noske, B. A. Tannous, and T. Wurdinger. miR-101 is down-regulated in glioblastoma resulting in EZH2-induced proliferation, migration, and angiogenesis. *Oncotarget*, 1(8):710–720, Dec 2010.
- [263] G. Song and L. Wang. MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus. *PLoS ONE*, 3(10):e3574, 2008.
- [264] J. A. Sparano and S. Paik. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials. *J. Clin. Oncol.*, 26(5):721–728, Feb 2008.
- [265] O. J. Stoetzer, D. M. Fersching, C. Salat, O. Steinkohl, C. J. Gabka, U. Hamann, M. Braun, A. M. Feller, V. Heinemann, B. Siegele, D. Nagel, and S. Holdenrieder. Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients by circulating apoptotic biomarkers nucleosomes, DNase, cytokeratin-18 fragments and survivin. *Cancer Lett.*, 336(1):140–148, Aug 2013.
- [266] B. D. Stollar and F. Stephenson. Apoptosis and nucleosomes. *Lupus*, 11(12):787–789, 2002.
- [267] J. D. Strehl, D. L. Wachter, P. A. Fasching, M. W. Beckmann, and A. Hartmann. Invasive Breast Cancer: Recognition of Molecular Subtypes. *Breast Care (Basel)*, 6(4):258–264, 2011.
- [268] M. Stroun, P. Anker, J. Lyautey, C. Lederrey, and P. A. Maurice. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23(6):707–712, Jun 1987.
- [269] M. Stroun, P. Anker, P. Maurice, J. Lyautey, C. Lederrey, and M. Beljanski. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46(5):318–322, 1989.
- [270] Y. Sun, M. Wang, G. Lin, S. Sun, X. Li, J. Qi, and J. Li. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS ONE*, 7(10):e47003, 2012.
- [271] M. Szajnik, M. Czystowska, M. J. Szczepanski, M. Mandapathil, and T. L. Whiteside. Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS ONE*, 5(7):e11469, 2010.
- [272] B. Taback, S. Saha, and D. S. Hoon. Comparative analysis of mesenteric and peripheral blood circulating tumor DNA in colorectal cancer patients. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1075:197–203, Sep 2006.
- [273] J. E. Talmadge and I. J. Fidler. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.*, 70(14):5649–5669, Jul 2010.

- [274] E. M. Tan, P. H. Schur, R. I. Carr, and H. G. Kunkel. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.*, 45(11):1732–1740, Nov 1966.
- [275] V. Tarasov, P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister, and H. Hermeking. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, 6(13):1586–1593, Jul 2007.
- [276] D. D. Taylor and C. Gerceel-Taylor. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, 110(1):13–21, Jul 2008.
- [277] D. D. Taylor, C. Gerceel-Taylor, K. S. Lyons, J. Stanson, and T. L. Whiteside. T-cell apoptosis and suppression of T-cell receptor/CD3-zeta by Fas ligand-containing membrane vesicles shed from ovarian tumors. *Clin. Cancer Res.*, 9(14):5113–5119, Nov 2003.
- [278] C. Thery. Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biol Rep*, 3:15, 2011.
- [279] S. Thiagalingam, S. Laken, J. K. Willson, S. D. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and C. Lengauer. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(5):2698–2702, Feb 2001.
- [280] E. Tokunaga, S. Okada, N. Yamashita, S. Akiyoshi, H. Kitao, M. Morita, Y. Kakeji, and Y. Maehara. High incidence and frequency of LOH are associated with aggressive features of high-grade HER2 and triple-negative breast cancers. *Breast Cancer*, 19(2):161–169, Apr 2012.
- [281] M. Tsujiura, D. Ichikawa, S. Komatsu, A. Shiozaki, H. Takeshita, T. Kosuga, H. Konishi, R. Morimura, K. Deguchi, H. Fujiwara, K. Okamoto, and E. Otsuji. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br. J. Cancer*, 102(7):1174–1179, Mar 2010.
- [282] A. Turchinovich, L. Weiz, A. Langheinze, and B. Burwinkel. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res.*, 39(16):7223–7233, Sep 2011.
- [283] N. C. Turner, J. S. Reis-Filho, A. M. Russell, R. J. Springall, K. Ryder, D. Steele, K. Savage, C. E. Gillett, F. C. Schmitt, A. Ashworth, and A. N. Tutt. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, 26(14):2126–2132, Mar 2007.
- [284] J. W. Uhr and K. Pantel. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108(30):12396–12400, Jul 2011.
- [285] N. Umetani, A. E. Giuliano, S. H. Hiramatsu, F. Amersi, T. Nakagawa, S. Martino, and D. S. Hoon. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J. Clin. Oncol.*, 24(26):4270–4276, Sep 2006.
- [286] H. Valadi, K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee, and J. O. Lotvall. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 9(6):654–659, Jun 2007.

- [287] G. van Niel, S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, M. S. Marks, E. Rubinstein, and G. Raposo. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Dev. Cell*, 21(4):708–721, Oct 2011.
- [288] E. van Rooij, L. B. Sutherland, X. Qi, J. A. Richardson, J. Hill, and E. N. Olson. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 316(5824):575–579, Apr 2007.
- [289] E. van Schooneveld, M. C. Wouters, I. Van der Auwera, D. J. Peeters, H. Wildiers, P. A. Van Dam, I. Vergote, P. B. Vermeulen, L. Y. Dirix, and S. J. Van Laere. Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Res.*, 14(1):R34, 2012.
- [290] C. van Solingen, L. Seghers, R. Bijkerk, J. M. Duijs, M. K. Roeten, A. M. van Oeveren-Rietdijk, H. J. Baelde, M. Monge, J. B. Vos, H. C. de Boer, P. H. Quax, T. J. Rabelink, and A. J. van Zonneveld. Antagomir-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.*, 13(8A):1577–1585, Aug 2009.
- [291] S. Vatolin, Z. Abdullaev, S. D. Pack, P. T. Flanagan, M. Custer, D. I. Loukinov, E. Pugacheva, J. A. Hong, H. Morse, D. S. Schrupp, J. I. Risinger, J. C. Barrett, and V. V. Lobanenko. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res.*, 65(17):7751–7762, Sep 2005.
- [292] J. M. Veltmaat, W. Van Veelen, J. P. Thiery, and S. Bellusci. Identification of the mammary line in mouse by Wnt10b expression. *Dev. Dyn.*, 229(2):349–356, Feb 2004.
- [293] B. Vester and J. Wengel. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*, 43(42):13233–13241, Oct 2004.
- [294] K. C. Vickers, B. T. Palmisano, B. M. Shoucri, R. D. Shamburek, and A. T. Remaley. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat. Cell Biol.*, 13(4):423–433, Apr 2011.
- [295] V. Vinh-Hung and C. Verschraegen. Breast-conserving surgery with or without radiotherapy: pooled-analysis for risks of ipsilateral breast tumor recurrence and mortality. *J. Natl. Cancer Inst.*, 96(2):115–121, Jan 2004.
- [296] S. Volinia, G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris, and C. M. Croce. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(7):2257–2261, Feb 2006.
- [297] P. M. Voorhoeve, C. le Sage, M. Schrier, A. J. Gillis, H. Stoop, R. Nagel, Y. P. Liu, J. van Duijse, J. Drost, A. Griekspoor, E. Zlotorynski, N. Yabuta, G. De Vita, H. Nojima, L. H. Looijenga, and R. Agami. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 124(6):1169–1181, Mar 2006.

- [298] M. Wakiyama, K. Takimoto, O. Ohara, and S. Yokoyama. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.*, 21(15):1857–1862, Aug 2007.
- [299] B. G. Wang, H. Y. Huang, Y. C. Chen, R. E. Bristow, K. Kassauei, C. C. Cheng, R. Roden, L. J. Sokoll, D. W. Chan, and I. e. M. Shih. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.*, 63(14):3966–3968, Jul 2003.
- [300] F. Wang, Z. Zheng, J. Guo, and X. Ding. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol. Oncol.*, 119(3):586–593, Dec 2010.
- [301] M. Wang, T. M. Block, L. Steel, D. E. Brenner, and Y. H. Su. Preferential isolation of fragmented DNA enhances the detection of circulating mutated k-ras DNA. *Clin. Chem.*, 50(1):211–213, Jan 2004.
- [302] R. Wang, H. B. Wang, C. J. Hao, Y. Cui, X. C. Han, Y. Hu, F. F. Li, H. F. Xia, and X. Ma. MiR-101 is involved in human breast carcinogenesis by targeting Stathmin1. *PLoS ONE*, 7(10):e46173, 2012.
- [303] Y. Wang, D. Cortez, P. Yazdi, N. Neff, S. J. Elledge, and J. Qin. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*, 14(8):927–939, Apr 2000.
- [304] C. J. Watson and W. T. Khaled. Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development*, 135(6):995–1003, Mar 2008.
- [305] B. Weigelt, H. M. Horlings, B. Kreike, M. M. Hayes, M. Hauptmann, L. F. Wessels, D. de Jong, M. J. Van de Vijver, L. J. Van't Veer, and J. L. Peterse. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J. Pathol.*, 216(2):141–150, Oct 2008.
- [306] B. Weigelt, J. L. Peterse, and L. J. van 't Veer. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer*, 5(8):591–602, Aug 2005.
- [307] B. Weigelt and J. S. Reis-Filho. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*, 6(12):718–730, Dec 2009.
- [308] S. R. Wellings and H. M. Jensen. On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50(5):1111–1118, May 1973.
- [309] S. R. Wellings, H. M. Jensen, and R. G. Marcum. An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55(2):231–273, Aug 1975.
- [310] H. Wikman, R. Vessella, and K. Pantel. Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS*, 116:754–770, 2008.
- [311] P. Wimberger, C. Roth, K. Pantel, S. Kasimir-Bauer, R. Kimmig, and H. Schwarzenbach. Impact of platinum-based chemotherapy on circulating nucleic acid levels, protease activities in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of ovarian cancer patients. *Int. J. Cancer*, 128(11):2572–2580, Jun 2011.

- [312] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.*, 11(3):228–234, Mar 2009.
- [313] F. Wischniewski, O. Friese, K. Pantel, and H. Schwarzenbach. Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters. *Mol. Cancer Res.*, 5(7):749–759, Jul 2007.
- [314] F. Wischniewski, K. Pantel, and H. Schwarzenbach. Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol. Cancer Res.*, 4(5):339–349, May 2006.
- [315] J. Wolfers, A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Puzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, and L. Zitvogel. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.*, 7(3):297–303, Mar 2001.
- [316] A. Woloszynska-Read, S. R. James, C. Song, B. Jin, K. Odunsi, and A. R. Karpf. BORIS/CTCF expression is insufficient for cancer-germline antigen gene expression and DNA hypomethylation in ovarian cell lines. *Cancer Immun.*, 10:6, 2010.
- [317] L. Wu, J. Fan, and J. G. Belasco. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(11):4034–4039, Mar 2006.
- [318] X. Xiang, X. Zhuang, S. Ju, S. Zhang, H. Jiang, J. Mu, L. Zhang, D. Miller, W. Grizzle, and H. G. Zhang. miR-155 promotes macroscopic tumor formation yet inhibits tumor dissemination from mammary fat pads to the lung by preventing EMT. *Oncogene*, 30(31):3440–3453, Aug 2011.
- [319] L. Yang, X. H. Wu, D. Wang, C. L. Luo, and L. X. Chen. Bladder cancer cell-derived exosomes inhibit tumor cell apoptosis and induce cell proliferation in vitro. *Mol Med Rep*, 8(4):1272–1278, Oct 2013.
- [320] W. Yang, T. P. Chendrimada, Q. Wang, M. Higuchi, P. H. Seeburg, R. Shiekhattar, and K. Nishikura. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13(1):13–21, Jan 2006.
- [321] S. Yekta, I. H. Shih, and D. P. Bartel. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 304(5670):594–596, Apr 2004.
- [322] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, 17(24):3011–3016, Dec 2003.
- [323] E. M. Youssef, X. Q. Chen, E. Higuchi, Y. Kondo, G. Garcia-Manero, R. Lotan, and J. P. Issa. Hypermethylation and silencing of the putative tumor suppressor Tazarotene-induced gene 1 in human cancers. *Cancer Res.*, 64(7):2411–2417, Apr 2004.
- [324] Z. Yu, N. E. Willmarth, J. Zhou, S. Katiyar, M. Wang, Y. Liu, P. A. McCue, A. A. Quong, M. P. Lisanti, and R. G. Pestell. microRNA 17/20 inhibits cellular invasion and tumor metastasis in breast cancer by heterotypic signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(18):8231–8236, May 2010.

- [325] Y. Zeng and B. R. Cullen. Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA*, 9(1):112–123, Jan 2003.
- [326] Y. Zeng and B. R. Cullen. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.*, 32(16):4776–4785, 2004.
- [327] Y. Zeng and B. R. Cullen. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.*, 280(30):27595–27603, Jul 2005.
- [328] B. Zhang, X. Pan, G. P. Cobb, and T. A. Anderson. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev. Biol.*, 302(1):1–12, Feb 2007.
- [329] J. G. Zhang, J. F. Guo, D. L. Liu, Q. Liu, and J. J. Wang. MicroRNA-101 exerts tumor-suppressive functions in non-small cell lung cancer through directly targeting enhancer of zeste homolog 2. *J Thorac Oncol*, 6(4):671–678, Apr 2011.
- [330] L. Zhang, J. Huang, N. Yang, J. Greshock, M. S. Megraw, A. Giannakakis, S. Liang, T. L. Naylor, A. Barchetti, M. R. Ward, G. Yao, A. Medina, A. O'brien-Jenkins, D. Katsaros, A. Hatzigeorgiou, P. A. Gimotty, B. L. Weber, and G. Coukos. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103(24):9136–9141, Jun 2006.
- [331] H. Zhao, J. Shen, L. Medico, D. Wang, C. B. Ambrosone, and S. Liu. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS ONE*, 5(10):e13735, 2010.
- [332] W. Zhu, W. Qin, U. Atasoy, and E. R. Sauter. Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes*, 2:89, 2009.
- [333] L. Zitvogel, A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Raposo, and S. Amigorena. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.*, 4(5):594–600, May 1998.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Arbeit unterstützt haben.

Frau PD Dr. Heidi Schwarzenbach für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, sowie ihrer freundlichen und engagierten Betreuung, ihre Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Anregungen während der Anfertigung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel, dem Direktor des Instituts für Tumorbilogie, für die Möglichkeit diese Arbeit an seinem Institut in einem hervorragenden Arbeitsumfeld anfertigen zu können und seine fachkundige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Udo Wienand für seine Bereitschaft als Vertreter der biologischen Fakultät meine Dissertation zu begutachten.

Herrn Prof. Dr. Dieter Flesch-Janys und Frau Prof. Dr. Jenny Chang-Claude für die Überlassung der Blutproben und der klinischen Daten der Mammakarzinompatientinnen der MARIE-Studie.

Herrn Prof. Dr. Volkmar Müller und Frau Dr. Karin Milde-Langosch für die Überlassung der Blutproben und der klinischen Daten der Mammakarzinompatientinnen der Gynäkologie des UKE.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des ITB und insbesondere meiner Arbeitsgruppe, die mich herzlich aufgenommen und stets unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Aufmunterung während der gesamten Zeit.