

**Identifizierung und Validierung potentieller Serumbiomarker für
die Brustkrebs-Früherkennung sowie Analyse ihrer
prognostischen und funktionellen Relevanz für das humane
Mammakarzinom**

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

vorgelegt von

Diplom-Biologe Stefan Garczyk

aus Waldbröl

Berichter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Edgar Dahl

Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Björn Usadel

Tag der mündlichen Prüfung: 09. März 2016

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Zusammenfassung	XII
Summary	XIV
Abkürzungsverzeichnis	XVI
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Epidemiologie des humanen Mammakarzinoms	1
1.2 Die Anatomie der weiblichen Brust	2
1.3 Histologische und molekulargenetische Klassifizierung des humanen Mammakarzinoms	3
1.4 Allgemeine Tumorgenese	6
1.5 Molekulargenetische Mechanismen der Tumorgenese	9
1.5.1 Bedeutende Proto-Onkogene im humanen Mammakarzinom	10
1.5.2 Bedeutende Tumorsuppressorgene im humanen Mammakarzinom	11
1.6 Anwendungsbereiche von Biomarkern	12
1.6.1 Brustkrebs-Früherkennung	13
1.6.2 Biomarker für die Brustkrebs-Früherkennung	15
1.6.3 Mikrofluide Chip-Technologien für die Krebs-Früherkennung.....	16
1.6.4 Prognostische und prädiktive Marker für das Mammakarzinom	17
1.7 Kandidatengene dieser Arbeit und involvierte Signalwege	18
1.7.1 Die <i>Anterior Gradient</i> (AGR)- Proteinfamilie	18
1.7.2 Der WNT-Signalweg.....	20
1.7.2.1 Der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg	21
1.7.2.2 Der WNT/PCP-Signalweg.....	23
1.7.3 Die CELSR-Proteinfamilie	24
1.7.4 Das Protein Collagen Triple Helix Repeat-Containing 1 (CTHRC1).....	27
1.7.5 Die Neuromedin-Peptid-Familie	29

1.8	Zielsetzung der Arbeit	31
2	Material und Methoden.....	34
2.1	Klinisches Patientenmaterial	34
2.1.1	Kryokonserviertes humanes Frischgewebe	34
2.1.2	Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE).....	34
2.1.3	Kryokonserviertes humanes Serum.....	35
2.1.4	<i>In silico</i> -Mammakarzinom-Studie.....	35
2.2	Bakterienstämme	36
2.3	Humane Mammakarzinom-Zelllinien	36
2.4	Geräte, Software, Chemikalien und Lösungsmittel.....	37
2.4.1	Geräte	37
2.4.2	Software und Datenbanken	38
2.4.3	Chemikalien	38
2.4.4	Lösungsmittel.....	39
2.5	Puffer und Lösungen	39
2.6	Medien für die Zellkultur	40
2.7	Medien für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	41
2.8	Antikörper und <i>Blocking</i> -Peptide	41
2.9	Molekularbiologische Kits	42
2.10	Enzyme für die Plasmid-Klonierung	43
2.11	Rekombinantes Protein.....	43
2.12	Oligonukleotide	43
2.13	Vektoren	45
2.13.1	Überexpressions-Vektoren	45
2.13.1.1	pT-REx-DEST30	45
2.13.1.2	pMS-L-SNAP-mut 2715 IV	46
2.13.2	shRNA-Plasmide	47
2.14	siRNA	48

2.15	Molekulargenetische Methoden	48
2.15.1	Isolation genomischer DNA aus humanem kryokonserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien	48
2.15.2	Gesamt-RNA-Isolation aus humanem kryokonserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien	49
2.15.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen	49
2.15.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	50
2.15.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50
2.15.6	Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese	52
2.15.7	Semiquantitative <i>Real-Time</i> -PCR (RT-PCR)	52
2.15.8	DNA-Sequenzierung nach Sanger	54
2.15.9	Klonierung von Überexpressions-Vektoren zur Herstellung rekombinanter Proteine	56
2.15.9.1	PCR mit Linker-Primern	56
2.15.9.2	Reinigung von DNA-Amplifikaten und –Fragmenten nach Restriktionsverdau	56
2.15.9.3	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung linearer Vektor-DNA	57
2.15.9.4	Ligation	57
2.15.10	Transformation von <i>E.coli</i>	58
2.15.11	Inokulation von Flüssigkulturen transformierter <i>E.coli</i>	58
2.15.12	Plasmid-Mini-Präparation	59
2.15.13	Plasmid-Maxi-Präparation	59
2.16	Proteinchemische und immunologische Methoden	59
2.16.1	Herstellung von Schnitten aus humanem Gewebematerial	59
2.16.2	Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung humaner Frischgewebe	59
2.16.3	Methylenblau-Färbung humaner Frischgewebe	60
2.16.4	Immunhistochemie (IHC) an humanem Paraffinmaterial	60
2.16.4.1	Vorbehandlung von Paraffin-Gewebeschnitten für die IHC	60
2.16.4.2	Immunhistochemische Färbung	61

2.16.5	Isolation von Gesamtprotein aus humanem kryokonserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien	62
2.16.6	Albumin (HSA)- und IgG-Abreicherung humaner Serumproben.....	63
2.16.7	Proteinnachweis in konditioniertem Medium humaner Mammakarzinom-Zelllinien	64
2.16.8	Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen mittels Bicinchoninsäure ..	64
2.16.9	Nachweis der aktiven Form kleiner G-Proteine mittels <i>Pulldown-Assay</i>	65
2.16.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
2.16.11	Westernblotting und Immunodetektion	67
2.16.12	Ponceau S-Färbung	68
2.16.13	Peptid-Kompetitions-Assay (PCA)	69
2.16.14	Quantitativer Antigen-Nachweis in humanem Blutserum mittels ELISA	69
2.17	Zellbiologische Methoden	71
2.17.1	Kultivierung humaner Zelllinien	71
2.17.2	Ernte humaner Zelllinien	71
2.17.3	Kryokonservierung und Inkulturnahme humaner Zelllinien	72
2.17.4	Zellzahlbestimmung	72
2.17.5	Generierung stabiler genetisch-veränderter Mammakarzinom-Zelllinien	72
2.17.5.1	G418-Konzentrationsbestimmung	73
2.17.5.2	Lipofektion	74
2.17.6	RNA-Interferenz (RNAi)	75
2.18	Funktionelle <i>in vitro</i> -Experimente	76
2.18.1	XTT-Proliferationstest	76
2.18.2	Koloniebildungstest (<i>Colony Formation Assay</i> , CFA)	77
2.18.3	Caspase 3/7-Aktivitätsmessung	78
2.18.4	Zell-Matrix-Adhäsionstest	78
2.18.5	Wundheilungstest	79
2.18.6	<i>Boyden Chamber</i> -Migrationstest	80

2.18.7	Induzierter Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER).....	81
2.18.8	<i>Microarray</i> -basierte Genexpressionsanalyse des SKBR3 NMU-Tumormodells	82
2.19	Statistische Methoden.....	83
3	Ergebnisse.....	84
3.1	Identifizierung und Validierung potentieller Proteinbiomarker für die Blut-basierte Brustkrebs-Früherkennung	84
3.1.1	Erste Stufe: Identifizierung potentieller Proteinbiomarker	84
3.1.1.1	Expression der Biomarker-Kandidaten in humanen Mammakarzinom- Zelllinien.....	85
3.1.1.2	Nachweis von CELSR1-Protein im konditionierten Medium humaner Mammakarzinom-Zelllinien	88
3.1.1.3	Expression der Biomarker-Kandidaten in humanen Mammakarzinomen und Brust-Normalgeweben.....	89
3.1.1.3.1	Der Biomarker-Kandidat AGR3	90
3.1.1.3.2	Weitere Biomarker-Kandidaten	98
3.1.2	Zweite Stufe: Validierung potentieller Serumbiomarker im humanen Serum.	104
3.2	Prognostische und funktionelle Relevanz ausgewählter Kandidaten für das Mammakarzinom.....	108
3.2.1	Der Kandidat AGR3	108
3.2.1.1	AGR3 ist ein prognostischer Faktor für einen ungünstigen Verlauf des gut bis mittelgradig differenzierten Mammakarzinoms	108
3.2.1.2	Der Einfluss von AGR3 auf die Koloniebildungsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen	111
3.2.1.3	Analyse der ER-Stressinduktion von AGR3 in humanen Brustkrebszellen.	113
3.2.2	Der Kandidat CELSR1	115
3.2.2.1	Die Analyse der prognostischen Relevanz von CELSR1 für das humane Mammakarzinom.....	115
3.2.2.2	Generierung eines transienten CELSR1-Expressionsverlustes in MCF7- Brustkrebszellen	116

3.2.2.3	Der Einfluss von CELSR1 auf das Zellwachstum humaner Mamma- karzinomzellen.....	118
3.2.2.4	Der Einfluss von CELSR1 auf die Koloniebildung humaner Mamma- karzinomzellen.....	119
3.2.2.5	Der Einfluss von CELSR1 auf die Migrationsfähigkeit humaner Mamma- karzinomzellen.....	120
3.2.2.6	Der Einfluss von CELSR1 auf die Zell-Matrix-Adhäsion humaner Mammakarzinomzellen	123
3.2.3	Der Kandidat CTHRC1	124
3.2.3.1	Die Analyse der prognostischen Relevanz von CTHRC1 für das humane Mammakarzinom.....	124
3.2.3.2	Generierung eines transienten CTHRC1-Expressionsverlustes in BT549- Brustkrebszellen	126
3.2.3.3	Der Einfluss von CTHRC1 auf die Migrationsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen	127
3.2.4	Der Kandidat NMU	131
3.2.4.1	Analyse der NMU-Expression in humanen Brusttumoren.....	131
3.2.4.2	Die Analyse der prognostischen Relevanz von NMU für das humane Mammakarzinom.....	133
3.2.4.3	Generierung stabiler in vitro-Mammakarzinom-Modelle	136
3.2.4.4	Der Einfluss von NMU auf das Zellwachstum humaner Mammakarzinomzellen	138
3.2.4.5	Der Einfluss von NMU auf die Koloniebildung humaner Mammakarzinomzellen	139
3.2.4.6	Der Einfluss von NMU auf die Apoptose humaner Mammakarzinomzellen	141
3.2.4.7	Der Einfluss von NMU auf die Migrationsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen	142
3.2.4.8	Der Einfluss von NMU auf die Zell-Matrix-Adhäsion humaner Mammakarzinomzellen	146

3.2.4.9	Expression potentieller NMU-Rezeptoren in Mammakarzinomzellen des luminalen und basalen Subtyps	148
3.2.4.10	Identifizierung NMU-modulierter biologischer Prozesse und –assoziierter Genexpressions-Muster im luminalen SKBR3-Modell	149
3.2.4.11	NMU-induzierte Modulation des WNT-Rezeptor-Signalweges in luminalen SKBR3-Brustkrebszellen	152
4	Diskussion	157
4.1	Identifizierung und Validierung potentieller Proteinbiomarker für die Blut-basierte Brustkrebs-Früherkennung	157
4.2	Prognostische und funktionelle Relevanz ausgewählter Kandidaten für das Mammakarzinom.....	162
4.2.1	Der Kandidat AGR3	163
4.2.2	Der Kandidat CELSR1	165
4.2.3	Der Kandidat CTHRC1	167
4.2.4	Der Kandidat NMU	170
4.3	Schlussfolgerungen.....	176
5	Literaturverzeichnis	178
6	Anhang.....	205
6.1	Eigenschaften verwendeter Patienten-Kohorten	205
6.2	Klassifizierung maligner Tumoren der Brust	209
6.2.1	<i>Staging</i> des humanen Mammakarzinoms.....	209
6.2.2	Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms.....	210
6.3	Abbildungsverzeichnis	211
6.4	Tabellenverzeichnis	215
6.5	Eidesstattliche Erklärung	218
6.6	Danksagung	219

Zusammenfassung

Die *Screening*-Mammographie, das Standard-Verfahren für die Brustkrebs-Früherkennung, weist bekannte Limitationen auf, die eine unzureichende klinische *Performance* bedingen. Dies unterstreicht den Bedarf an neuen, komplementären *Screening*-Strategien für die Brustkrebs-Früherkennung. Hier hat die Identifizierung neuer Proteinbiomarker, welche mittels minimal-invasiver Verfahren im Blutserum detektierbar sind, ein großes Potential für die Früherkennung maligner Erkrankungen und war ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit. Aus einem 15 Kandidaten umfassenden *Pool* potentieller Serum-Proteinbiomarker konnten, basierend auf einem zweistufigen Validierungs-Modell, die Proteine AGR3 und AGR2 erstmals als neue potentielle Biomarker für die Blutserum-basierte Früherkennung des humanen Mammakarzinoms identifiziert und validiert werden. Die Kombination der ELISA-basierten Serumkonzentrationen beider putativer Marker zu einem Biomarker-Duplett, erlaubte schließlich die Diskriminierung von Brustkrebs-Patientinnen (n=32) und gesunden Spenderinnen (n=19) mit einer klinischen Sensitivität von 64,5% bei einer klinischen Spezifität von 89,5% (AUC: 0,827; KI: 0,693 bis 0,962; $P < 0,001$).

Die onkologische Forschung verfolgt zudem das Ziel der Karzinogenese zugrunde liegende zentrale Moleküle und Signalwege zu charakterisieren, welche potentiell therapeutische Zielstrukturen darstellen bzw. deren mögliches, prognostisches Potential den Kliniker bei der Wahl individueller Therapien mit größtmöglichem Patienten-*Benefit* unterstützen kann. Die zu Beginn dieser Arbeit im humanen Mammakarzinom noch kaum bzw. nicht untersuchten Gene *AGR3*, *CELSR1*, *CTHRC1* und *NMU* sollten hinsichtlich ihrer potentiellen Nutzbarkeit als prognostische Biomarker sowie ihrer möglichen kausalen Involvierung in die Karzinogenese des Mammakarzinoms analysiert werden. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression des zur Proteindisulfidomerase-Familie zählenden Proteins AGR3 im Mammakarzinom einen möglichen, unabhängigen prognostischen Faktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf von G1/G2-Brustkrebs-Fällen darstellt (multivariate *Hazard-Rate*: 2,186; 95% KI: 1,008 – 4,740; $P < 0,05$). Im Einklang mit den prognostischen Daten konnte darüber hinaus ein fördernder Effekt von AGR3 auf das Zellwachstum gut differenzierter MCF7-Brustkrebszellen in einem stabilen *loss-of-function*-Modell herausgestellt werden ($P < 0,01$), was die Hypothese eines onkogenen Einflusses von AGR3 auf gut/mäßig differenzierte Brustkrebszellen unterstützt.

Für den Rezeptor *CELSR1* ergab eine erstmalige Subtyp-spezifische Expressionsanalyse im Mammakarzinom eine signifikante Assoziation der mRNA-Expression mit Hormonrezeptor-positiven Fällen ($P < 0,001$) und niedrigerem Tumorgrad ($P < 0,01$). Eine signifikante ($P <$

0,001) Korrelation einer hohen *CELSR1*-mRNA-Expression im Mammakarzinom mit einem verlängerten Rezidiv-freien Überleben sowie eine Stimulation des Zellwachstums ($P < 0,001$) infolge eines transienten *CELSR1*-Expressionsverlustes in gut differenzierten, luminalen MCF7-Brustkrebszellen, implizieren mögliche tumorsuppressive Effekte des Proteins im Brustkrebs.

Das Glykoprotein CTHRC1 wurde bereits in einigen soliden Tumoren einschließlich des Mammakarzinoms als aberrant exprimiert und zudem als möglicher progressionsfördernder Faktor beschrieben. Darauf aufbauend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine CTHRC1-vermittelte Stimulation der Zellmigration und damit möglicherweise eine Involvierung in Metastasierungsprozesse dieser Entität anhand eines BT549 *loss-of-function*-Brustkrebs-Modells demonstriert werden.

Das Neuropeptid NMU wurde in allen klinisch-relevanten Brustkrebs-Subtypen signifikant ($P < 0,001$) gegenüber der Normalgewebe-Expression als aufreguliert identifiziert, mit der stärksten Expression in nicht-luminalen Tumoren. Interessanterweise konnte eine verstärkte *NMU*-Expression in größeren Brusttumoren ($> pT1$) sowie eine auf den luminalen Subtypen beschränkte signifikante Assoziation einer erhöhten *NMU*-Expression mit einem verkürzten Rezidiv- und Fernmetastasen-freien Überleben herausgestellt werden ($P < 0,001$ und $P < 0,05$). Im Einklang hiermit führte die stabile *NMU*-Überexpression in luminalen SKBR3-, jedoch nicht in basalen Hs578T-Zellen, zur Ausprägung eines malignen Phänotyps, charakterisiert durch eine signifikant gesteigerte Zellmotilität bei signifikant verringerter Proliferation. Hinsichtlich eines zugrunde liegenden Mechanismus, konnten auf Basis einer genomweiten *Microarray*-Expressionsanalyse neue *NMU*-assoziierte Signalwege und involvierte Gene in luminalen SKBR3-Brustkrebszellen entschlüsselt werden. So zeigte sich u.a. eine mit der *NMU*-Expression einhergehende Modulation des WNT-Signalweges, resultierend in einer gesteigerten Aktivierung der kleinen GTPase RAC1 und einer Expressions-Herabregulation des Transkriptionsfaktors MYC. Diese Veränderungen könnten zur Entstehung motiler, gering proliferierender Krebszellen beitragen, die ein erhöhtes Potential zur Ausbildung von Metastasen aufweisen.

Zusammenfassend ist es gelungen mit AGR3 und AGR2 zwei neue putative Proteinbiomarker für die Blutserum-basierte Brustkrebs-Früherkennung zu identifizieren. Darüber hinaus konnte insbesondere mit *NMU* ein möglicher neuer progressions-assoziiierter Faktor im humanen Mammakarzinom charakterisiert werden, welcher möglicherweise das Potential für eine klinische Nutzung als prognostischer Parameter bzw. als therapeutische Zielstruktur aufweist.

Summary

Mammography has become the standard of care for breast cancer screening although several limitations are known resulting in reduced clinical sensitivity and specificity. Owing to these limitations minimally-invasive novel screening tests are desirable to complement screening mammography. As measurement of protein biomarkers present in bodily fluids (e.g. serum) constitutes a promising tool for early detection of breast cancer, the identification of novel candidates was an aim of this study.

Based on a two-step validation procedure using human tissue and serum cohorts of human breast cancer (n=40) and healthy serum samples (n=40) we identified AGR3 and AGR2 from an initial pool of 15 candidates as novel potential protein biomarkers for blood-based early breast cancer detection. The combined AGR3/AGR2 biomarker panel achieved a clinical sensitivity of 64.5% and a specificity of 89.5% as shown by receiver operating characteristic (ROC) curve statistics (AUC: 0.827, CI: 0.693 – 0.962, $P < 0.001$).

Besides the aim of finding novel biomarkers for early diagnosis of cancer, molecular oncology research focuses on deciphering the molecular events underlying carcinogenesis. The identification of key molecules and signalling pathways of malignant cancer cells offers the opportunity to develop novel targeted cancer therapies. Furthermore, novel prognostic biomarkers are desirable, able to support the clinician's choice of a personalised therapy with a maximal benefit for the patient. Therefore the second focus of the present study was on the analysis of the putative usability of the novel cancer-associated genes *AGR3*, *CELSR1*, *CTHRC1* and *NMU* as prognostic factors as well as their possible causal involvement in the oncogenesis of human breast cancer.

High expression of the protein disulfide isomerase family-related protein AGR3 was significantly associated with an unfavourable outcome (multivariate hazard ratio: 2.186, 95% CI: 1.008 – 4.740, $P < 0.05$) in low (G1) and intermediate (G2) grade breast carcinomas indicating for the first time an independent prognostic impact of AGR3 in breast cancer. In line with the prognostic data, it could be demonstrated for the first time that stable knockdown of endogenous AGR3 protein significantly ($P < 0.01$) reduced cell growth of well differentiated, luminal MCF7 breast cancer cells suggesting a tumour-promoting function of AGR3, at least in well to moderately differentiated breast carcinomas.

Subtype-specific expression analysis for the adhesion G protein-coupled receptor CELSR1 in human breast cancer revealed a significant correlation between high *CELSR1* mRNA expression and both a positive hormone receptor status ($P < 0.001$) and lower tumour grade (G1/G2) ($P < 0.01$). Furthermore, univariate survival analysis showed that high *CELSR1* mRNA

expression significantly ($P < 0.001$) correlated with prolonged recurrence-free survival in breast carcinomas. In line, a transient knockdown of CELSR1 in luminal MCF7 breast cancer cells led to significantly increased cell growth ($P < 0.001$) suggesting altogether tumour-suppressive properties of CELSR1 in breast cancer.

The secreted glycoprotein CTHRC1 has recently been described as aberrantly expressed in several human malignancies including breast cancer as well as a factor potentially stimulating cancer cell migration, invasion and consequently metastasis. Here CTHRC1-mediated promotion of cell migration in motile BT549 breast cancer cells was reported for the first time indicating a putative involvement of CTHRC1 in breast cancer progression.

Conducting a subtype-specific mRNA expression analysis, the neuropeptide NMU was found being significantly ($P < 0.001$) up-regulated in all clinically relevant breast cancer subtypes compared to normal breast tissue controls, with the highest mRNA expression observed in HER2-enriched and basal-like carcinomas. In accordance with the recently described potential involvement of NMU in the progression of several malignancies, a pronounced *NMU* expression was noted in advanced breast carcinomas of larger size ($> pT1$). In further support of this notion, high *NMU* mRNA expression was significantly associated with reduced recurrence-free ($P < 0.001$) and distant metastasis-free survival ($P < 0.05$) of patients with luminal but not non-luminal carcinomas. In compliance with these findings, ectopic NMU over-expression facilitated a malignant phenotype in luminal-like SKBR3 but not basal-like Hs578T breast cancer cells. Stable NMU over-expressing SKBR3 single-cell clones were marked by a significantly enhanced cell motility and a reduced proliferative activity (for both $P < 0.001$) compared to empty vector control cells with low NMU expression. With regard to underlying mechanisms, NMU-associated pathways and putative involved key players were identified based on whole genome expression analysis employing the luminal SKBR3 breast cancer model. For example a NMU-induced modulation of WNT receptor signalling amongst other cancer-relevant pathways was observed, resulting in an enhanced activation of the small GTPase RAC1 as well as a down-regulation of MYC expression in SKBR3 NMU clones compared to controls. In turn, NMU-based effects on luminal breast cancer cells are potentially mediated by the receptor NMUR2. These findings may indicate a contribution of NMU to the development of a motile tumour cell phenotype with an increased potential to metastasise.

In summary, this study shows for the first time the potential usability of AGR3 and AGR2 as biomarkers for non-invasive early detection of human breast cancer from blood, while NMU was characterised as a new progression-associated factor in breast cancer.

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AGR2/3	<i>Anterior Gradient 2/3</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Adenomatöse <i>Polyposis coli</i>
AS	Aminosäure
ASPN	Asporin
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area Under Curve</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CELSR	<i>Cadherin epidermal growth factor laminin G seven-pass G-type receptor</i>
CIS	<i>Carcinoma in situ</i>
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid
CT	<i>Cycle Threshold</i> (Zyklusschwelle)
CTHRC1	<i>Collagen Triple Helix Repeat-Containing 1</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	Duktales <i>Carcinoma in situ</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DKK1	Dickkopf 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA

DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DVL	<i>Dishevelled</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FC	<i>Fold Change</i> (Änderungsgrad)
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FKS	Fetales Kälberserum
FMFÜ	Fernmetastasen-freies Überleben
FZD	<i>Frizzled</i>
G1/2/3	<i>Grade</i> 1/2/3 (histologischer Grad)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GPCR	<i>G-Protein-Coupled Receptor</i> (G-Protein-gekoppelter Rezeptor)
GÜ	Gesamtüberleben
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor-2</i>
His	Histidin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSA	Humanes Serumalbumin
IDC	Invasiv-duktales Karzinom
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
ILC	Invasiv-lobuläres Karzinom
IRS	Immunreaktiver <i>Score</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
KI	Konfidenzintervall
LEF	<i>Lymphoid enhancing Factor</i>
LRP5/6	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related 5/6</i>

mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	Anzahl
NKD1/2	<i>Naked</i> 1/2
NMU	Neuromedin U
NMUR1/2	Neuromedin U-Rezeptor 1/2
NTSR1	Neurotensin-Rezeptor 1
OD	Optische Dichte
P	Wert der Irrtumswahrscheinlichkeit
PCP	<i>Planar Cell Polarity</i> (Planare Zellpolarität)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pM	Fernmetastasierung (postoperativ bestimmt)
pN	Nodalstatus (postoperativ bestimmt)
PPi	Pyrophosphat
pT	Tumorgroße (postoperativ bestimmt)
RFÜ	Rezidiv-freies Überleben
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
ROC	<i>Receiver Operating Characteristics</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>Short hairpin</i> RNA
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCF	<i>T-Cell Factor</i>
TDLE	Terminalduktus-Lobulus-Einheit
TMA	<i>Tissue Microarray</i> (Gewebe-Mikroarray)
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union International Contre Le Cancer</i>

UK	Universitätsklinikum
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumenkonzentration
WHO	<i>World Health Organisation</i>
WNT	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen
XTT	2,3-bis(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-5((Phenylamino)Carbonyl)- 2H-Tetrazoliumhydroxid
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Die Epidemiologie des humanen Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom stellt die häufigste maligne Krebserkrankung der Frau in Deutschland und weltweit dar [1, 2]. Von den im Jahr 2010 deutschlandweit insgesamt 224.900 erfassten Krebsneuerkrankungen bei Frauen betrafen alleine rund 70.300 Fälle die Brustdrüse. Dies entspricht einem Anteil von 31,3% (Abbildung 1-1). Für das Jahr 2014 wurde ein Anstieg der Brustkrebsneuerkrankungen bei Frauen in Deutschland auf eine Anzahl von rund 75.200 Fälle prognostiziert. Auf Grundlage der derzeitigen Daten erkrankt somit eine von acht Frauen in Deutschland im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren liegt [1].

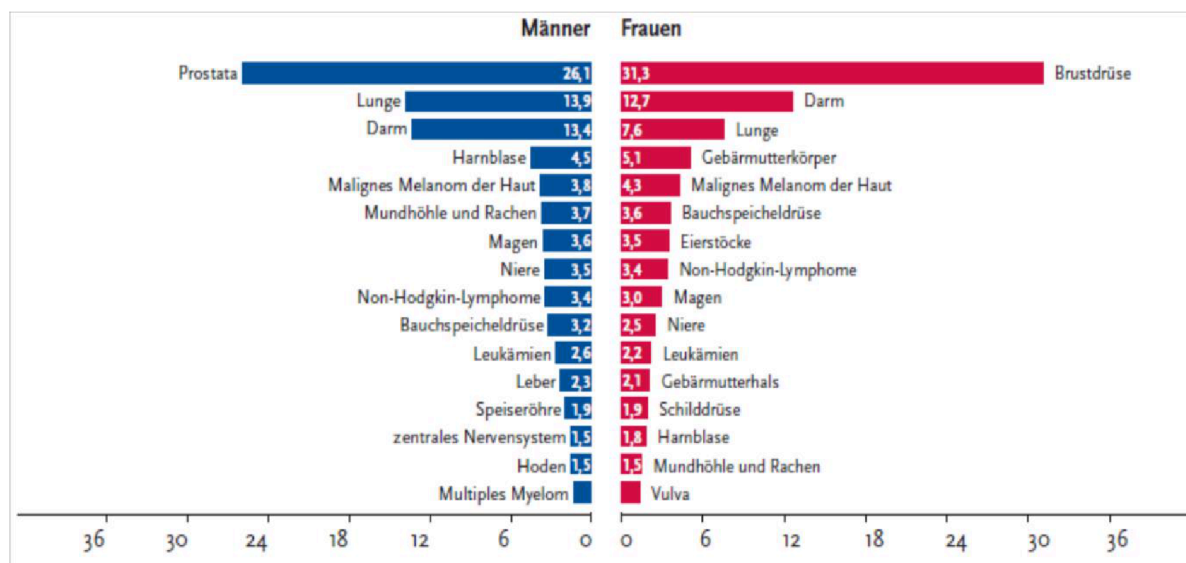


Abbildung 1-1: Verteilung der häufigsten Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2010. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Tumorentität an allen Krebsneuerkrankungen-Fällen in Deutschland im Jahr 2010. Nicht erfasst: nicht-melanotischer Hautkrebs. (Verändert nach [1]).

Eine frühe Menarche, ein später Eintritt in die Menopause, Nulliparität bzw. ein höheres Alter bei der ersten Geburt sowie eine Hormonersatztherapie während und nach den Wechseljahren gelten als Risikofaktoren für die Entstehung einer bösartigen Erkrankung der Brustdrüse [3, 4]. Zudem sind Faktoren des Lebensstils wie Alkoholkonsum, Übergewicht und Bewegungsmangel nach den Wechseljahren mit einem höheren Risiko für die Entstehung von Brustkrebs assoziiert [1, 5, 6]. 5-10% aller Brustkrebserkrankungen sind zudem auf Keimbahn-

Mutationen, unter anderem in den Genen *BRCA1* und *BRCA2* (*breast cancer 1/2*), zurückzuführen [7, 8]. Eine Zunahme der Inzidenz für Krebserkrankungen allgemein ist zudem mit dem demografischen Wandel in Deutschland und speziell für Brustkrebs, mit der flächendeckenden Implementierung des Mammographie-Screening-Programms zwischen 2005 und 2009 in Deutschland zu begründen [9].

Trotz eines deutlichen Anstiegs der Brustkrebs-Inzidenz in den letzten Dekaden (Anstieg von alleine rund 50% zwischen 1980 und 2004), ist die altersstandardisierte Mortalitätsrate leicht rückläufig, was auf Fortschritte in der Therapie zurückzuführen ist [1, 9]. In naher Zukunft wird zudem erkennbar sein, ob und in welchem Ausmaß das Mammographie-Screening-Programm zu einer weiteren Reduktion der Brustkrebs-bedingten Mortalität führen wird [10].

1.2 Die Anatomie der weiblichen Brust

Die weibliche Brust (*Mamma*) setzt sich aus der epithelialen Brustdrüse (*Glandula mammaria*) und dem Fettgewebe-reichen, umgebenden Stroma zusammen (Abbildung 1-2). Die Brustdrüse besteht aus rund 10-20 Einzeldrüsen (*Lobi*), die jeweils von einem Hauptausführgang (*Ductus lactifer colligens*), welcher auf der Brustwarze (*Papilla mammae*) mündet, drainiert werden. Die Zweige des Gangsystems (*Ducti lactiferi*) enden über die Terminaldukti in die einzelnen Lobuli (Läppchen). Als Lobulus wird die Einheit aus mehreren Endstücken bezeichnet [11].

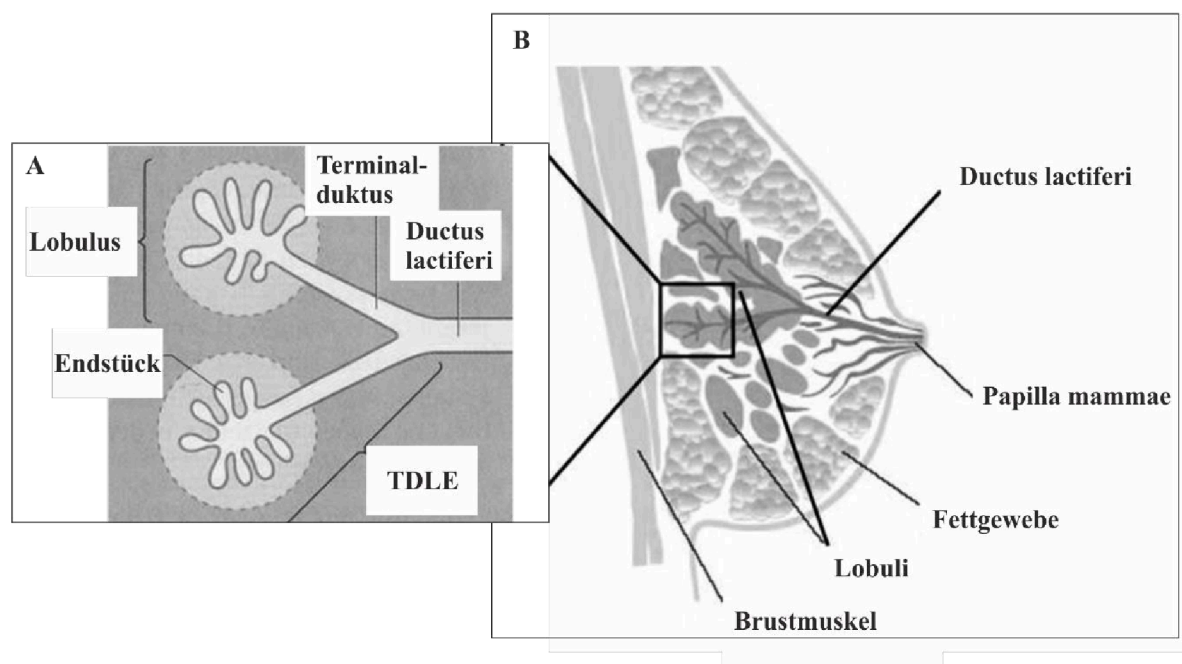


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Anatomie der weiblichen Brust. (A) Abbildung zweier Terminalduktus-Lobulus-Einheiten (TDLE). (B) Sagittalschnitt der weiblichen Brust. (Verändert nach [12]).

Sowohl Gangsystem als auch die Endstücke sind von einem zweischichtigen Epithel umgeben, welches sich in eine innere (luminale) prismatische sowie eine äußere (basale) Zellschicht aus Myoepithelzellen gliedert. Das Brustepithel wird schließlich von der bindegewebigen Basalmembran vom umgebenden Stroma abgegrenzt. Die Funktionseinheit der Brustdrüse wird als Terminalduktus-Lobulus-Einheit (TDLE) bezeichnet und von einem Lobulus und dem zugehörigen Terminalduktus gebildet. Im intralobulären Abschnitt des Terminalduktus befinden sich Gewebe-Stammzellen, die den Umbau zur laktierenden Brust infolge einer Schwangerschaft gewährleisten. Das Epithel im intralobulären Bereich besitzt zudem Rezeptoren für Östrogene und Progesterone, die Zellproliferation und -differenzierung steuern. Als Bereich erhöhter Zellteilungsaktivität und einer damit einhergehenden erhöhten Mutationswahrscheinlichkeit, ist die TDLE der Entstehungsort der meisten gut (benignen)- und bösartigen (malignen) Tumoren der Brust [11, 13, 14].

1.3 Histologische und molekulargenetische Klassifizierung des humanen Mammakarzinoms

Unter dem Begriff Tumor oder Neoplasie wird im Allgemeinen die Vergrößerung eines Gewebes infolge deregulierter Zellproliferation und/oder eines verminderten Untergangs körpereigener Zellen verstanden. Als Karzinome werden maligne Tumoren epithelialen, hingegen als Sarkome, maligne Tumoren mesodermalen Ursprungs bezeichnet [15].

Aus histologischer und molekulargenetischer Perspektive vereint der Begriff „Mammakarzinom“ eine Gruppe vieler heterogener Erkrankungen, die zwar von der gleichen anatomischen Struktur ausgehen, sich jedoch in ihrem Genexpressionsmuster und damit einhergehend, ihrer Histologie, dem Krankheitsverlauf und den möglichen Therapie-Optionen deutlich voneinander unterscheiden [16]. Aus histopathologischer Sicht lassen sich nach neuer WHO-Klassifikation mehr als 30 distinkte Subtypen invasiver Mammakarzinome definieren [17]. Das invasiv-duktales Karzinom (IDC) „ohne weitere Spezifizierung“ (*not otherwise specified*, NOS) ist mit einer Prävalenz von bis zu 75% der häufigste histologische Typ invasiver Brusttumoren. Die zweithäufigste histologische Form invasiver Tumoren der Brust stellt das invasiv-lobuläre (ILC) Karzinom mit einer Prävalenz von bis zu 15% dar. Es ist zu betonen, dass die Begrifflichkeiten „duktales“ bzw. „lobuläres“ Karzinom keinen Rückschluss auf den mikroanatomischen Ursprung im Gangsystem des Brustepithels implizieren. Zu den selteneren histologischen Varianten invasiver Brusttumoren, zählen beispielsweise das medulläre, das tubuläre, das muzinöse und das apokrine Karzinom [16].

Die alleinige Einteilung in histologische Brustkrebs-Subtypen, basierend auf morphologischen, zytologischen und immunhistochemischen Unterschieden, hat einen begrenzten klinischen Nutzen im Bezug auf eine Therapieentscheidung [18]. Komplementär lassen sich invasive Mammakarzinome hinsichtlich ihres histologischen Grades stratifizieren (engl. *Grading*). Dieser stellt ein Maß für die Aggressivität (Malignität) des Brusttumors dar und ergibt sich aus der Untersuchung der Differenzierung der Zellen (Tubulusbildung und Kernpolymorphie) und ihrer proliferativen Aktivität (Mitose-Index) [16, 19]. Die Bildung eines *Summenscores* führt schließlich zur Einteilung der Karzinome in die prognostisch relevanten Klassen Grad 1 bis 3, wobei Grad 1 einen gut differenzierten, minder malignen Tumor repräsentiert, hingegen Grad 3 ein Mammakarzinom mit schlechter Differenzierung und hohem Malignitätsgrad beschreibt (siehe Abschnitt 6.2.2 des Anhangs) [19].

Eine weitere klinisch bedeutsame Stratifizierung der Mammakarzinome erfolgt gemäß der TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind in Tumor-Stadien [20]. Diese Stadieneinteilung (engl. *Staging*) beschreibt das Ausmaß der Ausbreitung des Brusttumors im Körper und berücksichtigt die Ausdehnung des Primärtumors (pT), den Befall regionärer Lymphknoten (pN) sowie das Vorliegen einer Fernmetastasierung (pM) (siehe Abschnitt 6.2.1 des Anhangs). Weiterhin hat sich die Bestimmung des Hormonrezeptor- und des HER2/NEU-Status als prädiktive Biomarker für das humane Mammakarzinom (siehe Abschnitt 1.6.4) als klinisch relevant erwiesen [21, 22].

Die bereits auf histologischer Ebene erkennbare Heterogenität konnte zudem auf molekularer Ebene bestätigt werden. Perou und Kollegen beschrieben erstmalig eine molekulare Klassifizierung humaner Mammakarzinome auf Grundlage von *Microarray*-Expressionsprofilen in die vier molekularen Brustkrebs-Subtypen Luminal-like, Basal-like, HER2 und Normal-like [23]. Neben der Validierung der beschriebenen molekularen Subtypen, konnte in Folge-Studien ferner eine weitere Stratifizierung der luminalen Tumoren in die beiden Subgruppen Luminal A und Luminal B herausgestellt werden [24–26]. Die Klassifizierung von Mammakarzinomen in die fünf intrinsischen Subtypen ist mithilfe einer Signatur aus 50 Genen (PAM50), die auf den Daten von Perou *et al.* basiert [23], realisierbar [27]. Als klinisch bedeutsam erwies sich der Nachweis einer Korrelation zwischen molekularem Subtypen und dem Krankheitsverlauf, wobei sich die beste Prognose für den Subtypen Luminal A, hingegen eine vergleichsweise ungünstige für die Subtypen Basal-like, HER2-enriched und Luminal B zeigte [24, 27]. Des Weiteren konnte ein möglicher prädiktiver Wert der auf *Gene Expression Profiling* (GEP) basierenden Stratifizierung von Brusttumoren für die neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie von Brustkrebspatientinnen gezeigt werden [27, 28]. Aus Kosten-

und Praktikabilitätsgründen wurde eine Immunhistochemie (IHC)-basierte Surrogat-Definition der molekularen Brustkrebs-Subtypen vorgeschlagen [29]. Diese basiert auf Bestimmung des Hormonrezeptor- und HER2-Status sowie des prozentualen Anteils an Krebszellkernen, die eine Positivität für den Proliferationsmarker KI-67 aufweisen [30]. In Tabelle 1-1 ist die IHC-basierte der ursprünglich auf *Gene Expression Profiling* (GEP) beruhenden Klassifikation der molekularen Brustkrebs-Subtypen (ohne Berücksichtigung des Normal-like-Subtypen, dessen Existenz umstritten ist [16]) gegenübergestellt. Es ist zu betonen, dass eine signifikante Diskrepanz zwischen den über das Genexpressionsprofil definierten und der IHC-basierten Klassifizierung in die molekularen Brustkrebs-Subtypen besteht [18]. Konsens der St. Gallen Konferenz 2013 ist die Nutzung der IHC-basierten Surrogat-Definition, obwohl der prozentuale Grenzwert für KI-67 zwecks Subgruppierung der luminalen Tumoren in Luminal A und B, kontrovers diskutiert wird [31].

Tabelle 1-1: Definition molekularer Brustkrebs-Subtypen. (Verändert nach [18])

Intrinsischer Subtyp (GEP)	IHC-Klassifikation (St. Gallen 2011)	Übereinstimmung GEP/IHC-Klassifikation [%]
Luminal A	Luminal A (ÖR- und/oder PR- positiv; HER2-negativ; KI-67 < 14%)	73-100
Luminal B	Luminal B (HER2-negativ) (ÖR- und/oder PR- positiv; HER2-negativ; KI-67 ≥ 14%)	73-100
	Luminal B (HER2-positiv) (ÖR- und/oder PR- positiv; HER2-positiv)	
HER2-enriched	HER2-positiv (nicht-luminal) (ÖR- und PR-negativ; HER2-positiv)	41-69
Basal-like	Triple-negativ (TNBC) (ÖR-, PR-, HER2-negativ)	80

GEP: *Gene Expression Profiling*; IHC: Immunhistochemie; ÖR: Östrogenrezeptor; PR: Progesteronrezeptor; TNBC: Triple-negativer Brustkrebs

Die derzeitige Nutzung der molekularen Stratifizierung von Brustumoren über Genexpressionsprofile in die intrinsischen Subtypen für Therapieentscheidungen ist aus klinischer Sicht problematisch [18, 31]. Zur Verdeutlichung sei die Handhabung eines Brusttumors zu nennen, der als *HER2-enriched* klassifiziert wurde, jedoch klinisch HER2-negativ ist (basierend auf Immunhistochemie und/oder *in situ*-Hybridisierung). Dies rührt daher, dass nicht alle Fälle innerhalb der über GEP-definierten molekularen Gruppe „HER2-

enriched“ eine klinische HER2-Positivität aufweisen und somit die Bezeichnung „HER2-*enriched*“ anstelle von „HER2-positiv“ zu verwenden ist [16]. Den derzeitigen Goldstandard hinsichtlich einer systemischen Therapieentscheidung stellt daher weiterhin die Bestimmung des Hormonrezeptor- und HER2-Status sowie weiterer klinischer Parameter wie Tumorgröße, Nodalstatus und des histologischen Grades dar [18].

1.4 Allgemeine Tumorgenese

Nach derzeitigem Wissensstand sind Tumoren klonalen Ursprungs, d.h. sie gehen auf eine einzelne Ursprungs-Zelle zurück [15, 32]. Es existieren zwei gängige Hypothesen, die die Eigenschaften der Einzelzellen eines Tumors beschreiben. Die stochastische Hypothese besagt, dass jede Zelle eines Tumors eine gleich hohe Wahrscheinlichkeit besitzt zu proliferieren und nach Transplantation einen neuen Tumor auszubilden. Dieser Annahme gegenüber steht die Stammzellhypothese, welche den Einzelzellen eines Tumors eine funktionelle Heterogenität zuschreibt. Nur wenige Zellen des Tumors besitzen dieser Hypothese nach das Potential nach Transplantation zu einem neuen Tumor auszuwachsen und werden als Tumorstammzellen bezeichnet. Diese Tumorstammzellen oder Tumor-initiierenden Zellen (engl. *tumour-initiating cells*, TICs) besitzen, im Vergleich zu den durch asymmetrische Zellteilung entstehenden Progenitorzellen, die Fähigkeit zur Selbsterneuerung [15]. Die Existenz von Tumorstammzellen konnte sowohl für humane Leukämien [33] als auch solide Tumoren einschließlich des Mammakarzinoms demonstriert werden [34]. Als Ursprungszellen der Tumorstammzellen kommen sowohl Gewebestammzellen als auch Progenitorzellen in Frage, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung infolge genomischer Veränderungen zurückerlangt haben [15].

Genetische und epigenetische Veränderungen im Genom von Tumorzellen führen zur Ausprägung verschiedener Phänotypen, die je nach Umgebungsbedingungen, einen Wachstumsvorteil vermitteln und so aufrechterhalten werden. Dieses Konzept der klonalen Evolution von Tumoren, das von Nowell entwickelt wurde [35], geht auf die Grundprinzipien der klassischen Evolutionstheorie von Darwin zurück [15] und gestattet schließlich die Progression eines Tumors. Es wird davon ausgegangen, dass sich Tumorstammzellen im Laufe der Tumorentwicklung auch symmetrisch teilen, so dass bei Auftreten unterschiedlicher genomischer Ereignisse in verschiedenen Tumorstammzellen, heterogene Zellpopulationen mit divergenten Zelleigenschaften innerhalb eines Tumors hervorgehen [15].

Die Entstehung einer Neoplasie aus einer gesunden Ursprungszelle und seine Entwicklung zu einem invasiv wachsenden, metastasierenden malignen Tumor ist ein mehrstufiger Prozess, der

über verschiedene benigne Zwischenformen verläuft. Für das humane Mammakarzinom konnte aus der Dokumentation verschiedener Zwischenstufen [13] von Russo und Kollegen schließlich ein Modell der neoplastischen Progression beschrieben werden [36] (Abbildung 1-3).

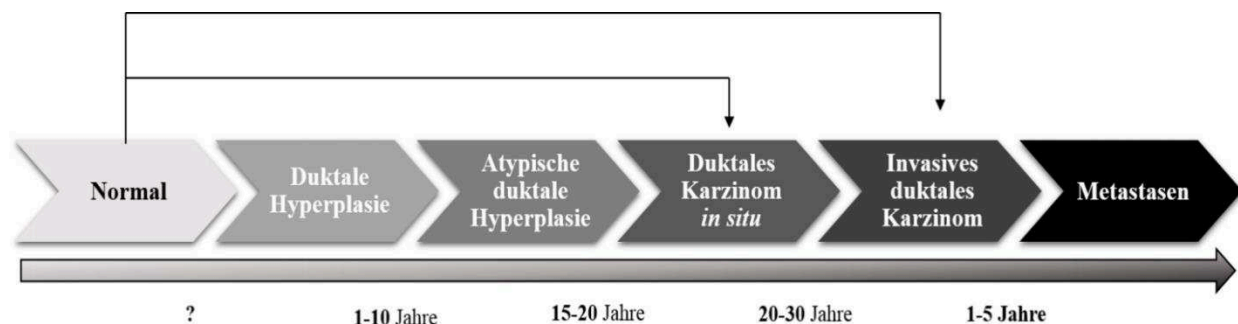


Abbildung 1-3: Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinoms. Dargestellt ist die Progression prä-maligner Vorstufen aus Normalgewebe der Brust zum invasiv-duktales Karzinom mit anschließender Metastasierung. (Verändert nach [36]).

Die initialen benignen Formen des neoplastischen Wachstums der Brust stellen Hyperplasien (Gewebe-Vergrößerungen durch Zunahme der Zellzahl) [11] dar. Diese Vorstufen entwickeln sich schließlich zum *in situ*-Karzinom, einer prä-invasiven Form des malignen Karzinoms. *In situ*-Karzinome unterscheiden sich von invasiven Karzinomen grundsätzlich dadurch, dass sie die das Drüsenepithel vom Stroma abgrenzende Basalmembran noch nicht durchbrochen haben. Es ist jedoch hervorzuheben, dass nicht immer alle Zwischenstufen der Progressions-Reihe linear durchlaufen werden und auch ein direkter Übergang normalen Gewebes in ein *in situ*- oder ein invasives Karzinom möglich ist [36].

Das mehrstufige Progressionsmodell spiegelt den Erwerb essentieller Tumoreigenschaften im Laufe der Tumorentwicklung wider, die das Heranwachsen und Überleben des Tumors sowie seine Ausbreitung im Körper gestatten. Einige dieser Eigenschaften (engl. *hallmarks*) wurden erstmals im Jahr 2000 von Hanahan und Weinberg formuliert [37] und schließlich im Jahr 2011 erweitert [38] (Abbildung 1-4). Dazu zählt zunächst die Deregulation des Wachstumsprogrammes der Krebszellen durch: 1. Erreichung einer Unabhängigkeit von exogenen Wachstumssignalen (beispielsweise durch autokrine Stimulation), 2. den Erwerb einer Insensitivität gegenüber Signalen zur Wachstumsinhibition [39], 3. Entwicklung einer Apoptose-Resistenz und 4. den Erwerb eines unlimitierten replikativen Potentials. Um eine Versorgung des heranwachsenden Tumorgewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten, ist zudem die Stimulation der Gefäßbildung (Angiogenese) erforderlich. Dies

wird durch Aufregulation stimulierender Faktoren wie VEGF und/oder Herabregulation inhibierender Stoffe wie Thrombospondin-1 realisiert [40].

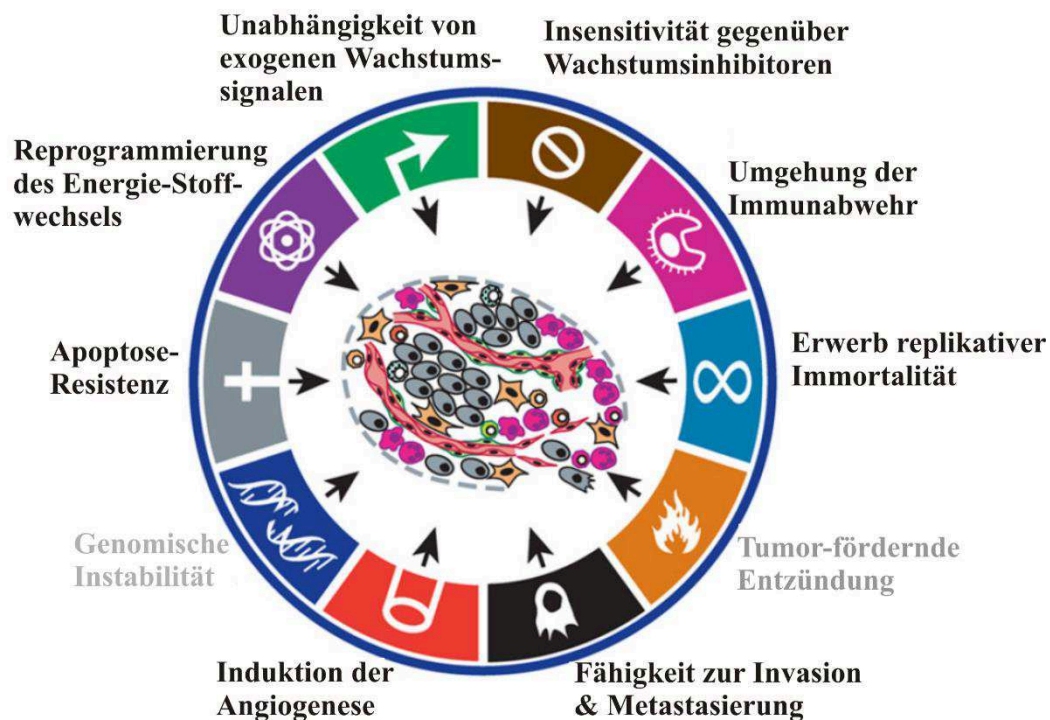


Abbildung 1-4: Darstellung essentieller Tumor-Eigenschaften. Abgebildet sind zentrale Eigenschaften, die ein Tumor im Laufe der Progression zur malignen Neoplasie erwirbt (schwarze Schrift). Genomische Instabilität und Tumor-assoziierte Entzündungen werden als „Förderer“ zum Erwerb dieser Eigenschaften angesehen (graue Schrift). Die Bildmitte zeigt die heterogene Zusammensetzung eines soliden Tumors, der neben den Krebszellen (grau), unter anderem aus assoziierten Immunzellen (magentafarben), Fibroblasten (gelb) und Gefäß-bildenden Endothelzellen und Perizyten besteht (Verändert nach [38]).

Die Entwicklung eines malignen Tumors ist schließlich durch den Erwerb der Fähigkeit der Krebszellen zur Gewebeinvasion und Metastasierung abgeschlossen. Dies setzt unter anderem eine Veränderung in Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten voraus. In der Mehrzahl der Karzinome, einschließlich des Mammakarzinoms [41], wird ein funktioneller Verlust des transmembranären Zell-Adhäsionsproteins E-Cadherin beobachtet [42].

Diesen sechs ursprünglich von Hanahan und Weinberg beschriebenen essentiellen Tumor-Eigenschaften [37] wurden 2011 zwei weitere Tumor-Charakteristika hinzugefügt. 1. Die Reprogrammierung des zellulären Energie-Stoffwechsels, um die überschießende Zellproliferation zu unterhalten sowie 2. die Umgehung der Zerstörung durch das Immunsystem [38]. Der Erwerb aller beschriebenen Tumor-Eigenschaften setzt eine Vielfalt genetischer sowie epigenetischer Veränderungen der Krebszellen und daraus resultierender Phänotypen voraus. Nach den Prinzipien der klonalen Evolution [35] bleiben letztlich die

Zellklone mit Tumor-fördernden Eigenschaften erhalten. Um diese phänotypische Variabilität innerhalb eines Tumors zu gewährleisten werden sowohl die genomische Instabilität der Krebszellen [43] als auch Tumor-assoziierte Entzündungsprozesse als zwei essentielle „treibende Kräfte“ diskutiert [38].

1.5 Molekulargenetische Mechanismen der Tumorgenese

Der Entstehung und Progression von Tumoren liegt die Veränderung (Mutationen und epigenetische Veränderungen) einer Vielzahl von Genen zugrunde, wobei kausal an der Entstehung und Progression beteiligte Gene als Tumorgene bezeichnet werden. Die Mehrzahl dieser Gene ist Protein-kodierend und ihre Genprodukte werden Tumorproteine genannt [15]. Infolge von Mutationen aktivierte Gene, welche die Tumorgenese unterstützen, werden als Onkogene bezeichnet. Die entsprechenden nicht mutierten zellulären Gene, Proto-Onkogene genannt, sind häufig in die Aktivierung des Zellzyklus und der Zellteilung involviert [44]. Als funktionelle Gegenspieler sind Tumorsuppressorgene aufzufassen, die durch genomische Veränderungen während der Tumorgenese einen Funktionsverlust erfahren, der das Tumorwachstum und die Progression fördert [45]. Von *Driver*-Mutationen, die Proto-Onkogene aktivieren bzw. Tumorsuppressorgene hemmen, sind *Passenger*-Mutationen im Genom zu unterscheiden, die nicht ursächlich in die Karzinogenese involviert sind.

Tabelle 1-2: Wichtige Eigenschaften von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgen.
(verändert nach [15])

	Proto-Onkogen	Tumorsuppressorgen
chromosomale Veränderungen	Amplifikation, Rearrangement	Deletion, Rearrangement
Punktmutationen	häufig an <i>Hot Spots</i>	variabel
Herkunft der Mutationen	somatisch (selten Keimbahn)	Keimbahn, somatisch
mutierte Allele	monoallelisch	meist biallelisch
phänotypischer Effekt	dominant	rezessiv oder dominant-negativ
Promotor-Methylierung	Hypomethylierung (selten)	Hypermethylierung (häufig)
häufigste physiologische Funktion	Förderung von Proliferation und Apoptose	Inhibition von Proliferation und Apoptose
Aktivität des Proteins in Tumorzellen	verstärkt	reduziert
Wirkung auf Tumorgenese	fördernd	hemmend

Die Veränderung von Tumorgenen kann sowohl die Keimbahn betreffen und bereits in der Zygote vorliegen als auch in somatischen Zellen (nach dem Zygotenstadium) erfolgen. Allgemeine, wichtige Eigenschaften von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst [15].

1.5.1 Bedeutende Proto-Onkogene im humanen Mammakarzinom

Das Proto-Onkogen *HER2/NEU* (*ERBB2*) zählt zur Gen-Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (engl. *Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR*) und ist in 20-30% aller invasiven Mammakarzinome und der Mehrzahl der DCIS-Fälle mit hohem histologischen Grad durch eine Amplifikation des Gen-Lokus aktiviert [46]. Die Amplifikation resultiert, infolge einer Überexpression des Tyrosinkinase-Rezeptors in der Zellmembran, in einer Hyperresponsivität der Zellen gegenüber exogenen Wachstumssignalen und in einer somit deregulierten Zellproliferation [37]. Eine *HER2/NEU*-Amplifikation ist, ohne Anwendung einer zielgerichteten Therapie, mit einer schlechten Prognose des Mammakarzinoms assoziiert [47]. Der Nachweis einer *HER2/NEU*-Amplifikation oder Überexpression, insbesondere in Brusttumoren früher Stadien, stellt eine Indikation für eine Anti-HER2-Therapie dar [48]. Diese basiert auf der Verabreichung eines Fragmentes eines monoklonalen Antikörpers (Trastuzumab, Handelsname Herceptin®), welcher gegen die extrazelluläre Region des Rezeptors gerichtet ist. Die genaue Wirkungsweise ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch ist die Unterbindung der Rezeptor-Dimerisierung, die zu seiner Aktivierung führt, eine diskutierte Wirkungsweise [15]. Der Nachweis einer Amplifikation/Überexpression von *HER2/NEU* in Brusttumoren entsprechend den Leitlinien der ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) und des CAP (*College of American Pathologists*), basiert auf einem oder mehreren Testergebnissen. Als Eingangsuntersuchung kann der immunhistochemische Nachweis einer Überexpression des *HER2/NEU*-Proteins erfolgen, der bei einheitlich intensiver Membranfärbung in mehr als 30% der untersuchten invasiven Tumorzellen als positiv gewertet wird. Bei zweifelhaftem Befund erfolgt der FISH-basierte Nachweis einer Amplifikation des auf Chromosom 17 lokalisierten *HER2/NEU*-Lokus. Dieser gilt als positiv, wenn entweder durchschnittlich mehr als 6 Kopien des *HER2/NEU*-Lokus pro Zellkern nachgewiesen werden oder der Quotient aus den Signalen für die *HER2/NEU*- und *CEP17* (perizentromerische nicht-kodierende Sequenz auf Chromosom 17)-Sonde größer 2,2 ist [15].

Die *HER2/NEU*-Aktivierung mündet schließlich in der Beeinflussung von stromabwärts gelegenen Transkriptionsfaktoren und Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin D1, dessen Gen-

Lokus in 20% aller Brustkrebsfälle amplifiziert ist. Zudem wird in rund 50% der Brusttumoren eine Überexpression des Cyclin D1-Proteins festgestellt [49, 50]. Retinoblastom (RB)-Proteine regulieren den Übergang der G1- in die S-Phase des Zellzyklus, indem diese E2F-Transkriptionsfaktoren durch Bindung reprimieren. Diese Transkriptionsfaktoren induzieren unter anderem die Transkription wichtiger Gene für die DNA-Synthese. Cyclin D1 aktiviert die Kinase CDK4 (engl. *Cyclin Dependent Kinase 4*), welche infolge RB-Proteine phosphoryliert, was in der Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren und folglich einer Zellzyklus-Progression mündet [49].

Die Expression des Proto-Onkogens *MYC* (*c-MYC*) ist in vielen humanen Tumoren inklusive des Mammakarzinoms dereguliert und häufig mit einer schlechten Prognose assoziiert [51]. Die Amplifikation des *MYC*-Lokus wird in rund 16% aller Brusttumoren beobachtet und ist damit die häufigste genomische Veränderung die zur Überexpression des Transkriptionsfaktors führt [52]. Zudem wird die Expression von *MYC* über zahlreiche Signalwege wie den WNT- (siehe Abschnitt 1.7.2.1) und Notch-Signalweg gesteuert, die häufig in Mammakarzinomen dysreguliert sind. *MYC* beeinflusst die Expression zahlreicher Gene, die unter anderem Zellproliferation, Überleben und Apoptose steuern [52].

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) sind zentrale Knotenpunkte der zellulären Signalübertragung und dementsprechend in die Regulation zahlreicher Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Migration und Adhäsion involviert. Die Enzyme sind aus einer katalytischen und einer inhibierenden regulatorischen Untereinheit aufgebaut. Das Gen *PIK3CA* codiert für eine katalytische Untereinheit eines PI3K-Isoenzyms und zählt zu den am häufigsten in humanen Tumoren mutierten Genen überhaupt. In rund 26% aller Tumoren der Brust sind somatische *Missense*-Mutationen zu finden, die zu einer erhöhten Kinaseaktivität und damit zur zellulären Transformation führen [15, 53].

1.5.2 Bedeutende Tumorsuppressorgene im humanen Mammakarzinom

Das Tumorsuppressorgen *TP53* weist in mehr als 50% aller humanen Tumoren Mutationen auf und ist damit das am häufigsten mutierte Tumorgen überhaupt [54]. Im humanen Mammakarzinom sind Mutationen des *TP53*-Lokus bereits mit frühen Tumorstadien [55] sowie einer schlechten Prognose assoziiert [56] und betreffen rund 28% der analysierten Brustkrebsfälle [15]. In den meisten Tumoren wird ein monoallelischer Verlust von *TP53* und Punktmutationen im verbliebenen Allel registriert, von denen es sich in der Mehrzahl um *Missense*-Mutationen handelt, die eine Bindung des mutierten Transkriptionsfaktors p53 an die DNA nicht mehr gestatten [55]. Neben somatischen Mutationen werden auch

Keimbahnmutationen von *TP53* im Menschen beobachtet, die für das Auftreten des Li-Fraumeni-Syndroms (diverse Tumorerkrankungen) prädisponieren [57]. Das Protein p53 ist vereinfacht als zellulärer Stress-Sensor aufzufassen. Abhängig vom Ausmaß des zellulären Stress-Signals (z.B. DNA-Schäden, Hypoxie, Onkogen-Expression) kann über die Expression entsprechender Zielgene sowohl ein temporärer Zellzyklus-Stopp bzw. eine Einleitung des Apoptose-Weges induziert werden. P53 hat damit die physiologische Funktion den Organismus vor der Ausbreitung geschädigter Zellen zu schützen [54].

Obwohl die Ursache der meisten Mammakarzinome auf eine spontane Veränderung der Erbinformation somatischer Zellen zurückzuführen ist, liegt in 5-10% der Brustkrebsfälle eine erbliche Disposition vor. Häufig sind in diesen Fällen Mutationen in den beiden Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* (*Breast Cancer 1/2*) nachweisbar [15]. Frauen mit hereditärer Mutation in den Genen *BRCA1* oder 2 haben ein ungefähr 10fach erhöhtes Risiko (gegenüber Frauen ohne Mutation in einem der beiden Loci) im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken (Risiko zwischen 80-90% bis zum 75. Lebensjahr) [58]. 90% der Mutationen (*Frameshift*, *Nonsense*, *Missense*) resultieren in trunkierten oder vorzeitig abgebauten Proteinen [15]. BRCA-Proteine haben eine wichtige Funktion für die Erhaltung der genomischen Integrität, indem sie die Reparatur von Doppelstrangbrüchen über homologe Rekombination gewährleisten [59].

1.6 Anwendungsbereiche von Biomarkern

Als biologischer Marker (Biomarker) wird im Allgemeinen ein objektiv, stabil und reproduzierbar zu ermittelnder Parameter verstanden, der als Indikator für einen physiologischen bzw. einen pathologisch-veränderten biologischen Prozess oder eine pharmakologische Reaktion auf eine therapeutische Maßnahme genutzt wird [60].

Hinsichtlich ihrer klinischen Anwendung können verschiedene Biomarker-Klassen unterschieden werden. Um das Risiko zur Entwicklung einer Erkrankung abschätzen zu können werden Prädispositionsmarker genutzt. Früherkennungsmarker (*Screening*-Biomarker) wiederum dienen der Kontrolle über das eventuelle Vorliegen einer Erkrankung (bzw. Vorstufen dieser) in symptomlosen Individuen, die ein durchschnittliches Risiko besitzen zu erkranken. Wird eine Anomalie festgestellt (z.B. als Resultat eines *Screening*-Tests), so kann mithilfe geeigneter diagnostischer Biomarker der Verdacht auf das Vorliegen einer Erkrankung erhärtet bzw. abgeschwächt und zusätzlich die Art einer Erkrankung definiert werden. Für die Findung einer adäquaten individuellen Therapie mit einem größtmöglichen *Benefit* für den Patienten haben prognostische sowie prädiktive Biomarker ein großes Potential. Prognostische

Biomarker ermöglichen eine Abschätzung des Krankheitsverlaufes ohne Berücksichtigung einer möglichen Therapie, prädiktive Biomarker hingegen lassen Rückschlüsse auf das Ansprechen einer bestimmten Therapie zu. Sowohl prognostische als auch prädiktive Biomarker können damit einen direkten Einfluss auf die Wahl einer Behandlung haben. Schließlich dienen *Monitoring*-Biomarker dazu das Ansprechen auf eine Therapie bzw. das Auftreten von Krankheits-Rezidiven zu überwachen [61, 62].

1.6.1 Brustkrebs-Früherkennung

Die Prognose für eine Brustkrebserkrankung ist entscheidend abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung. Bei Detektion der Erkrankung in einem frühen, noch lokal begrenzten Stadium liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate, unter Einsatz vorhandener Therapien, bei rund 90%. Diese sinkt hingegen drastisch ab, wenn die Erkrankung erst in einem fortgeschrittenen Tumorstadium detektiert wird [63]. Diese Tatsache unterstreicht die Notwendigkeit einer Brustkrebs-Früherkennung unter Verwendung sogenannter *Screening*-Verfahren. Die bereits 1968 von der WHO (*World Health Organisation*) formulierten Anforderungen an einen *Screening*-Test besitzen auch heute noch Gültigkeit und bilden die Basis für eine geplante Implementierung eines *Screening*-Programmes:

1. Das *Screening* ist durch eine hohe Inzidenz und/oder Mortalität der zu detektierenden Krankheit gerechtfertigt.
2. Der eingesetzte *Screening*-Test ist einfach durchführbar, sicher, präzise und weist eine adäquate Spezifität und Sensitivität (analytisch und diagnostisch) auf.
3. Die Früherkennung einer Erkrankung bzw. von Vorstufen dieser muss aufgrund bestehender Therapie-Möglichkeiten mit einer signifikant verbesserten Prognose assoziiert sein.
4. Es liegen Evidenzen für eine Reduzierung der Inzidenz und/oder Mortalität infolge eines Einsatzes des *Screening*-Tests vor.
5. Der Nutzen (reduzierte Inzidenz und/oder Mortalität) des *Screening*-Tests sollte die durch den Test verursachten körperlichen und seelischen Belastungen überwiegen.
6. Zusätzlich sollte ein *Screening*-Programm ökonomisch vertretbar sein und einer Qualitätssicherung unterliegen.
7. Potentielle Teilnehmer des *Screening*-Programmes müssen über Vor- und Nachteile der Teilnahme informiert werden [64].

Das gesetzliche Früherkennungsprogramm in Deutschland bietet Frauen ab 30 Jahren die Möglichkeit einer jährlichen Tastuntersuchung der Brust (Palpation). Das Mammographie-*Screening* ist das Standard-Verfahren für die Brustkrebs-Früherkennung und ein entsprechendes Mammographie-*Screening*-Programm wurde zwischen 2005 und 2009 flächendeckend in Deutschland implementiert. Dieses dient der Untersuchung von Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren im 2-Jahres-Turnus. Ziel ist es durch die Detektion und Behandlung früher Tumorstadien die Brustkrebs-spezifische Mortalität zu reduzieren. Aufgrund der erst kürzlichen Implementierung des Mammographie-*Screening*-Programmes in Deutschland ist eine Beurteilung einer potentiellen Reduktion der Brustkrebs-spezifischen Mortalität noch nicht möglich [1]. Eine Meta-Studie des Cochrane-Netzwerkes von 2009 schätzt die auf das Mammographie-*Screening* zurückzuführende Reduzierung der Brustkrebs-spezifischen Mortalität von Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren auf rund 15% ein [65].

Neben einer wahrscheinlichen Reduzierung der Brustkrebs-spezifischen Mortalität sind auch Nachteile mit dem Mammographie-*Screening* assoziiert, die teilweise auf Limitationen der Methode zurückzuführen sind [66]. Abbildung 1-5 gibt einen Überblick über einige Vor- und Nachteile der *Screening*-Mammographie mit ihren möglichen Konsequenzen für sich dieser unterziehende Frauen.

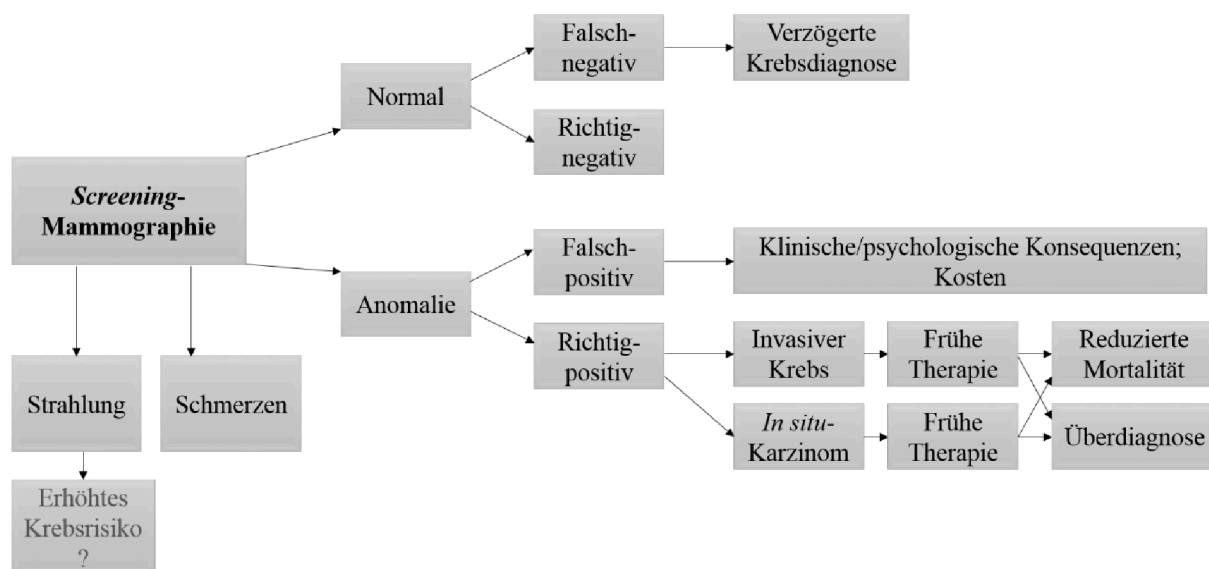


Abbildung 1-5: Vorteile und Risiken der Screening-Mammographie. Zusammenfassende Darstellung von Vor- und Nachteilen der *Screening*-Mammographie und ihrer möglichen Konsequenzen für sich dieser unterziehende Frauen (Verändert nach [66]).

Hervorzuheben ist eine nicht hinreichende klinische Spezifität (Richtig-Negativ-Rate) und Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) der Mammographie bei Untersuchungen von Frauen mit

dichtem Brustgewebe, welches bei rund 50% aller Frauen unter 50 Jahren und mehr als 30% der Frauen über 50 Jahren aufzufinden ist [67]. In einer Studie von Carney *et al.* aus dem Jahr 2003 wurde eine um rund 8% reduzierte Spezifität (89% gegenüber 97%) und eine ca. 24%-ige Reduktion der Sensitivität (63% gegenüber 87%) der Mammographie bei Untersuchungen von Frauen mit dichtem Brustparenchym gegenüber solchen mit hohem Fettanteil im Brustgewebe beobachtet [68]. Für Frauen mit einem hohen Brustkrebs-Risiko (siehe Abschnitt 1.5.2) kommt zusätzlich die kostspieligere Technik der Magnetresonanztomographie (engl. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) zum Einsatz, welche selbst in dichtem Brustgewebe eine exzellente Bildgebung bietet [69]. Jedoch wird die hohe Sensitivität der Technik (85% bis 100%) von einer hohen Rate falsch-positiver Befunde begleitet [70]. Neben der Güte des bildgebenden Verfahrens und der Beschaffenheit des Gewebes ist die Erfahrung des Arztes bei der Auswertung des Mammogramms ein nicht zu vernachlässigender Faktor, der sich auf die klinischen Spezifitäts- und Sensitivitätswerte der jeweiligen Methode auswirkt [71]. Die Konsequenzen eines falsch-positiven Befundes können weitreichend sein. Dazu zählen zusätzliche unnötige Folgeuntersuchungen (bildgebend und/oder Biopsien), welche neben länger andauernden psychologischen Belastungen der Frauen in einigen Fällen, immense Kosten zur Folge haben. Ein falsch-negatives *Screening*-Resultat zieht hingegen eine spätere Diagnose und Therapie mit einer möglicherweise schlechteren Prognose der Erkrankung nach sich [66]. Der Vorteil einer sensitiven *Screening*-Technik birgt gleichzeitig den Nachteil einer Überdiagnose in sich. Als Überdiagnose wird die Detektion von Erkrankungen bezeichnet, die innerhalb der Lebensspanne eines Individuums nicht symptomatisch und somit nicht klinisch relevant geworden wären. In diesen Fällen überwiegen die Nachteile einer unnötigen Risiko-behafteten und kostenintensiven Therapie die Vorteile des *Screening*-Programms. Diese Problematik betrifft zum Großteil die Detektion prä-invasiver Brusttumoren mittels Mammographie [66].

Die aufgeführten Limitationen und Risiken der Mammographie und MRI unterstreichen den dringenden Bedarf an neuen, minimal-invasiven *Screening*-Tests, welche die bestehenden bildgebenden Verfahren zur Brustkrebs-Früherkennung komplementieren können. Die Analyse von Biomarkern in Körperflüssigkeiten wie Blutserum haben ein großes Potential für die Früherkennung und das *Monitoring* von Krebserkrankungen [72, 73].

1.6.2 Biomarker für die Brustkrebs-Früherkennung

Die Messung von im Blut befindlichen Biomarkern (z.B. Proteine und Nukleinsäuren) ist eine minimal-invasive (Vorteil einer hohen gesellschaftlichen Akzeptanz), kostengünstige und

relativ einfach durchführbare Methode, die sich daher für das *Screening* nach einer Krebserkrankung eignet [74]. Im Blutserum detektierbare Protein-Biomarker haben bereits in der Vergangenheit Eingang in die klinische Routine gefunden. Bekannte Beispiele sind die Messung der Serumkonzentration des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) für die Früherkennung des Prostatakarzinoms [74] sowie des Proteins CA125 als *Monitoring*- und ergänzender Diagnose-Marker für das Ovarialkarzinom [75]. Die Proteine Mucin-1 (MUC-1) und CEA (*Carcinoembryonic Antigen*) sind die derzeitigen einzigen von der ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) für die klinische Nutzung empfohlenen zirkulierenden Biomarker für das humane Mammakarzinom [73]. Aufgrund ihrer unzureichenden klinischen Spezifität und Sensitivität für die Früherkennung bezieht sich die derzeitige Empfehlung ausschließlich auf eine Nutzung als ergänzende *Monitoring*-Biomarker für Frauen mit metastasierendem Brustkrebs. Alle Beispiele demonstrieren die methodische Realisierbarkeit Blut-basierter Biomarker-Tests, zeigen jedoch gleichzeitig die Limitationen der Nutzung von Einzelmarkern für die Krebsfrüherkennung hinsichtlich der Erzielung adäquater Werte für die diagnostische Spezifität und Sensitivität auf [76]. Diese Limitationen sind unter anderem auf die inter- und intratumorale Heterogenität von Krebserkrankungen (siehe Abschnitte 1.3 und 1.4) zurückzuführen. Um eine Blutserum-basierte Früherkennung des Mammakarzinoms zu gewährleisten ist daher die Kombination mehrerer Einzelmarker zu einem Biomarker-*Panel* mit dem Ziel der Abdeckung aller molekularen Brustkrebs-Subtypen anzustreben [23, 76, 77].

1.6.3 Mikrofluide Chip-Technologien für die Krebs-Früherkennung

Ein großes Potential für den routinemäßigen Einsatz für die Krebsfrüherkennung sowie das *Monitoring* von Krebserkrankungen haben mikrofluide Chip-Systeme [78]. Das EU-geförderte, interdisziplinäre „MicroBioMed“-Projekt (*Microtechnologies for BioMedicine applications*) hat sich zum Ziel gesetzt ein mikrofluides Chip-System, vorrangig für die Blutserum-basierte Brustkrebs-Früherkennung, zu entwickeln. Monoklonale Antikörper gegen validierte Protein-Serum-Biomarker [79] sollen auf der mikrofluiden Chip-Oberfläche immobilisiert werden. Die Zugabe geringer Mengen Blutserum in das mikrofluide System soll schließlich zur spezifischen Bindung der im Serum befindlichen Analyten an die immobilisierten Antikörper auf der Oberfläche des Chips und so zur Signal-Generierung führen (<http://www.microbiomed.ulg.ac.be/>).

Die Vorteile dieser sich weiter entwickelnden Chip-Technologien gegenüber gängigen Labormethoden zur Analyse von Biomarkern in Körperflüssigkeiten wie der ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)-Technik, ist ihre einfache und schnelle Durchführbarkeit und

ihre relativ kostengünstige Herstellung. Zudem wird durch die Vor-Ort-Diagnose (engl. *Point-Of-Care, POC*) eine Minimierung der möglichen Probenmaterial-Degradation und eine Reduzierung der Stressbelastung für den *Screening*-Teilnehmer aufgrund unmittelbarer Verfügbarkeit der Test-Resultate erreicht. Chip-Systeme, die eine optische oder elektrochemische Signalgenerierung nutzen, sind heute bereits sehr sensitiv und erlauben eine Messung im unteren pg/ml-Bereich bzw. darunter [76].

1.6.4 Prognostische und prädiktive Marker für das Mammakarzinom

Die rechtzeitige Findung einer adäquaten Therapie nach Diagnosestellung ist entscheidend für einen Behandlungserfolg. Das Ziel ist die effektive Behandlung der Krebserkrankung bei Wahl einer Therapie mit möglichst geringen Nebenwirkungen. Prognostische und prädiktive Parameter erleichtern die Auswahl einer individuellen Therapie mit größtmöglichem Nutzen für den Patienten. Dabei erlauben prognostische Marker die Vorhersage des Krankheitsverlaufes und so die Abschätzung der Sinnhaftigkeit der Gabe einer aggressiven Chemotherapie. Mittels prädiktiver Marker ist es wiederum möglich das Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorherzusagen [61].

Die derzeit wichtigsten zu berücksichtigenden Faktoren hinsichtlich der Findung einer Therapieentscheidung für das humane Mammakarzinom stellen nach wie vor die Ermittlung der klinisch-pathologischen Parameter des TNM-Systems (Tumorgroße, axillärer Lymphknoten-Status, Vorliegen von Fernmetastasen) [20], der Tumorgraduierung [19], sowie die Bestimmung des Hormonrezeptor (Östrogen-und Progesteronrezeptor)- und HER2/NEU-Status dar [22, 80] (siehe Abschnitt 1.3). Dabei gilt die Bestimmung des axillären Lymphknoten-Status als der momentan stärkste prognostische Faktor für das humane Mammakarzinom: im Vergleich zu einer Rezidiv-Quote von rund 30% für Mammakarzinom-Patientinnen mit negativem Nodal-Status, wird in 65% der Fälle mit positivem Lymphknoten-Status ein Relaps verzeichnet [81]. Eine weitere prognostische Stratifizierung des nodal-negativen Mammakarzinoms zur Abschätzung des Rezidiv-Risikos kann durch zusätzliche Bestimmung der Invasionsfaktoren UPA (Urokinase-Plasminogen-Aktivator) und PAI1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1) in frischem oder kryoasserviertem Brusttumorgewebe mittels ELISA-Technik erfolgen. Eine niedrige UPA/PAI1-Expression ist mit einer guten Prognose, d.h. sowohl einem längeren Rezidiv-freien als auch Gesamt-Überleben assoziiert, so dass in diesen Fällen auf eine adjuvante Chemotherapie verzichtet werden kann [82].

Unter den obigen genannten Faktoren ist der Hormonrezeptor-Status als vergleichsweise schwacher Prognose-Parameter einzustufen [61, 83]. Unbehandelte Brustkrebs-Patientinnen

mit positivem Östrogenrezeptor-Status haben im Vergleich zu unbehandelten Östrogenrezeptor-negativen Patientinnen eine nur geringfügig bessere Prognose [61]. Andererseits ist der Hormonrezeptor-Status ein wichtiger prädiktiver Parameter, der das Ansprechen auf eine endokrine Behandlung sowohl im Rahmen einer adjuvanten Therapie als auch für das metastasierte Mammakarzinom vorhersagt [73, 84]. Nach neueren Erkenntnissen haben Patientinnen, die sowohl einen positiven Östrogen- als auch Progesteronrezeptor-Status aufweisen einen größeren Nutzen einer endokrinen Therapie mit Tamoxifen im Vergleich zu solchen, die nur eine Östrogenrezeptor-Positivität aufweisen [85].

Eine Amplifikation und Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors HER2/NEU (siehe Abschnitt 1.5.1) ist unbehandelt mit einer schlechten Prognose des Mammakarzinoms assoziiert [86, 87]. Der Nachweis einer Amplifikation/Überexpression zwecks Nutzung als prognostischer Parameter wird jedoch derzeit durch die ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) nicht empfohlen. Gleichzeitig ist der Nachweis einer HER2/NEU-Amplifikation/Überexpression eine Indikation für eine zielgerichtete Anti-HER2-Therapie und somit ein wichtiger prädiktiver Biomarker für die Behandlung des Mammakarzinoms [31].

Mit dem Aufkommen eines immer größeren Einsatzes molekulargenetischer Methoden wurden in den letzten Jahren einige prognostische Tests entwickelt, die auf Messung von Genexpressionsprofilen beruhen. Beispiele sind der Oncotype DXTM-[88, 89], der MammaPrint[®]- [90, 91] sowie der EndoPredict[®]-Test [92, 93]. Alle drei Tests zielen darauf ab Niedrig- und Hoch-Risiko-Gruppen von Brustkrebs-Patientinnen für das Auftreten von Rezidiven zu identifizieren, um so eine Entscheidungshilfe bei der Wahl für eine adjuvante Chemotherapie bereit zu stellen [94].

1.7 Kandidatengene dieser Arbeit und involvierte Signalwege

1.7.1 Die *Anterior Gradient* (AGR)- Proteinfamilie

Die humane AGR-Proteinfamilie, welche zur Proteindisulfidisomerase (PDI)-Familie gezählt wird, setzt sich aus drei Mitgliedern zusammen, namentlich TXNDC12 (AGR1), AGR2 und AGR3 [95–97]. Proteindisulfidisomerasen sind durch eine oder mehrere Thioredoxin-Domänen charakterisiert, die es Ihnen ermöglichen Disulfidbrücken von Zielproteinen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu oxidieren, zu reduzieren und zu isomerisieren [98]. Im Gegensatz zu AGR1, dem evolutionär ältesten Protein der AGR-Familie, welches das

gewöhnliche Thioredoxin-Motif der Form CXXC aufweist, sind AGR2 und AGR3 durch ein divergentes Motif der Form CXXS gekennzeichnet, dessen genaue molekulare Funktion noch nicht geklärt ist [96, 99]. Neben einem N-terminalen Sezernierungssignal besitzen AGR2 und AGR3 ein nicht-kanonisches ER-Rückhol-Signal in ihrem C-Terminus [96].

Obwohl für AGR2 (wie für AGR3) bisher kein direkter Beweis für eine Thioredoxin-Aktivität erbracht wurde, gibt es dennoch indirekte Belege für eine Involvierung von AGR2 in die Prozessierung von Zielproteinen im ER, insbesondere von Muzinen [100–102]. AGR2 kommt zudem eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des ER zu. Es wurde gezeigt, dass ER-Stress über die Aktivierung des UPR (engl. *Unfolded Protein Response*)-Signalweges zur Induktion der AGR2-Expression führt, welche wiederum die Stress-induzierte Apoptose reduzieren konnte [103, 104]. Die Aufregulation von AGR2 in humanen Tumoren, einschließlich des Östrogenrezeptor- α -positiven Mammakarzinoms, ist ein weit verbreitetes Phänomen [105–113]. Widrige Faktoren der Tumorumgebung wie Hypoxie, Nährstoffmangel, aber auch eine gesteigerte Proteinsynthese- und Sezernierungsrate in Tumorzellen können zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine im ER führen und somit in die Aktivierung der UPR münden. Es ist wahrscheinlich, dass die gesteigerte Expression von Proteindisulfidisomerasen wie AGR2 zu einer Reduzierung des proteotoxischen Stresses führt und den Krebszellen folglich einen Wachstums- und Überlebensvorteil verschaffen kann [103, 114]. Im Brustkrebs und anderen Tumor-Entitäten konnte neben einer AGR2-vermittelten Steigerung der Zellwachstums, ebenso eine Förderung progressions-assoziierten Eigenschaften wie Migration und Adhäsion beobachtet werden, die in einer gesteigerten Metastasierung mündeten [105, 111, 115–117]. Übereinstimmend mit der funktionellen Rolle wurde AGR2 überwiegend als prognostischer Faktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf des Mammakarzinoms beschrieben [116, 118, 119]. Zusätzlich zu einer Lokalisation im ER konnte AGR2 in anderen zellulären Kompartimenten einschließlich der Zelloberfläche und im extrazellulären Raum detektiert werden [105, 120, 121]. Dies ist möglicherweise auf einen unvollständigen retrograden Transport im sekretorischen Weg, insbesondere im Fall einer Tumor-bedingten Überexpression von AGR2, zurückzuführen [99]. Auch im Brustkrebs gibt es indirekte Hinweise auf eine extrazelluläre Lokalisation der Proteine AGR2 und AGR3. Basierend auf einer *Yeast-Two-Hybrid*-Analyse schlussfolgerten Fletcher und Kollegen eine Bindung von AGR2 und AGR3 an die jeweils extrazelluläre Region der Zellmembranproteine Dystroglycan und LYPD3 [113]. Bemerkenswerterweise zeigten mehrere Studien signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen von AGR2 im Serum bzw. Plasma von Patienten mit Ovarial- [109, 122], Lungen- [123] und Prostatakarzinom [124] im Vergleich zu gesunden Kontrollen

und weisen damit auf eine putative Nutzbarkeit von AGR2 als Serumbiomarker hin. Eine Analyse der potentiellen klinischen Relevanz von AGR2 als Serumbiomarker für das humane Mammakarzinom wurde bisher nicht durchgeführt.

AGR3, das wahrscheinliche Paralog zu AGR2, weist eine Aminosäuresequenz-Übereinstimmung von 71% mit AGR2 auf und ist benachbart zum AGR2-Lokus auf Chromosom 7p21 lokalisiert [113]. AGR3 wurde als BMP11 (*Breast Cancer Membrane Protein 11*) in der Zellmembran-Fraktion humaner Brustkrebs-Zelllinien identifiziert und als aufreguliert [125] und co-exprimiert mit AGR2 in Östrogenrezeptor- α -positivem Brustkrebs beschrieben [113]. Neuere Studien zeigen zudem eine Aufregulation von AGR3 im Ovarial- [126] sowie Prostatakarzinom [127] und weisen AGR3 als möglichen diagnostischen Marker für das intrahepatische Cholangiokarzinom aus [128]. Interessanterweise wurde AGR3 nicht zusammen mit AGR2 in den vielen durchgeführten Krebs-assoziierten OMICS-Analysen identifiziert [129]. Ebenso sprechen eine entkoppelte Expression von AGR2 und AGR3 im Ovarial- und Prostatakarzinom [130, 131] sowie eine nicht identische subzelluläre Lokalisation [130] gegen eine vollständige funktionelle Redundanz beider Proteine [99]. Im Vergleich zu AGR2 liegen kaum Kenntnisse über die physiologische Rolle noch über den putativen Einfluss von AGR3 auf die Karzinogenese vor [129]. Eine mögliche klinische Relevanz von AGR3 wurde bisher nur im Ovarialkarzinom näher untersucht. Wohingegen King und Kollegen AGR3 als prognostischen Marker für einen günstigen Verlauf des serösen Ovarialkarzinoms identifizierten [126], deutet das Ergebnis einer Folge-Studie auf eine mögliche Involvierung von AGR3 in die Entstehung einer Cisplatin-Resistenz im Ovarialkarzinom hin [130].

Die putative klinische Nutzbarkeit von AGR3 als diagnostischer und prognostischer Biomarker für das humane Mammakarzinom wurde bisher nicht analysiert. Auch ist ungeklärt, ob AGR3 einen funktionellen Einfluss auf die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms ausübt und somit eine mögliche neue therapeutische Zielstruktur darstellt.

1.7.2 Der WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg kontrolliert diverse biologische Prozesse während der Embryonalentwicklung sowie in adulten Geweben aller Tiere, darunter die Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Migration, Adhäsion und Aufrechterhaltung des Stammzell-Charakters. Eine Deregulation des WNT-Signalweges ist daher auch mit Krebsentstehung und -progression assoziiert [132]. Vereinfachend kann der WNT-Signalweg in einen kanonischen/ β -Catenin-abhängigen und in (mehrere) nicht-kanonische/ β -Catenin-unabhängige Signalwege eingeteilt werden (Abbildung 1-6) [133].

1.7.2.1 Der kanonische WNT/ β -Catenin-Signalweg

Der kanonische WNT- ist nach dem MAPK-Signalweg derjenige Weg, dessen Signalwegs-Komponenten am häufigsten Mutationen in menschlichen Tumoren aufweisen [15, 134]. Im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom mit einer Mutations-Häufigkeit von 90% der Fälle, sind Mutationen in Signalproteinen des WNT-Signalweges im Mammakarzinom eher selten [15, 135]. Dennoch wird in etwa 40-60% der Mammakarzinome eine erhöhte zytoplasmatische/nukleäre β -Catenin-Proteinexpression nachgewiesen, die eine aberrante Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges impliziert [136, 137]. Das zentrale Molekül des kanonischen WNT-Signalweges ist β -Catenin, dessen zytoplasmatische Konzentration über einen Multiprotein-Komplex („*Destruction Complex*“) reguliert wird. Dieser setzt sich neben anderen Proteinen, aus Adenomatöse Polyposis coli (APC), AXIN sowie den Kinasen Casein-Kinase-1 α (CK1 α) und Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) zusammen. In Abwesenheit eines WNT-Liganden (im nicht deregulierten Signalweg) wird β -Catenin über die beiden Kinasen des Komplexes mehrfach phosphoryliert und damit für die Ubiquitinierung durch die Ubiquitinligase *β -Transducin Repeat-containing Protein* (β -TRCP) markiert. Die Ubiquitinierung resultiert schließlich in der proteasomalen Degradation von β -Catenin. Insgesamt sind 19 WNT-Liganden-Isoformen und 10 verschiedene *Frizzled* (FZD)-Rezeptoren im Säuger genom kodiert. Nach Bindung eines WNT-Liganden an einen FZD-Transmembran-Rezeptor sowie einen Co-Rezeptor der LDL (*Low Density Lipoprotein*)-Familie, namentlich LRP5 und LRP6, wird das zytoplasmatische Adapterprotein *Dishevelled* (DVL) sowie AXIN an das Rezeptor-Heterodimer aus FZD und LDLR gebunden. Rekrutiertes DVL inhibiert, über einen nicht vollständig geklärten Mechanismus, die Aktivität des *Destruction Complex*, was zu einer Akkumulation zytosolischen und nukleären β -Catenins führt. Dieses aktiviert im Zellkern einen Transkriptionsfaktor der TCF/LEF-Familie (*T-Cell Factor/Lymphoid enhancing Factor*) [132, 138, 139]. Die Induktion der Expression von Zielgenen des kanonischen WNT-Signalweges wie MYC und CCND1 resultiert vor allem in einer erhöhten Zellproliferation [140, 141].

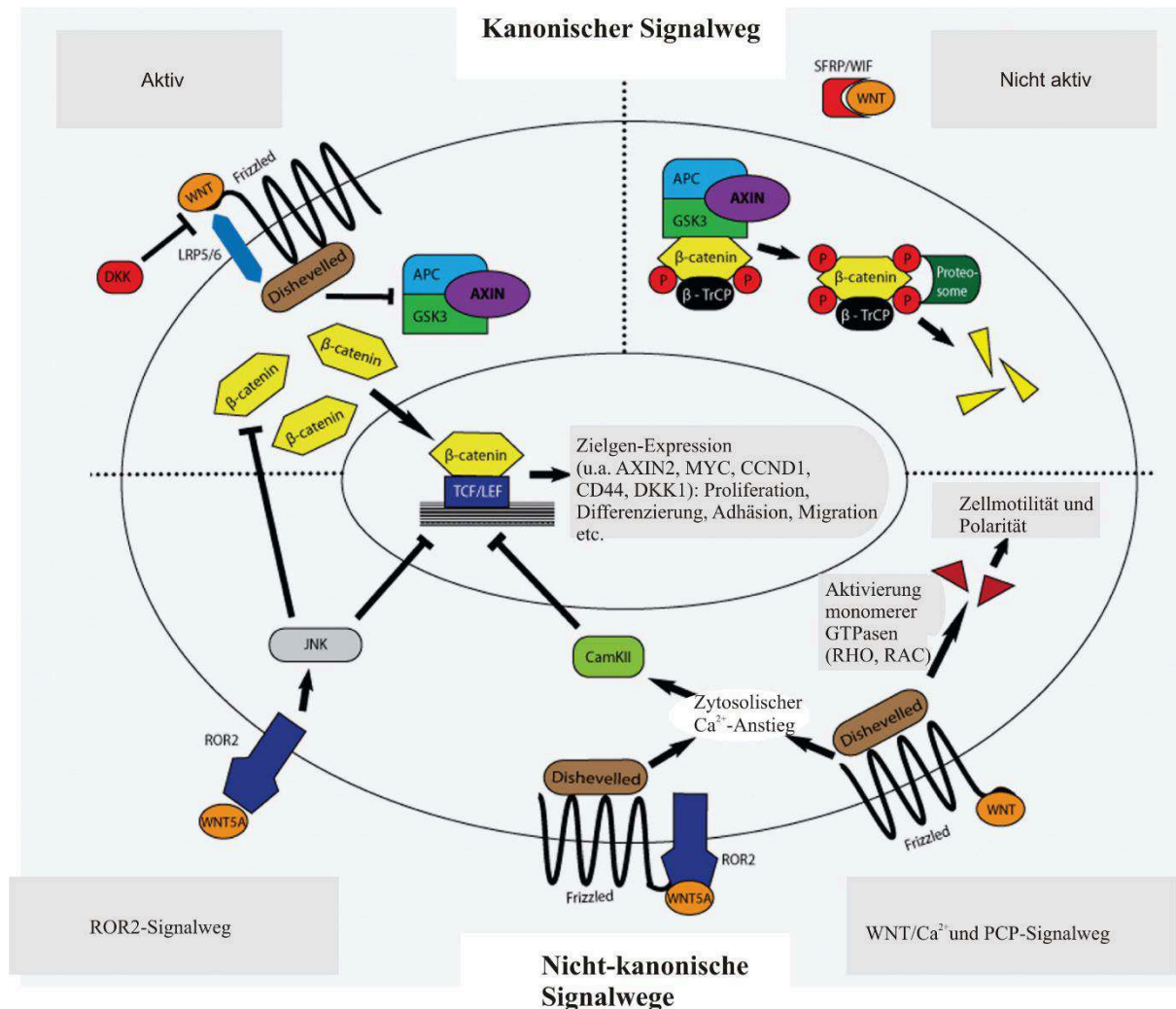


Abbildung 1-6: Modell des WNT-Signalweges. Vereinfachte schematische Darstellung des kanonischen WNT/β-Catenin-Signalweges sowie mehrerer nicht-kanonischer/β-Catenin-unabhängiger WNT-Signalwege. In Abwesenheit eines WNT-Liganden (nicht aktiv) wird die zytosolische Konzentration des Transkriptions-Aktivators β-Catenin über den „Destruction Complex“, bestehend aus APC, AXIN und GSK-3β, sowie über die Ubiquitinligase β-TRCP reguliert. Die Phosphorylierung von β-Catenin über den *Destruction Complex* und die anschließende Ubiquitinierung führen zur proteasomalen Degradation des Proteins. Die Bindung eines WNT-Liganden, in Anwesenheit eines Co-Rezeptors LRP5 oder 6, an einen Frizzled (FZD)-Rezeptor führt zur Rekrutierung von *Dishevelled* (DVL) und AXIN an den Rezeptor-Komplex. Die resultierende Destabilisierung des *Destruction Complex* mündet in einer Akkumulation zytosolischen β-Catenins, das in den Nucleus transloziert und dort über die Bindung an den Transkriptionsfaktor TCF/LEF die Expression von Zielgenen wie MYC und CCND1 induziert. Unter den nicht-kanonischen Signalwegen sind der WNT/Ca²⁺- sowie der WNT/PCP-Signalweg am besten charakterisiert. Diesen Signalwegen ist, wie dem kanonischen, die Bindung von WNT-Liganden an FZD-Rezeptoren und eine Rekrutierung von DVL gemein. Dem Co-Rezeptor ROR2 kommt eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung nicht-kanonischer WNT-Signalwege zu. Wohingegen der WNT/Ca²⁺-Signalweg zur Aktivierung Ca²⁺-abhängiger Proteine wie CamKII führt, werden über den WNT/PCP-Signalweg monomere GTPasen wie RHOA und RAC1 sowie die Kinase JNK aktiviert, die Zellbewegungen beeinflussen. Eine Aktivierung nicht-kanonischer Signalwege kann zur Inhibition des nicht-kanonischen Signalweges führen. Dies ist sowohl auf Ebene der β-Catenin-Stabilisierung als auch stromabwärts über Hemmung von TCF möglich. Sezernierte Proteine wie SFRP, WIF und DKK fungieren hauptsächlich als Inhibitoren des kanonischen Signalweges. (Verändert nach [133]).

1.7.2.2 Der WNT/PCP-Signalweg

Einer der am besten charakterisierten nicht-kanonischen WNT-Signalwege [142] ist der PCP (*Planar Cell Polarity*)-Signalweg, welcher gerichtete Zellbewegungen und die Polarisierung von Zellen innerhalb einer Ebene steuert [143]. In Vertebraten reguliert dieser Signalweg entscheidende Entwicklungsprozesse wie die Schließung des Neuralrohres über den Mechanismus der konvergenten Extension sowie die Anordnung von Haarsinnes-Zellen während der Entwicklung des Innenohrs [144]. Zusätzlich zur vorhandenen basal-apikalen Polarität von Epithelzellen wird über den PCP-Signalweg deren Anordnung entlang einer zusätzlichen Achse - innerhalb der Ebene des Epithels - reguliert. Eine Aktivierung des PCP-Signalweges erfordert zuvor eine spezifische asymmetrische Lokalisation seiner Kern-Moleküle entlang der apikal-basalen Achse der Epithelzellen [145, 146]. Zu den Kern-Komponenten des Signalweges in Vertebraten zählen *Frizzled* (FZD), *Dishevelled* (DVL), *Van-Gogh-like* (VANGL), CELSR (siehe Abschnitt 1.7.3), PRICKLE und *Ankyrin Repeat Domain 6* (ANKRD6) [143, 147].

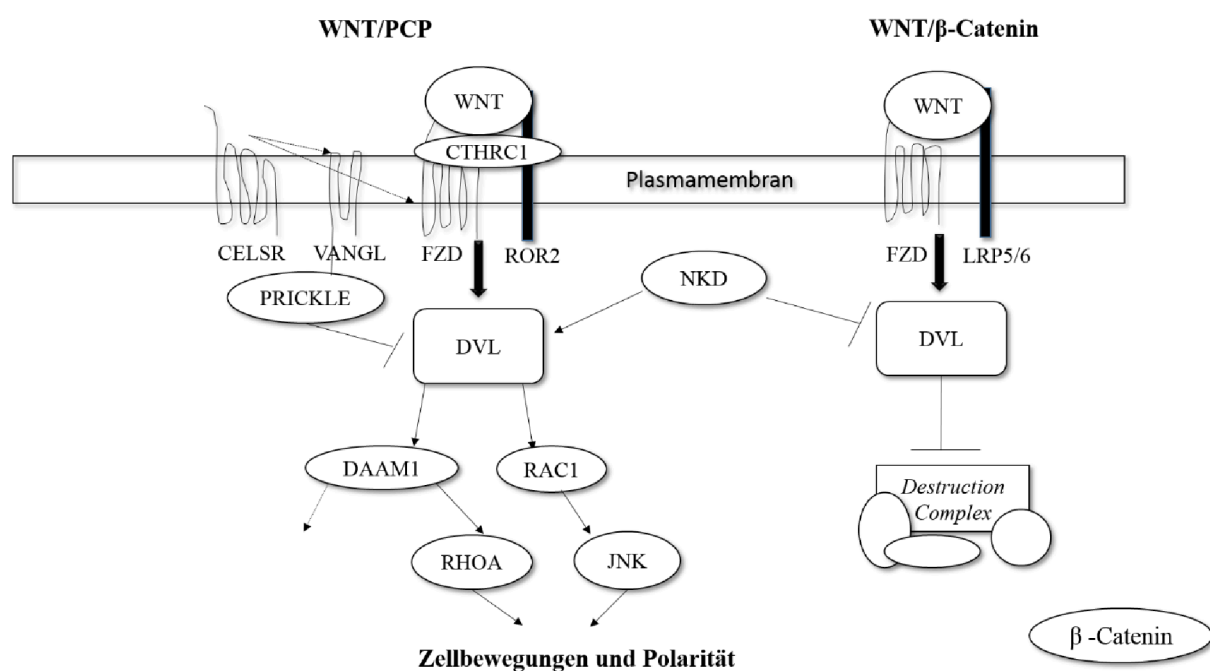


Abbildung 1-7: Der PCP-Signalweg. Schematische Darstellung zentraler Signalproteine des PCP-Signalweges in Vertebraten. Die Bindung eines WNT-Liganden an einen FZD-Rezeptor und den Co-Rezeptor ROR2 führt zur Rekrutierung von DVL durch FZD an die Plasmamembran. Extrazelluläres CTHRC1 fördert die Bildung der WNT-FZD-ROR2-Komplexe. PRICKLE ist ein negativer Regulator der DVL-Rekrutierung. NKD fungiert als selektiver Aktivator der PCP- bei gleichzeitiger Hemmung der kanonischen WNT-Signalkaskade durch Bindung von DVL. Stromabwärts von DVL werden kleine GTPasen der RHO-Familie wie RAC1 und RHOA aktiviert, die das Aktinzytoskelett modulieren und Zellbewegungen beeinflussen. CELSR reguliert die asymmetrische Verteilung der Kern-Komponenten VANGL und FZD in der Plasmamembran und damit die Aufrechterhaltung der PCP-Signalwegs-Aktivierung. (Verändert nach [148]).

Die Aktivierung des WNT/PCP-Signalweges erfolgt über die Bindung eines WNT-Liganden an einen FZD-Rezeptor sowie den Co-Rezeptor ROR2 [149, 150] (Abbildung 1-7). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Aktivierung des kanonischen bzw. nicht-kanonischer WNT-Signalwege auf intrinsische Eigenschaften der WNT-Liganden zurückzuführen sei, wobei WNT1 und WNT3A als kanonische, hingegen WNT5A und WNT11 als nicht-kanonische Liganden klassifiziert wurden [133]. Es mehren sich jedoch Hinweise, dass darüber hinaus die Rezeptor-Verfügbarkeit (wie LRP5/6 und ROR2) über die selektive Aktivierung des kanonischen bzw. nicht-kanonischer WNT-Signalwege entscheidet [151, 152]. Ein erst kürzlich identifizierter möglicher selektiver Aktivator des WNT/PCP-Signalweges stellt das sezernierte Glykoprotein CTHRC1 dar (siehe Abschnitt 1.7.4). Es wird vermutet, dass CTHRC1 die Bildung von WNT-FZD-ROR2-Komplexen fördert und dadurch gleichzeitig die Aktivität des kanonischen Signalweges reduziert [149]. Die Rekrutierung des zentralen Adapterproteins DVL an den aktivierten FZD-Rezeptor führt zur Stimulation monomerer GTPasen der RHO-Familie wie RHOA und RAC1, die schließlich über weiter stromabwärts gelegene Moleküle die Modulation des Aktinzytoskelettes und damit Zellbewegungen beeinflussen [153]. *Naked-Proteine* (NKD1 und 2) wurden als intrazelluläre „Schalter“ identifiziert, die durch Bindung an DVL sowohl die Aktivität des kanonischen WNT-Signalweges hemmen als auch gleichzeitig stromabwärts gelegene Signalmoleküle der WNT/PCP-Kaskade aktivieren können [154, 155].

Ein derzeitiges Modell postuliert eine mögliche biphasische Rolle des WNT/PCP- ähnlich der des TGF β -Signalweges in der Karzinogenese [148, 156]. Auf der einen Seite konnte eine inhibierende Wirkung nicht-kanonischer WNT-Signalwege inklusive des WNT/PCP-Signalweges auf den Tumorzellwachstum-fördernden WNT/ β -Catenin-Signalweg nachgewiesen werden [149, 151, 157, 158], was eine mögliche tumorsuppressive Rolle nicht-kanonischer Signalwege in frühen Stadien der Tumorentstehung erklären kann [148]. In mehreren Studien wird auf der anderen Seite eine Stimulation der Migration und Invasion von Tumorzellen durch Aktivierung nicht-kanonischer Signalwege aufgezeigt, was ihre mögliche Involvierung in die Tumorprogression und Metastasierung bereits etablierter Tumoren hervorhebt [159–163].

1.7.3 Die CELSR-Proteinfamilie

Die Familie der CELSR (engl. *cadherin epidermal growth factor laminin G seven-pass G-type receptor*)-Proteine setzt sich aus den drei Mitgliedern CELSR1 bis 3 zusammen und wird zur Subfamilie der Adhäsions-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren innerhalb der Superfamilie der

G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (engl. *G Protein-Coupled Receptors*, GPCRs) gezählt [164]. Strukturell sind alle Adhäsions-GPCRs durch eine N-terminale, extrazelluläre Domäne charakterisiert, welche den Großteil des Proteins ausmacht und über eine stängelartige, ein GPS-Motif (engl. *GPCR Proteolytic Site*) enthaltende Region mit der 7-Transmembran-Domäne des Proteins verbunden ist [165]. Abbildung 1-8 zeigt die Domänen-Architektur für das CELSR1-Volllängen-Protein (~330 kDa, <http://www.uniprot.org/>).

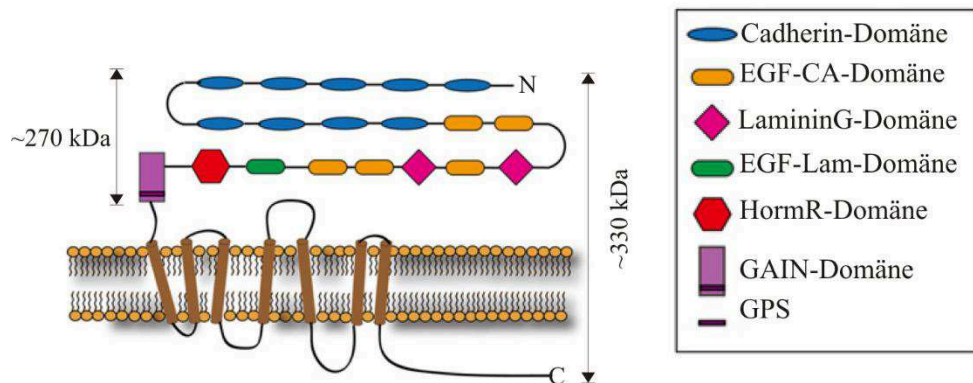


Abbildung 1-8: Domänen-Architektur von CELSR1. Schematische Darstellung der Domänen-Anordnung von CELSR1. Das Volllängen-Protein weist ein Molekulargewicht von ~330 kDa auf, wobei die N-terminale Ektodomäne mit ~270 kDa den Großteil des Proteins bildet. EGF: *Epidermal Growth Factor*; CA: Kalzium; Lam: Laminin; HormR: Hormon-Rezeptor; GAIN: *GPCR Autoproteolysis-INDucing*; GPS: *GPCR Proteolytic Site*. (Verändert nach [164]).

Die Ektodomäne (~270 kDa) von CELSR1 setzt sich unter anderen aus zahlreichen Kalzium-bindenden Adhäsions-Domänen (Cadherin-, EGF, LamininG-, EGF-Laminin-Domänen) zusammen [164]. Studien konnten eine homophile *trans*-Interaktion der Ektodomänen aller drei CELSR-Proteine belegen [166, 167]. Ein weiteres charakteristisches Motif vieler Adhäsions-GPCRs ist die Hormon-Rezeptor-Domäne. Bisher wurden jedoch keine Liganden (Hormone) für Adhäsions-GPCRs identifiziert [168]. Die GAIN (engl. *GPCR Autoproteolysis-INDucing*)-Domäne ist in allen humanen Adhäsions-GPCRs vorhanden und beinhaltet das GPS (engl. *GPCR Proteolytic Site*)-Motif [169, 170]. Für einige Adhäsions-GPCRs konnte bereits eine Prozessierung des jeweiligen Rezeptors im endoplasmatischen Retikulum, über einen intramolekularen Autoproteolyse-Mechanismus im Konsensus-GPS-Motif, in zwei Fragmente nachgewiesen werden [170–172]. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Prozessierung für die Rezeptor-Funktion essentiell war [170]. Nur der humane Rezeptor CELSR2, jedoch nicht

CELSR1 und 3, weist das Konsensus-GPS-Motif auf. Experimentelle Analysen einer möglichen Spaltung der humanen CELSR-Proteine sind daher erforderlich [164].

Das Expressionsspektrum von CELSR1-3 im Säuger ist breit. Alle drei Gene weisen eine verstärkte Expression im Nervensystem, insbesondere im embryonalen und frühen post-natalen Stadium auf [173, 174]. Beispiele für nicht-neuronale Expressionsorte von CELSR1-3 sind die Cochlea, die Lunge, die Niere und das Verdauungssystem [164]. Als Kern-Komponenten des WNT/PCP-Signalweges (siehe Abschnitt 1.7.2.2) sind CELSR1-3 essentielle Regulatoren embryonaler Entwicklungsprozesse wie der Schließung des Neuralrohres [144, 167, 175], der Entwicklung des Corti-Organes [144], der Ausbildung von Lymphgefäß-Klappen [176] sowie der Pankreas-Entwicklung [177].

Wie bereits erläutert (siehe Abschnitt 1.7.2.2) ist der WNT/PCP-Signalweg in die Karzinogenese involviert und weist dort eine mögliche biphasische Rolle auf. Die derzeit nur wenigen verfügbaren Studien, die *CELSR1* im Zusammenhang mit humanen Krebserkrankungen beschreiben, erzeugen ein zweigeteiltes Bild hinsichtlich möglicher tumorfördernder bzw. –suppressiver Eigenschaften des Gens. In leukämischen Erkrankungen scheint eine Expression von CELSR1 mit einem aggressiveren Phänotypen assoziiert zu sein [178, 179]. So konnte in Krebszellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), besonders in fortgeschrittenen Krankheitsstadien, eine verstärkte Expression von Komponenten des WNT/PCP-Signalweges inklusive CELSR1 festgestellt werden. Die gesteigerte Aktivität des PCP-Signalweges war mit erhöhter Migration und transendothelialer Invasion der Krebszellen sowie einer insgesamt schlechteren Prognose assoziiert [179]. Im Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle konnte ebenfalls ein fördernder Einfluss von CELSR1 auf Migration und Invasion, aber auch die Proliferation herausgestellt werden [180]. Andererseits suggeriert die Beobachtung einer Hypermethylierung des *CELSR1*-Promotors in der zirrhotischen Leber sowie dem hepatozellulären Karzinom gegenüber Normalgeweben mögliche tumorsuppressive Effekte des Proteins [181]. Im humanen Mammakarzinom wurde *CELSR1* als Teil einer putativen prognostischen DNA-Signatur zur Vorhersage eines Übergangs des niedrig-gradigen DCIS zum invasiven Karzinom identifiziert: in DCIS-Fällen ohne invasive Komponente konnte gegenüber denen mit invasiven Bereichen ein erhöhter Anteil an Fällen beobachtet werden, der eine Amplifikation des *CELSR1*-Lokus aufwies [182]. In zwei weiteren Studien wurde eine Assoziation zwischen Östrogenrezeptor- α -positiven Mammakarzinomen und einer *CELSR1*-Expression herausgestellt [183, 184].

Die putative klinische Nutzbarkeit von CELSR1 als prognostischer sowie diagnostischer Biomarker für das humane Mammakarzinom wurde bisher nicht hinreichend bzw. nicht

untersucht. Auch ist ungeklärt, ob CELSR1 einen Einfluss auf Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms hat und somit (besonders als Plasmamembran-ständiger Rezeptor) eine mögliche neue therapeutische Zielstruktur darstellt.

1.7.4 Das Protein Collagen Triple Helix Repeat-Containing 1 (CTHRC1)

Collagen Triple Helix Repeat-Containing 1 (CTHRC1) ist ein auf Vertebraten beschränktes, dort hochkonserviertes, sezerniertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von rund 26 kDa (<http://www.uniprot.org/>) [185, 186]. Es weist eine nur geringe Ähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen auf und ist durch ein kurzes, N-terminal gelegenes Kollagen-Motif, das vermutlich eine Trimerisierung ermöglicht, charakterisiert [186].

CTHRC1 wurde funktionell zuerst als ein in Gefäßwänden verletzter Ratten-Arterien transient induziertes Protein beschrieben. Dort war die Expression auf Fibroblasten und glatte Muskelzellen beschränkt und auch extrazellulär detektierbar [186]. Im embryonalen und post-natalen Mausgewebe konnte ein Expressionsprofil für CTHRC1 beschrieben werden, das eine starke Überlappung mit dem von TGF β (engl. *Transforming Growth Factor- β*)-Familienmitgliedern aufwies [187]. Eine hohe Expression war im sich entwickelnden Knochen- und Knorpelgewebe nachweisbar. Ebenso wurde CTHRC1 unter anderem im Notochord, Neuralrohr, der Niere sowie im Herzen der Embryonen detektiert. Im adulten Stadium war CTHRC1 in Kollagen-reichen Geweben wie der Knochenmatrix, Knorpelgewebe und der Haut lokalisiert. Neben einer stromalen Expression war CTHRC1 auch in Epithelien wie der Epidermis sowie dem Lungen- und Speiseröhrenepithel nachweisbar [187].

In Übereinstimmung mit der Expression an Orten aktiver Kollagen-Ablagerung konnte für CTHRC1 eine Funktion in der Remodellierung verletzter Gefäße und der Knochenmatrix herausgestellt werden [186, 188, 189]. In remodellierenden Gefäßen wurde CTHRC1 als Inhibitor der Kollagen-Ablagerung (I und III) über eine Hemmung des SMAD2/3-*Signalling* in Fibroblasten und glatten Muskelzellen identifiziert. Da eine CTHRC1-Expression gleichzeitig über TGFB1 und BMP4 (engl. *Bone Morphogenetic Protein 4*) stimuliert werden konnte, ist CTHRC1 ein möglicher negativer *Feedback*-Regulator der Kollagen-Deposition in Gefäßwänden. Bemerkenswerterweise steigerte die Überexpression von CTHRC1 die Migration glatter Muskelzellen und Fibroblasten [186, 188]. Im Einklang mit einer möglichen Beeinflussung der Zellmotilität wurde eine Stimulation des Zellbewegungen regulierenden WNT/PCP-Signalweges über CTHRC1 belegt (siehe Abschnitt 1.7.2.2) [149, 190]. Es ist denkbar, dass sowohl die Modulation des Aktinzytoskelettes über die PCP-Signalkaskade, aber auch eine verminderte stromale Kollagen-Ablagerung einen Einfluss auf die Zellmotilität haben

können [191]. Eine neuere Studie, die CTHRC1 im Hypothalamus und der Hypophyse lokalisierte, deutet zudem auf eine Rolle von CTHRC1 als putatives zirkulierendes Hormon mit metabolischen Effekten hin [185].

Interessanterweise ist CTHRC1 mit Entzündungsprozessen [192] und humanen malignen Krebserkrankungen assoziiert [193]. Es konnte gezeigt werden, dass CTHRC1 in der Merzhahl solider Tumoren, darunter gastrointestinale Tumoren, Karzinome der Lunge, des Pankreas, der Leber und der Brustdrüse gegenüber dem jeweiligen Normalgewebe überexprimiert ist [193]. Eine teils gezeigte Assoziation der CTHRC1-Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien und schlechter Prognose sowie der *in vitro* und *in vivo*-Nachweis einer CTHRC1-vermittelten Förderung der Migration/Invasion von Tumorzellen und der damit verbundenen Metastasierung in einigen Tumorentitäten, untermauern eine potentielle Involvierung von CTHRC1 in die Tumorprogression, häufig via Stimulation des WNT/PCP-Signalweges [190, 194–197].

Im humanen Mammakarzinom wurde *CTHRC1* erstmals als ein in Myoepithelien/(Myo)fibroblasten exprimiertes Gen beschrieben [198, 199]. Turashvili und Kollegen identifizierten *CTHRC1* später als ein in epithelialen Zellen des ILC (invasiv-lobuläres Karzinom) gegenüber normalen Brustepithelzellen verstärkt exprimiertes Gen [200]. In zwei neueren Studien wurde die potentielle prognostische Relevanz einer CTHRC1-Proteinexpression im Brustkrebs analysiert [201, 202]. Beide Studien beschrieben eine hohe CTHRC1-Proteinexpression als prognostischen Faktor eines verkürzten Rezidiv-freien Überlebens. In einer der beiden Studien wurde der prognostische Effekt stromal exprimierten CTHRC1-Proteins in Abhängigkeit von ebenfalls stromal gebildetem Periostin untersucht [201], hingegen in der zweiten der Einfluss von im Tumorepithel exprimierten CTHRC1 auf das Überleben (unabhängig von einer Periostin-Expression) analysiert [202]. Zudem wurde nur in einer der beiden Studien eine multivariate Analyse durchgeführt, die jedoch keine signifikante Unabhängigkeit von CTHRC1 als prognostischer Marker bestätigen konnte [202]. Weitere unabhängige Studien sind folglich nötig, um eine mögliche prognostische Nutzbarkeit von CTHRC1 für das humane Mammakarzinom zu validieren. Es ist hervorzuheben, dass ein potentieller funktioneller Einfluss von CTHRC1, vor allem auf progressions-assoziierte Tumorzell-Eigenschaften wie die Migration, im Brustkrebs noch nicht analysiert wurde. CTHRC1 ist ein sezerniertes Protein mit wahrscheinlichem Zugang zum Blutkreislauf [185]. Eine Untersuchung der Verwendbarkeit von CTHRC1 als möglichen Blut-basierten Biomarker für das humane Mammakarzinom lag vor Durchführung der entsprechenden dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente nicht vor.

1.7.5 Die Neuromedin-Peptid-Familie

Die Neuromedin-Peptid-Familie wurde erstmals in den 1980er-Jahren in Rückenmarks-Isolaten von Schweinen identifiziert und zeichnete sich durch die Fähigkeit zur Stimulation der Kontraktion glatter Muskelzellen aus [203].

Die Namensgebung des Mitgliedes Neuromedin U (NMU) ist auf den ursprünglich beobachteten kontraktile Effekt des Peptids auf den Uterus der Ratte zurückzuführen [204]. Neuromedin U, insbesondere das amidierte C-terminale Pentapeptid, ist evolutionär stark konserviert, was eine essentielle Rolle sowohl für Wirbeltiere als auch Invertebraten unterstreicht. Humanes NMU besteht in seiner Prä-Pro-Form aus 174 Aminosäuren. Nach vollständiger Prozessierung resultiert das aus 25 Aminosäuren bestehende C-terminal lokalisierte, biologisch aktive Peptid NMU-25 [205].

Neuromedin U wird im Menschen in distinkten Regionen des Gehirns wie der Hirnanhangsdrüse und dem Hypothalamus sowie in peripheren Geweben, insbesondere dem Gastrointestinaltrakt und dem kardiovaskulären System, aber auch im Fettgewebe, Knochenmark und Immunzellen nachgewiesen [205–209].

Mit Neuromedin U-Rezeptor 1 und 2 (NMUR1 und NMUR2) sind bisher zwei G-Proteingekoppelte Rezeptoren identifiziert worden, deren Expressionsprofil mit demjenigen für NMU übereinstimmt und die nachweislich durch NMU-Peptide gebunden und stimuliert werden [207, 210–212]. NMUR1 wird vor allem in peripheren Geweben, NMUR2 hingegen verstärkt im Zentralnervensystem exprimiert [212].

Das breite Expressionsprofil von NMU und seinen beiden bekannten Rezeptoren spiegelt die vielfältigen physiologischen Funktionen des Peptides wider. Neben nachgewiesenen kontraktile Effekten von NMU auf die glatte Muskulatur einiger Darmabschnitte sowie der Harn- und Gallenblase des Menschen [213, 214], ist NMU als anorexigenes Peptid entscheidend in die Regulation der Nahrungsaufnahme und der Energie-Homöostase des Organismus involviert. Die intrazerebroventrikuläre Applikation von NMU in Ratten resultierte in einer reduzierten Nahrungsaufnahme und verringertem Körpergewicht [215], hingegen führte die Überexpression von NMU in transgenen Mäusen zu einem dünneren, hypophagischen Phänotypen mit verringertem Körperfettanteil [216]. Im Menschen konnte eine Korrelation zwischen Mutationen im *NMU*-Gen, die zu eingeschränkter bzw. ausbleibender Aktivität des Peptids führen, und Übergewicht oder Adipositas nachgewiesen werden [217]. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass NMU die Insulin-Sekretion der Inselzellen des Pankreas hemmt und so auch in der Peripherie des Körpers entscheidend Einfluss auf die Energie-Homöostase nehmen kann [218, 219]. Weiterhin konnte nach intravenöser NMU-

Applikation ein vasokonstriktiver Effekt in Ratten und Hunden beobachtet werden [220, 221], wobei die Ergebnisse hauptsächlich auf eine lokale Regulation des intestinalen Blutflusses hindeuten [205].

Neben weiteren Effekten auf die Knochenbildung, die Nozizeption und den zirkadianen Rhythmus, wird Neuromedin U auch mit pathophysiologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Krebsentstehung und -progression in Verbindung gebracht [205]. Mehrere Studien deuten auf entzündungsfördernde Effekte von NMU durch Induktion der Sezernierung von Faktoren wie Interleukin-6 und TNF- α durch Lymphozyten, Makrophagen und Mastzellen hin [222–224], obwohl NMU eine eher anti-inflammatorische Rolle im Zentralnervensystem zu haben scheint [225].

Erste beschriebene Assoziationen zwischen Neuromedin U und Krebserkrankungen deuteten ursprünglich auf tumorsuppressive Effekte des Proteins hin. So wurde NMU in Tumoren der Mundhöhle, im Speiseröhren-Karzinom und der Kopf-Hals-Krebserkrankung als ein in Krebszelllinien und primären Tumorzellen, teils über Methylierung, herabreguliertes Gen identifiziert. Ferner konnte ein suppressiver Effekt von NMU auf die Koloniebildung humaner Plattenepithelkarzinom-Zellen des Ösophagus beobachtet werden [226–228]. Im Gegensatz dazu wurde in der Mehrzahl der bisherigen Studien eine Aufregulation des NMU-Gens, darunter in Primärzellen der akuten myeloischen Leukämie (AML) [229], im Ovarial- [230], nicht-kleinzelligen Lungen- (NSCLC) [231], Harnblasen- [232], Pankreas- [233] und im klarzelligen Nierenzellkarzinom (CCRCC) [234] gezeigt. *In vitro*-Versuche belegten überwiegend fördernde Effekte von NMU auf das Zellwachstum und/oder progressions-assoziierte Eigenschaften wie das Migrations- und Invasionspotential der Tumorzellen [229, 231, 233]. In *in vivo*-Experimenten konnten diese Effekte bestätigt werden. So zeigten Wu und Kollegen im Nacktmaus-Xenograft-Modell eine NMU-vermittelte Steigerung der Tumorbildung, Lungenmetastasierung sowie der Tumorkachexie [232].

Erst kürzlich, während der Durchführung und Auswertung NMU-basierter Experimente im Rahmen der vorliegenden Dissertation, wurde Neuromedin U erstmalig in Verbindung mit dem humanen Mammakarzinom publiziert [235]. Rani und Kollegen beschrieben NMU als möglichen prädiktiven Biomarker für Resistenzen gegenüber HER2-zielgerichteten Therapien (siehe Abschnitt 1.5.1) im *in vitro*-Modell. Zudem wurde ein möglicher prognostischer Nutzen sowie eine funktionelle Involvierung von NMU in Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms postuliert [235]. Die Aussagekraft der genannten Studie ist jedoch aufgrund folgender Punkte eingeschränkt: eine vergleichende Expressionsanalyse von NMU im Normal- und Tumorgewebe der Brust und damit eine grundlegende Überprüfung einer putativen

Relevanz von NMU für die maligne Erkrankung der Brustdrüse im Menschen, erfolgte nicht. Zudem wurde kein spezifischer Endpunkt für die genutzten *in silico*-Überlebensdaten definiert, sondern Daten für das Rezidiv-freie, das Fernmetastasen-freie und das Gesamtüberleben kombiniert, was eine verlässliche Interpretation der prognostischen Daten erschwert. Zwar wurde mit HSP27 ein erster möglicher Interaktionspartner von Neuromedin U im Mammakarzinom identifiziert [235], eine umfassende genomweite Analyse zur Identifizierung NMU-modulierter zellulärer Prozesse und Schlüsselmoleküle im Mammakarzinom, erfolgte hingegen nicht.

NMU ist ein sezerniertes Protein, das in geringen Mengen im Blutkreislauf des Menschen nachgewiesen wurde [208]. Ketterer und Kollegen lieferten erste Hinweise auf eine mögliche Nutzbarkeit von NMU als Serum-basierten Biomarker für das humane Pankreaskarzinom [233]. Eine entsprechende mögliche Verwendbarkeit von NMU als Serumbiomarker für das humane Mammakarzinom wurde bisher nicht analysiert.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Prognose der Brustkrebs-Erkrankung ist entscheidend abhängig von Zeitpunkt der Diagnosestellung, mit einer hohen Überlebenswahrscheinlichkeit bei Detektion und Therapie der Erkrankung in einem frühen, noch lokal begrenzten Stadium. Die anerkannten Limitationen des derzeitigen „Goldstandards“ der Brustkrebs-Früherkennung, der *Screening*-Mammographie, unterstreichen den Bedarf an neuen komplementären Strategien. Ein vielversprechender, minimal-invasiver Ansatz ist die Detektion von in Körperflüssigkeiten wie Blutserum befindlichen Proteinbiomarkern, die das Vorliegen einer Brustkrebserkrankung anzeigen können. Großes Potential für einen routinemäßigen Einsatz haben mikrofluide Chip-Technologien, die sich durch eine schnelle und einfache Durchführbarkeit sowie geringe Produktionskosten auszeichnen. Das EU-geförderte, euregionale, interdisziplinäre MicroBioMed-Projekt hat sich die Entwicklung eines mikrofluiden, Blutserum-basierten Chip-Systems, vorrangig für die Brustkrebs-Früherkennung, zum Ziel gesetzt. Monoklonale Antikörper gegen validierte Serum-Proteinbiomarker sollten von Kooperationspartnern schließlich in den entwickelten Biochip integriert werden.

Als biomedizinischer Partner innerhalb des MicroBioMed-Projektes war die Identifizierung und Validierung neuer potentieller Serum-Proteinbiomarker für die Brustkrebs-Früherkennung mit adäquater klinischer Spezifität und Sensitivität ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Aus einem über drei verschiedene Ansätze (Gewebe-basierter cDNA-*Microarray*, proteomische Serum-Analyse, *in silico*-Analyse) ermittelten initialen Kandidaten-*Pool* sollten in zwei nachfolgenden

Stufen potentielle Serum-Proteinbiomarker identifiziert und schließlich an einem Kollektiv humaner Seren validiert werden.

In der ersten Stufe galt es die Tumor-spezifische Aufregulation in humanen Brustkrebs-Zelllinien sowie an unabhängigen Gewebekollektiven (Brusttumor- und Normalgewebe) auf mRNA- und Proteinebene zu bestätigen. Im Falle fehlender Informationen in öffentlichen Datenbanken hinsichtlich einer Sezernierung, sollten *in vitro*-Sezernierungsanalysen für ausgewählte Kandidaten durchgeführt werden. Ferner galt es über Korrelationsanalysen diejenigen Biomarker-Kandidaten zu ermitteln, deren Expression mit Indikatoren eines frühen Tumorstadiums assoziiert ist und somit eine besondere potentielle Eignung für die Früherkennung aufweisen. Um möglichst hohe Werte für die klinische Spezifität und Sensitivität zu erzielen wurde eine Kombination von Biomarkern zu einem *Panel* angestrebt, das in der Lage ist möglichst alle molekularen Subtypen der heterogenen Brustkrebserkrankung zu detektieren. Aus diesem Grund sollte das Subtyp-spezifische Expressionsmuster der Kandidaten in unabhängigen Brustkrebs-Gewebekollektiven bestimmt werden.

Vielversprechende, innerhalb der ersten Stufe identifizierte Kandidaten galt es in der zweiten Stufe anhand eines Kollektivs humaner Serumproben von Brustkrebs-Patientinnen (überwiegend niedriges Tumorstadium) und gesunden Spenderinnen zu validieren. Mittels ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Analyse sollte die Beurteilung der klinischen Effizienz von Einzelmarkern sowie deren Kombination erfolgen. Das vorrangige Ziel war die Erreichung maximaler klinischer Spezifität bei adäquater klinischer Sensitivität. Abschließend sollte die cDNA möglicher geeigneter Kandidaten in mit Hexa-Histidin-*Tag* versehene Vektoren kloniert werden. Kooperationspartner innerhalb des MicroBioMed-Projektes sollten schließlich, unter Verwendung der klonierten Vektoren, monoklonale Antikörper generieren, die mittelfristig in den angestrebten mikrofluiden Biochip integriert werden können.

Neben der Früherkennung von Krebserkrankungen verfolgt die molekulare Onkologie die Aufschlüsselung molekularer Ursachen der Krebsentstehung und –progression mit dem Ziel der Identifizierung zentraler Schlüssel-moleküle und relevanter Signalwege der Karzinogenese, die neue therapeutische Zielstrukturen darstellen können. Prognostische und prädiktive Biomarker unterstützen den Kliniker bei der Findung einer adäquaten individuellen Therapie mit einem größtmöglichen *Benefit* für den Patienten.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit bestand daher darin die noch relativ wenig erforschten Tumor-assoziierten Gene *AGR3*, *CELSR1*, *CTHRC1* und *NMU* hinsichtlich ihrer möglichen klinischen

Nutzbarkeit als prognostische Marker für das humane Mammakarzinom mithilfe von Kaplan-Meier-Überlebensanalysen zu untersuchen.

Die zudem vor Beginn dieser Arbeit noch unbekannte putative funktionelle Involvierung der genannten Kandidaten AGR3, CELSR1, CTHRC1 und NMU in die Karzinogenese des humanen Mammakarzinoms, sollte über die Generierung stabiler und transienter *gain/loss-of-function in vitro*-Brustkrebs-Modelle untersucht werden. Mithilfe von *in vitro*-Experimenten galt es ihren potentiellen Einfluss auf fundamentale, während der Krebsentstehung und im Laufe der malignen Progression veränderte zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose, Migration und Adhäsion zu analysieren.

Für ein auf Grundlage der gewonnenen *in-vitro*-Daten als potentiell relevant für die Karzinogenese des humanen Mammakarzinoms eingestuften Kandidaten sollte die molekulare Wirkungsweise unter Nutzung der *Microarray*-Technologie im Detail untersucht werden. Vorrangiges Ziel war es mögliche zentrale, modulierte biologische Prozesse (Signalwege) sowie Schlüsselmoleküle zu identifizieren, die zur Ausprägung der beobachteten Krebs-relevanten phänotypischen Effekte beitragen können.

2 Material und Methoden

2.1 Klinisches Patientenmaterial

2.1.1 Kryokonserviertes humanes Frischgewebe

Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein Kollektiv bestehend aus insgesamt 62 kryokonservierten Brusttumoren und 13 Brust-Normalgewebeproben, erhalten aus der RWTH zentralisierten Biobank (RWTH cBMB) der Uniklinik RWTH Aachen, aufgebaut. Das Gewebematerial wurde für Expressionsstudien der Biomarker-Kandidaten innerhalb des MicroBioMed-Projektes genutzt. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte nach Diagnosestellung eines primären Mammakarzinoms in den Jahren 2010 und 2011. Alle Patientinnen hatten eine Einverständniserklärung zur Kryokonservierung und Verwendung ihres Gewebes für Forschungszwecke unterzeichnet. Für die Untersuchungen des Brustgewebematerials lag ein positives Votum seitens der Ethikkommission der Uniklinik RWTH Aachen (EK-206/09) vor. Nach Geweberesektion wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Bestimmung des Anteils an Normal- und Tumorepithel wurden Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Schnitte (10 µm) angefertigt. Nur Mammakarzinom-Proben mit einem Tumorzellanteil von mehr als 70% und Brust-Normalgewebeproben mit einem Epithelanteil von mindestens 30% wurden in die Untersuchungen einbezogen. Die Auswahl der Fälle erfolgte unselektiert und konsekutiv nach Verfügbarkeit der Gewebe. Eingeschlossen in das Kollektiv wurden Patientinnen mit einem unilateralen, primären Mammakarzinom ohne vorangegangenen Brustkrebs-Befund. Der Erhalt einer neoadjuvanten Chemotherapie stellte ein Ausschlusskriterium dar. Klinische Pathologen bewerteten die Tumor-Histologie nach den Kriterien der Welt-Gesundheits-Organisation (WHO) und die Tumor-Klassifikation nach dem etablierten TNM-System [20]. Der histologische Grad wurde nach dem System von Bloom und Richardson, welches durch Elston und Ellis modifiziert wurde [19], bestimmt. Die klinisch-pathologischen Parameter des Gewebekollektivs sind in Tabelle 6-1 des Anhangs zusammengefasst.

2.1.2 Formalin-fixiertes, Paraffin-eingebettetes Gewebe (FFPE)

Die Proteinexpression des Kandidaten AGR3 in humanen Mammakarzinom- und nicht neoplastisch-veränderten Brustgeweben wurde durch immunhistochemische Färbung eines

zuvor beschriebenen *Tissue Microarray* der Universitätsklinik Regensburg bestehend aus 289 primären Brusttumoren und korrespondierenden Brust-Normalgeweben analysiert [236]. Für 272 Brustkrebs-Patientinnen lagen Daten über deren Krankheitsverlauf (*Clinical Follow-Up*) vor, im Median über einen Zeitraum von 79 Monaten (Zeitspanne 0-149 Monate), so dass zusätzlich die potentielle prognostische Relevanz dieses Kandidaten untersucht werden konnte. Die klinisch-pathologischen Parameter der auswertbaren Brustkrebs-Fälle für die AGR3-Färbung (190 auswertbare Fälle, davon 188 mit *Follow-Up*-Daten) sind in Tabelle 6-2 (Anhang) zusammengefasst. Für die Kandidaten ASPN, CTHRC1 und NMU wurden zwecks Überprüfung ihrer Expression und Lokalisation im Mammakarzinom im Vergleich zu Brust-Normalgeweben, FFPE-Einzelschnitte gefärbt.

2.1.3 Kryokonserviertes humanes Serum

Für die Validierung der im Rahmen des MicroBioMed-Projektes identifizierten potentiellen Brustkrebs-Biomarker wurde ein Serumkollektiv bestehend aus insgesamt 96 humanen, präoperativen Serumproben erstellt. Die Serumproben von Brustkrebs-Patientinnen (n=48) wurden über die Stiftung PATH (<http://stiftungpath.org/>) bezogen, die Kontrollseren gesunder Frauen (n=48) konnten aus dem Universitätsklinikum Erlangen erhalten werden. Alle Patientinnen hatten eine Einverständniserklärung zur Konservierung und Verwendung ihres Serums für Forschungszwecke unterzeichnet. Für Untersuchungen des Serum-Materials lag ein positives Votum seitens der Ethikkommissionen der beteiligten Zentren vor (EK-255/06, Medizinische Fakultät Universität Bonn; EK-3937 und EK-4514, Medizinische Fakultät Universität Erlangen). Zwecks besserer Vergleichbarkeit erfolgte die Probenauswahl so, dass das mediane Alter beider Gruppen identisch war (59,5 Jahre). Von jeder Patientin wurden 10 ml Vollblut in Serum-Röhrchen entnommen, das Serum präpariert und sofort bei -80 °C eingefroren. Die klinisch-pathologischen Parameter des Serumkollektivs sind Tabelle 6-3 (Anhang) zusammengefasst.

2.1.4 *In silico*-Mammakarzinom-Studie

Zur Validierung eigenständig generierter Expressionsdaten für analysierte Kandidatengene, deren Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern sowie zur Durchführung univariater Überlebensanalysen wurde ein *in silico*-Kollektiv einer unabhängigen Studie bestehend aus insgesamt 997 Brustkrebs-Fällen, von denen für 516 Fälle eine PAM50-Klassifizierung in die molekularen Brustkrebs-Subtypen vorlag, herangezogen [237]. Die

Expressions-Daten (*Illumina HiSeq*) für das jeweilige Gen wurden über das *cBio Cancer Genomics* Portal (<http://cbioportal.org>) [238] bezogen. Die korrespondierenden klinischen Parameter und Überlebensdaten der analysierten Brustkrebs-Fälle konnten über das TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)-Datenportal (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaDownload.jsp>) erhalten werden. Die spezifischen Kennungen (*IDs*) der analysierten Brustkrebsfälle wurden kürzlich publiziert [79]. Die klinisch-pathologischen-Parameter des Kollektivs sind zudem zusätzlich in Tabelle 6-4 des Anhangs zusammengefasst.

2.2 Bakterienstämme

Die Nutzung der Bakterienstämme *Escherichia coli* JM83 und DM5a erfolgte zwecks Plasmid-Vermehrung und -Klonierung.

2.3 Humane Mammakarzinom-Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen und den Angaben des Anbieters entsprechend kultiviert. Alle Zelllinien wurden in dreimonatigen Abständen auf die Abwesenheit von Mycoplasmen hin untersucht. Die genutzten Zelllinien sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Verwendete humane Mammakarzinom-Zelllinien und deren Ursprung (nach [239])

Zelllinie	Ursprungsgewebe
MCF10A	benigne Veränderung der Brust
MCF12A	spontane Immortalisation
MCF7	invasiv duktales Karzinom, pleurale Effusion
BT20	invasiv duktales Karzinom, Primärtumor
BT474	invasiv duktales Karzinom, Primärtumor
BT549	papilläres invasiv duktales Karzinom, Primärtumor
MDA-MB-231	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-415	Adenokarzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-436	invasiv duktales Karzinom, pleurale Effusion
MDA-MB-468	Adenokarzinom, pleurale Effusion
T47D	invasiv duktales Karzinom, pleurale Effusion
UACC812	invasiv duktales Karzinom, Primärtumor
HCC1937	duktales Karzinom, Primärtumor
Hs578T	invasiv duktales Karzinom, pleurale Effusion
SKBR3	Adenokarzinom, pleurale Effusion

2.4 Geräte, Software, Chemikalien und Lösungsmittel

2.4.1 Geräte

Tabelle 2-2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Axiovert 200 Mikroskop	Zeiss, Jena
ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Weiterstadt
Brutschrank (20% O ₂ , 5% CO ₂ , 37 °C)	Biorad, München
CASY® Cell Counter und Analyzer	OLS OMNI Life Science, Bremen
Digital pH-Meter	Schärfe System, Reutlingen
Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf, Wesseling
Eppendorfszentrifuge 5415C (Rotor: UE001)	Eppendorf, Wesseling
Gel-Dokumentationseinheit	MWG Biotech AG, Ebersberg
Gene Pulser II Electroporation System	Biorad, München
Kryotom HM560	Microm Laborgeräte, Walldorf
Laborwaage	Laborgeräte, Walldorf
LightCycler IQ5	Biorad, München
Megafuge 1.0 (Rotor: BS4402/A)	Sartorius, Göttingen
NanoDrop ND1000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
NICOOL LM10	Air Liquide GmbH, Düsseldorf
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Reinraumwerkbank Hera Safe	Hera Safe Heraeus/Kendro, Düsseldorf
Schüttler MTS4	IKA-Werke, Staufen
Stromversorgungsgerät	Gibco / BRL, Eggenstein
Thermoblock DRI-BlockDB-2A	Techne, Burkhardtsdorf
Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Waltham
Tischzentrifuge 4515D	Eppendorf, Wesseling
UV-Leuchttisch TFX	Vilber Lourmat, Frankreich
Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.4.2 Software und Datenbanken

Tabelle 2-3: Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Webadresse/Hersteller
cBioPortal Datenbank	http://www.cbioportal.org/public-portal/
CoralDRAW Bildbearbeitung	Corel Corporation, USA
ENSEMBL Datenbank	http://www.ensembl.org
Expasy Online Portal	http://www.expasy.org
Genomatix Datenbank	http://www.genomatix.de
GeneCards Datenbank	http://www.genecards.org
GOBO-Datenbank	http://co.bmc.lu.se/gobo/
GraphPad Prism 5.0 Gold Statistik Software	GraphPad Prism, La Jolla, CA, USA
ImageJ	National Institute of Health, USA
Kaplan-Meier-Plotter Datenbank	http://kmplot.com/analysis/
Primer3 Online Portal	http://primer3.ut.ee/
PUBmed Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
PFAM Online Portal	http://pfam.sanger.ac.uk
SPSS Statistik Software (17.0)	SPSS, Chicago, IL, USA
The Human Protein Atlas Datenbank	http://www.proteinatlas.org/
UCSC Genome Cancer Browser Datenbank	https://genome-cancer.ucsc.edu/
UniProt	http://www.uniprot.org/

2.4.3 Chemikalien

Sofern nicht anders aufgeführt wurden alle Chemikalien in p.A. Qualität oder in der reinsten erwerbbaren Form verwendet. Nicht aufgelistete Chemikalien wurden von den Firmen Merck und Sigma-Aldrich bezogen oder sind im entsprechenden Abschnitt des Methodenteils vermerkt.

Tabelle 2-4: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose SeaKem LE agarose	Cambrex, Rockham, ME, USA
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dihtiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FKS)	Seromed Biochrom, Deisenhofen
FuGENE HD Transfektions-Reagenz	Roche Diagnostics, Mannheim
Genitacin (G418)	Life Technologies, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
HiPerFect Transfektions-Reagenz	Qiagen, Hilden
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	PAA, Cölbe

Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Matrigel	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Penicillin; Streptomycin	Biochrom, Berlin
Peroxidase Blocking Reagenz	Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Niederlande
Tris	Trichostatin
Tris-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
TRIzol®	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Tunicamycin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe
	Fluka, Neu-Ulm

2.4.4 Lösungsmittel

Tabelle 2-5: Lösungsmittel

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.5 Puffer und Lösungen

Im Folgenden nicht aufgeführte Puffer und Lösungen sind im jeweiligen Abschnitt des Methodenteils beschrieben oder Bestandteile kommerzieller Kits.

Tabelle 2-6: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Allgemeine Puffer und Lösungen	
10×PBS-Puffer (pH 7,5)	160 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 M NaCl
10×TBS-Puffer (pH 7,6)	500 mM Tris-HCl, 1,5 M NaCl
DEPC-H ₂ O	0,1% (w/v) DEPC in H ₂ O, ü. N. gerührt, autoklaviert
Eosin-Lösung	1 g Eosin in 100 ml H ₂ O
Lysepuffer (pH 7,2)	0,64 M NH ₄ Cl, 0,04 M KHCO ₃ , 0,01 M EDTA, mit ddH ₂ O auf 2 l auffüllen
Mayers-Hämalaun-Lösung	1 g Hämatoxylin, 200 mg Na-Iodat, 50 g Aluminiumkaliumsulfat, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure, in 1 l H ₂ O
Methylenblau-Lösung	0,1% (w/v) Methylenblau in 100% Ethanol
Tris-Puffer (pH 7,6)	10 mM Tris-HCl, mit ddH ₂ O auf 100 ml auffüllen
Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	
10×TBE-Puffer	890 mM Tris, 20 mM EDTA, 890 mM Borsäure (pH 8,3)
5×Ladepuffer	2,5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM EDTA (pH 8,0), 90% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol
Agarose-Lösung	2% (w/v) Agarose in 1×TBE-Puffer
Ethidiumbromid-Lösung	35 µl Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) in 1×TBE-Puffer (350 µg/l)
Puffer und Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot	
Blocking-Lösung	5% (w/v) Milchpulver in 1×TBS, 0,1% Tween 20
Lyse-/Probenpuffer	1 ml 4×NuPage-SDS Puffer Invitrogen, 200 µl 1 M DTT, ad. 2,8 ml ddH ₂ O
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,2), 250 mM NaCl, 2% (v/v) NP-40, 0,1% (w/v) SDS, 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat, 2,5 mM EDTA
1×SDS-Page Laufpuffer	50 ml NuPage 20×Laufpuffer Invitrogen (MOPS/MES), ad. 1 l ddH ₂ O
Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol ad. 1 l ddH ₂ O
TBS-Tween 20	1×TBS, 0,1% Tween 20
Puffer und Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
dNTP-Mix	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 2,5 mM
MgCl ₂	25 mM Stocklösung Promega, Mannheim
10×PCR-Puffer	500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3)
10×MSP-Puffer	500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl ₂
Puffer und Lösungen für die Zellkultur	
10× PBS-Puffer (pH 7,5)	160 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 M NaCl
Kristallviolett-Lösung	0,25% (w/v) Kristallviolett in 10% Formaldehyd/80% Methanol/10% H ₂ O
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in 1×PBS
Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie	
Tris-EDTA-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,05% Tween 20, pH 9,0
Natriumcitrat-Puffer	10 mM Natriumcitrat, 0,05% Tween 20, pH 6,0

2.6 Medien für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien wurden von der Firma PAA Laboratories (Cölbe) bezogen und mit den aufgeführten Zusätzen supplementiert.

Tabelle 2-7: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien

Zelllinie	Medium und Zusätze
BT549	DMEM 4,5 g/l Glukose; 10% FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin
Hs578T	DMEM 1,0 g/l Glukose; 10% FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 10 µg/ml Insulin
MCF7	RPMI 1640, 10% FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 10 µg/ml Insulin, nicht-essentielle Aminosäuren, 1 mM Natriumpyruvat
SKBR3	DMEM 1,0 g/l Glukose; 10% FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin
UACC812	RPMI 1640, 20% FKS, 2 mM L-Glutamin; 50 Einheiten/l Penicillin; 50 mg/l Streptomycin, 20 ng/ml EGF

2.7 Medien für die Anzucht von *Escherichia coli*

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Medien für die Bakterienkultivierung

Medium^a	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt; ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,4)
LB-Agar	10 g NaCl, 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 15 g Bacto-Agar; ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,4)
SOC-Medium	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose; ad 1000 ml H ₂ O (pH 7,0)

^a alle Medien wurden bei 121 °C und 2 bar für 20 Minuten autoklaviert; zur Selektion nach Transformation wurden die Medien mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt

2.8 Antikörper und *Blocking*-Peptide

Tabelle 2-9: Verwendete Primärantikörper und *Blocking*-Peptide

Bezeichnung	Klonalität	Wirtsspezies	Epitop	Hersteller
AGR2 (HPA007912)	polyklonal	Kaninchen	intern	Atlas Antibodies
AGR3 (ab82400)	monoklonal	Maus	intern	Abcam
ASPN (HPA008435)	polyklonal	Kaninchen	intern	Atlas Antibodies
β-Aktin (A5441)	monoklonal	Maus	N-terminal	Sigma-Aldrich
β-Tubulin (ab6046)	polyklonal	Kaninchen	N-terminal	Abcam
CELSR1 (E-19, sc-46839)	polyklonal	Ziege	N-terminal, extrazellulär	Santa Cruz
CELSR1 (E-19) Peptid	-	-	-	Santa Cruz
CELSR1 (ABT119)	polyklonal	Kaninchen	N-terminal, extrazellulär	Merck Millipore
CTHRC1 (ab85739)	polyklonal	Kaninchen	C-terminal	Abcam
CD44 (156-3C11)	monoklonal	Maus	Region Pro210	Cell Signaling
MYC (D84C12)	monoklonal	Kaninchen	N-terminal	Cell Signaling
DKK1 (#4687)	polyklonal	Kaninchen	Region Gln75	Cell Signaling
LRP6 (C47E12)	monoklonal	Kaninchen	extrazellulär	Cell Signaling
P-LRP6 (2568)	polyklonal	Kaninchen	Region Ser1490	Cell Signaling

NKD2 (C67C4)	monoklonal	Kaninchen	Region Ala217	Cell Signaling
NMU (HPA025926)	polyklonal	Kaninchen	C-terminal	Atlas Antibodies
RAC1 (Kit #8815)	monoklonal	Maus	k.A.	Cell Signaling

k.A.: keine Angabe

Tabelle 2-10: Verwendete Sekundärantikörper

Bezeichnung	Klonalität	Wirtsspezies	Hersteller
Anti-Kaninchen/HRP (P0448)	polyklonal	Ziege	Dako
Anti-Maus/HRP (P0447)	polyklonal	Ziege	Dako
Anti-Ziege/HRP (P0449)	polyklonal	Kaninchen	Dako

2.9 Molekularbiologische Kits

Tabelle 2-11: Verwendete molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
Active Rac1 Detection Kit	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay	Promega, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay, 8 µm	Cell Biolabs, San Diego, CA, USA
UltraVision Quanto Detection System HRP DAB	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
ELISA Kit for Anterior Gradient Protein 2 (AGR2)	USCN Life Science Inc., Wuhan, China
ELISA Kit for Anterior Gradient Protein 3 (AGR3)	Cusabio Biotech, Wuhan, China
ELISA Kit for Asporin (ASPN)	Cusabio Biotech, Wuhan, China
ELISA Kit for Collagen Triple Helix Repeat Containing Protein 1 (CTHRC1)	USCN Life Science Inc., Wuhan, China
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim
IQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, München
Mycoplasmen-Detektions PCR Kit™	Minevra Biolabs, Berlin
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Machery-Nagel, Düren
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RNAi Human/Mouse Starter Kit	Qiagen, Hilden
UltraVision Quanto Detection System HRP Polymer	Thermo Scientific, Fremont, CA, USA
Vivapure anti-HSA/IgG-Kit	Sartorius, Göttingen
XTT Cell Proliferation Kit™ II	Roche Diagnostics, Mannheim
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Kit	Applied Biosystems, CA, USA

2.10 Enzyme für die Plasmid-Klonierung

Tabelle 2-12: Verwendete Enzyme für die Plasmid-Klonierung

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
NheI-HF	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
NotI-HF	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA

2.11 Rekombinantes Protein

Tabelle 2-13: Kommerzielles verwendetes rekombinantes Protein

Protein	Hersteller
AGR2	Biorbyt, Cambridge, England
AGR3	Biorbyt, Cambridge, England

2.12 Oligonukleotide

Tabelle 2-14: Oligonukleotide für die *Real-Time* PCR

HUGO Name	Sequenz (5'→3')	T _A [°C]	Produkt [bp]
AGR2 F	ATTGGCAGAGCAGTTTGTCC	60	179
AGR2 R	GAGCTGTATCTGCAGGTTTCGT		
AGR3 F	CTGGAGGATTGTCAATACTC	60	103
AGR3 R	GCATAAGGTTTAGCATGAT		
ASPN F	TCACTTTATGGTCTGATCCTGAAC	60	150
ASPN R	GTTCTGCTAATGATTGTTGGGAAGA		
CD44 F	GCATCGGATTTGAGACCTGC	60	125
CD44 R	GGAGGTGTTGGATGTGAGGA		
CELSR1 F	CGCTCATGGAGGTGTCTGT	60	140
CELSR1 R	CAGGAACCTTCTCCTGGGACAT		
CLDN1 F	CTATGACCCTATGACCCAGT	60	158
CLDN1 R	TTGGATAGGGCCTTGGTGT		
CTHRC1 F	CCAACTACAAGCAGTGTTTCATGGA	60	175
CTHRC1 R	TTGAATGTGAAATACCAACGCTGAC		
DDIT3 F	AGCAGATGTGCTTTTCCAGA	60	185
DDIT3 R	TTGATTCTTCCTCTTCATTTC		
DKK1 F	CCCCGGGAATTACTGCAAAA	60	142
DKK1 R	AGACAAGGTGGTCTTCTGGA		
GAPDH F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA	60	289
GAPDH R	TGGACTCCACGACGTACTCA		
GHSR1a F	ACCAGAACCACAAGCAAACC	60	141
GHSR1a R	GGCTGATCTGAGCAATCTCC		
GHSR1b F	CTTGGGACACCAACGAGTG	60	263
GHSR1b R	AGGACCCGCGAGAGAAAGC		

<i>GREM1</i> F	ACAGTATGAGCCGCACAGC	60	150
<i>GREM1</i> R	TGAGTCTGCTCTGAGTCATTGTG		
<i>LRP5</i> F	AAGCTGTGAATGTGGCCAAG	60	152
<i>LRP5</i> R	CACGATGCAGGTCTTCATGT		
<i>LRP6</i> F	GCATGTGATTGGCTTGGAGA	60	176
<i>LRP6</i> R	TCTCCCCAGTCTGTCCAGTA		
<i>MMP1</i> F	CACATCTGACCTACAGGATTGAA	60	143
<i>MMP1</i> R	TGATGTCTGCTTGACCCTCA		
<i>MYC</i> F	ATTCTCTGCTCTCCTCGACG	60	155
<i>MYC</i> R	AGCCTGCCTCTTTTCCACA		
<i>NKD2</i> F	GATGACGGAGAGAGGGCAG	60	150
<i>NKD2</i> R	CCCGCAGTTGTCAAAGTCAT		
<i>NMU</i> F	GGATTACAGCCTGAACAACAGC	60	143
<i>NMU</i> R	GGCTTTGGTAGCATTCCCAT		
<i>NMUR1</i> F	CAGCCAGGTCCAGATACACC	60	164
<i>NMUR1</i> R	CAGGCCATCTGTCCACTGT		
<i>NMUR2</i> F	CATCATCCAGGTACCTCCT	60	120
<i>NMUR2</i> R	TTCCCTTCATCTGCCTCAAG		
<i>NTSR1</i> F	ACCGTCAAGGTCGTCATACA	60	170
<i>NTSR1</i> R	ATGCTGAATGTGCTGTGCTC		
<i>PLG</i> F	CTAAGAAGCAGCTGGGAGCA	60	141
<i>PLG</i> R	TGGAGGACTTCCTGTTTTTCAG		
<i>S100P</i> F	ACGCAGACCCTGACCAAG	60	151
<i>S100P</i> R	TGAACTCACTGAAGTCCACCTG		
<i>WNT11</i> F	CGTGTGCTATGGCATCAAGT	60	144
<i>WNT11</i> R	GTGTGCATGAGCTCCAGGT		

F: Forward; R: Reverse; T_A: Anlagerungs-Temperatur; bp: Basen-Paare

Tabelle 2-15: Oligonukleotide für die Plasmid-Klonierung

Name	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Produkt [bp]
<i>AGR2</i> F- NheI	CAGGCTAGCATGGAGAAAATTCCAGTGTGAGC	66	545
<i>AGR2</i> R- NotI	CAGGCGGCCGCCAATTCAGTCTTCAGCAACTTGAGAGC	78	
<i>AGR3</i> F- NheI	CAGGCTAGCATGATGCTACACTCAGCTTTGGG	68	521
<i>AGR3</i> R- NotI	CAGGCGGCCGCTAGCTCTGACTGAATAAGTCTTAATGC	74	

F: Forward; R: Reverse; T_m: Schmelz-Temperatur; bp: Basen-Paare

Tabelle 2-16: Oligonukleotide für die Sanger-Sequenzierung

Name	Sequenz (5'→3')
pT-Rex-DEST30-CMV-Seq F	CCTGGAGACGCCATCCACGC
<i>AGR2</i> F1-Seq	TCCAGTGTGAGCATTCTTGC
<i>AGR2</i> F2-Seq	ATGAGTGCCACACAGTCAA
<i>AGR2</i> F3-Seq	GCCAGTATGTCCCCAGGATT
<i>AGR3</i> F1-Seq	ACTCAGCTTTGGGTCTCTGC
<i>AGR3</i> F2-Seq	CATCACCTGGAGGATTGTCA
<i>AGR3</i> F3-Seq	TGGGCAATATGTGCCTAGAA

<i>CTHRC1</i> F1-Seq	AATGGCATTCCGGGTACA
<i>CTHRC1</i> F2-Seq	CAGGACCTCTTCCCATTGAA
<i>NMU</i> F1-Seq	ATGCTGCGAACAGAGAGCTG
<i>NMU</i> F2-Seq	ATGCTACCAAAGCCTCAGGA
pMS-CMV-Seq F	GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCC
F: <i>Forward</i>	

Tabelle 2-17: Oligonukleotide zum Nachweis der stabilen genomischen Plasmid-Integration

Name	Sequenz (5'→3')	T _A [°C]	Produkt [bp]
CMV-Integ F	CCGGTGATATCCTCGACG	62	
<i>CTHRC1</i> -Integ R	CTCAGAGGCGCTCGACGG	62	147
<i>NMU</i> -Integ R	ATTGGAGCACCTCGGCAGG	62	152

Integ: Integration; F: *Forward*; R: *Reverse*; T_A: Anlagerungs-Temperatur; bp: Basen-Paare

2.13 Vektoren

2.13.1 Überexpressions-Vektoren

2.13.1.1 pT-REx-DEST30

Funktionelle Überexpressions-Studien dieser Arbeit für die Gene *AGR3* und *NMU* basieren auf Nutzung des Vektors pT-REx-DEST30.

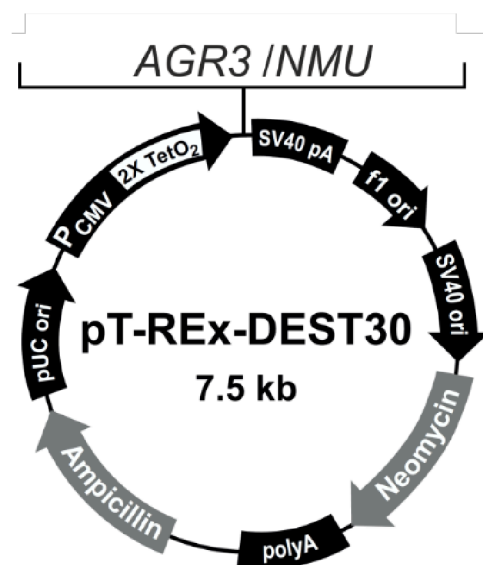


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des pT-REx-DEST30-Vektors. Die Vollängen-cDNA des jeweiligen Gens (*AGR3*, *NMU*) befindet sich unter Kontrolle des für die Überexpression genutzten CMV-Promotors (P_{CMV}) (verändert nach *Instruction Manual* pT-REx-DEST Gateway™ Vectors, Invitrogen).

Die Vollängen-cDNA des jeweiligen Gens befindet sich unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Der Vektor weist eine Ampicillin-Resistenz-Kassette sowie ein Neomycin-Resistenz-Gen für die prokaryotische bzw. die eukaryotische Zell-Selektion auf. Die gebrauchsfertigen Konstrukte für *AGR3* (IOHx29439) und *NMU* (IOHx10556) wurden kommerziell erworben (Source BioScience LifeSciences, Nottingham, England). Der Leer-Vektor als Negativkontrolle wurde über die Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen (Abbildung 2-1).

2.13.1.2 pMS-L-SNAP-mut 2715 IV

Für die Herstellung rekombinanten *AGR2*- und *AGR3*-Proteins zwecks Antikörper-Generierung durch Kooperationspartner im MicroBioMed-Projekt, wurde der Vektor pMS-L-SNAP-mut 2715 IV genutzt, der freundlicherweise von Dr. Christoph Stein (Fraunhofer-IME, Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen) zur Verfügung gestellt wurde (Abbildung 2-2).

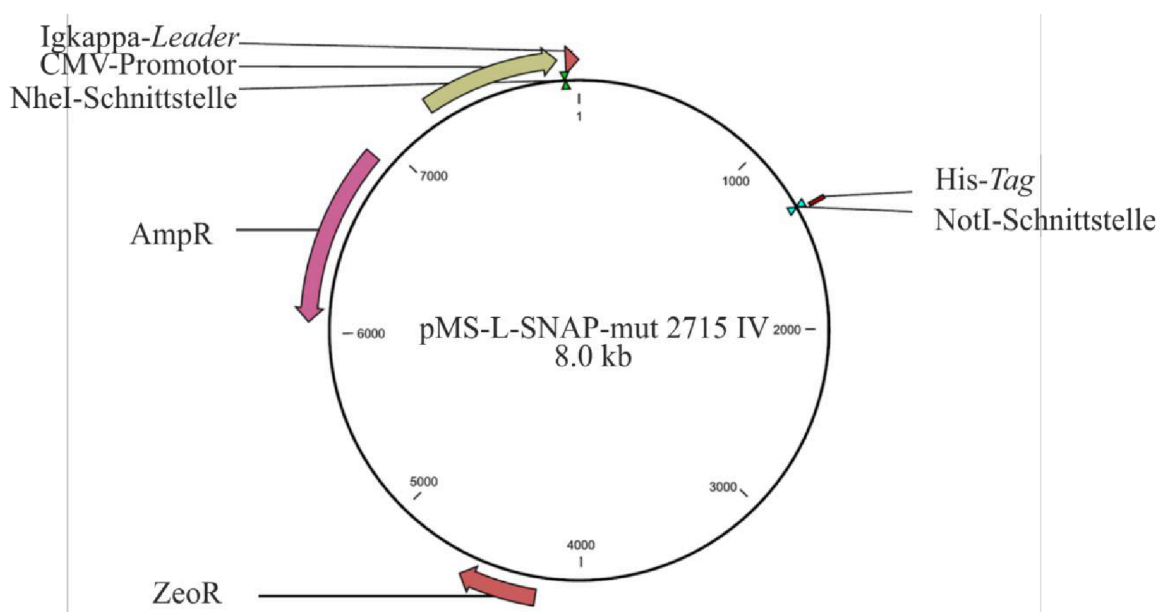


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Vektors pMS-L-SNAP-mut 2715 IV. Für die Überexpression der Gene *AGR2* und *AGR3* wurde die jeweilige Vollängen-cDNA (ohne Terminations-Codon) über die Restriktionsschnittstellen für *NheI* und *NotI* in einen gemeinsamen offenen Leserahmen mit einem zum C-Terminus des Proteins korrespondierenden Hexa-His-Tag unter die Kontrolle des CMV-Promotors kloniert. Der im Vektor vorhandene *Igk-Leader* wurde so, zwecks Nutzung des endogenen Sezernierungs-Signals, entfernt. AmpR: Ampicillin-Resistenz; ZeoR: Zeocin-Resistenz.

Die Volllängen-cDNA von *AGR2* bzw. *AGR3* ohne Terminations-Codon wurde über eine NheI- und NotI-Schnittstelle in den Vektor kloniert, so dass deren Expression unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gestellt wurde. Die anfänglich im Vektor befindliche Igk-*Leader*-Sequenz wurde so, zwecks Nutzung des nativen ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Signalpeptids für die Sezernierung des Proteins, entfernt. Das jeweilige zum C-Terminus korrespondierende Ende der cDNA (ohne Stopp-Codon) grenzte so direkt an einen für die Proteinaufreinigung zu nutzenden Hexa-Histidin-*Tag*. Die Klonierung ist im Abschnitt 2.15.9 beschrieben. Die Selektion prokaryotischer bzw. eukaryotischer Zellen wird durch ein Ampicillin- bzw. Zeocin-Resistenz-Gen im Vektor gewährleistet.

2.13.2 shRNA-Plasmide

Für funktionelle *Knockdown*-Studien des Gens *AGR3* wurden kommerziell erhältliche shRNA (*short hairpin* RNA)-Plasmide der Firma Qiagen (Hilden) genutzt (Katalognummer: KH10832N). Parentaler Vektor ist der pGeneClip™ Neomycin-Vektor der Firma Promega (Mannheim). Die inserierte shRNA-Sequenz befindet sich unter Kontrolle eines U1-Promotors. Die Selektion prokaryotischer bzw. eukaryotischer Zellen wird durch ein Ampicillin- bzw. Neomycin-Resistenz-Gen gewährleistet (Abbildung 2-3). Die genutzten shRNA-Sequenzen sind in Tabelle 2-18 aufgeführt.

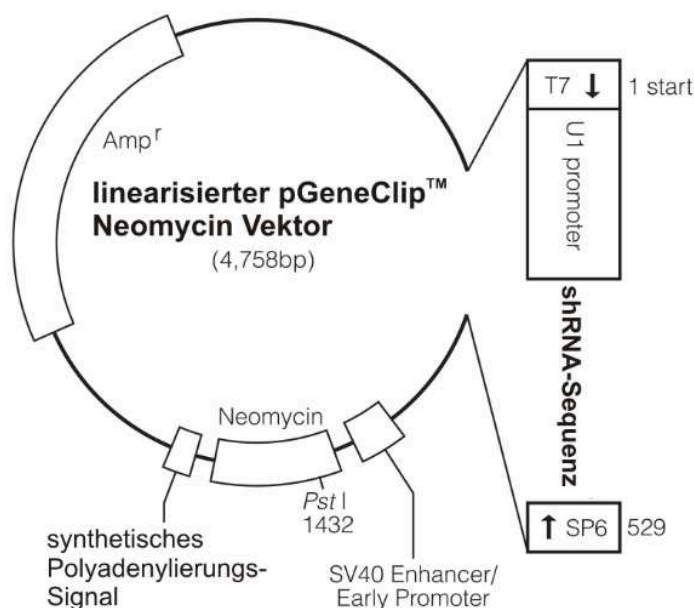


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des pGeneClip™ Neomycin-Vektors. Die jeweilige shRNA-Sequenz für den RNA-Interferenz-vermittelten *Knockdown* befindet sich unter Kontrolle des U1-Promotors (verändert nach *Instruction Manual GeneClip™ U1 Hairpin Cloning Systems*, Promega).

Tabelle 2-18: shRNA-Sequenzen

Name	Sequenz (5'→3')
shRNA-Plasmid <i>AGR3</i> Nr.1	TCATGTTTGTAGACCCTTCTT
shRNA-Plasmid Negativkontrolle	GGAATCTCATTCGATGCATAC

2.14 siRNA

Für transiente funktionelle *Knockdown*-Experimente wurden kommerziell erhältliche si (*small interfering*) RNAs der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Die Sequenzen genutzter siRNAs gegen mRNA der Gene *CELSRI* und *CTHRC1* sind in Tabelle 2-19 aufgeführt.

Tabelle 2-19: Sequenzen verwendeter *CELSRI*- und *CTHRC1*-siRNA

Name	Sequenz (5'→3')	Katalognummer
<i>CELSRI</i> _1	TGGCGTTTCCTAAGTACGAAA	S100104055
<i>CELSRI</i> _3	CGGGATCCTGGATGTGATCAA	S100104069
<i>CTHRC1</i> _4	CCAGGTCGGGATGGATTCAAA	S100356594
<i>CTHRC1</i> _5	ATGCGTTCAAATAGTGCTCTA	S104295074

2.15 Molekulargenetische Methoden

2.15.1 Isolation genomischer DNA aus humanem kryokonserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Die Isolierung genomischer DNA aus humanem Frischgewebe sowie humanen Mammakarzinom-Zelllinien erfolgte mithilfe des *QIAamp DNA Mini Kit* der Firma Qiagen (Hilden) gemäß Herstellerangaben.

Für die Lyse von Mamma-Tumorgewebe wurden 10 Schnitte (10 µm) angefertigt, diese in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und anschließend mit 25 µl Proteinase K sowie 180 µl ATL-Puffer versetzt, um diese ü.N. bei 56 °C und 800 rpm auf einem Thermomixer zu inkubieren. Zur Komplettierung der Lyse sowie zwecks Entfernung von kopräzipitierter RNA wurden 20 U RNase A in 180 µl AL-Puffer dem Ansatz hinzugefügt. Dem 2-minütigen RNase-Verdau bei Raumtemperatur folgte ein Inkubationsschritt bei 70 °C für 10 Minuten zwecks Inhibierung der RNase-Aktivität. Nach Zugabe von 200 µl 100 % EtOH zur Präzipitation der DNA wurde der Ansatz auf eine QIAmp-Säule geladen und diese bei 6000 g zentrifugiert. Die an die Säulen-Matrix gebundene DNA wurde mit 500 µl AW1-Puffer und nachfolgend mit 500 µl AW2-Puffer gewaschen und schließlich mit 50 µl auf 70 °C erhitzten TRIS-Puffer eluiert. Für die Extraktion genomischer DNA aus humanen Zelllinien wurden

5×10^6 Zellen trypsinisiert, diese pelletiert und in 200 μ l PBS resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 20 μ l einer Proteinase K-Lösung (20 μ g/ml) in 200 μ l AL-Puffer und anschließender Inkubation bei 56 °C für 10 Minuten. Kopräzipitierte RNA wurde durch einen 5-minütigen RNase A-Verdau (20 U) bei RT degradiert. Die anschließende DNA-Isolation erfolgte unter identischen Bedingungen wie oben für das humane Frischgewebe beschrieben.

2.15.2 Gesamt-RNA-Isolation aus humanem kryokonserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Die Isolation von Gesamt-RNA aus humanem kryokonserviertem Frischgewebe und Mammakarzinom-Zelllinien wurde mithilfe von TRIzol[®]-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 10 Schnitte (20 μ m) Frischgewebe sowie 2×10^6 Zellen mit jeweils 1 ml TRIzol[®]-Reagenz versetzt und nach kurzem Vortexen für 5 Minuten bei RT lysiert. Anschließend wurden dem Ansatz 200 μ l Chloroform zugefügt, dieser mehrmals invertiert und erneut für 3 Minuten bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation (alle Zentrifugationsschritte bei 4 °C und 8000 g) für 15 Minuten erfolgte im Anschluss die Trennung der roten, organischen Phase von der klaren, wässrigen Phase. Die die RNA enthaltende obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und diese durch Zugabe von 500 μ l Isopropanol (Inkubation 10 Minuten bei RT) und einen anschließenden Zentrifugationsschritt sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml 75 % EtOH und anschließendem Abdampfen des Pellets erfolgte schließlich die Resuspension, je nach RNA-Menge, in 22-30 μ l DEPC-H₂O. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

2.15.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure-Lösungen

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen wurde mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop[®] ND100 (Thermo Scientific, Waltham, MA) unter Verwendung von 2 μ l der zu vermessenden Lösung durchgeführt. Die photometrische Konzentrationsbestimmung basiert dabei auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz und nutzt die spezifische maximale Extinktion von Nukleinsäuren bei $\lambda = 260$ nm. Der zuverlässige Messbereich für dsDNA- bzw. RNA-Lösungen liegt zwischen 2-3700 ng/ μ l bzw. 2-3000 ng/ μ l. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäure-Lösung (vor allem Kontamination durch Proteine) wird durch zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum

aromatischer Aminosäurereste, ermittelt. Für eine reine DNA-Lösung ergibt sich ein Quotient $\frac{OD_{260nm}}{OD_{280nm}}$ von $\geq 1,8$, hingegen ein Wert von $\geq 2,0$ für eine reine RNA-Lösung.

2.15.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die enzymatische Synthese von Einzelstrang-cDNA wurde mittels des *Reverse Transcription System* (Promega, Mannheim) den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Für die Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA in ein Gesamtvolumen von 8,9 µl RNase-freies H₂O aufgenommen und der Ansatz zwecks Denaturierung von Sekundärstrukturen der RNA für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden 11,1 µl eines alle Komponenten für die Synthese enthaltenden *Mastermix* (Tabelle 2-20) zum Ansatz pipettiert und dieser für 10 Minuten bei RT gelagert, gefolgt von einem 15-minütigen Inkubationsschritt bei 42 °C, innerhalb dessen die cDNA-Synthese vermittelt durch das Enzym AMV-Reverse-Transkriptase erfolgte. Schließlich wurde das Enzym durch 5-minütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA (Endkonzentration: 10 ng/µl) erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 2-20: Zusammensetzung *Mastermix* cDNA-Synthese für 1×Ansatz

Komponente <i>Mastermix</i> (1×)	Volumen [µl]
MgCl ₂ [25 mM]	4
Reverse Transkriptase Puffer [10×]	2
dNTP-Mix [je 1 mM]	2
RNase-Inhibitor [40 U/µl]	0,5
AMV-Reverse-Transkriptase [25 U/µl]	0,6
Oligo-dT-Nukleotide [0,5 µg/µl]	1
Hexamer-Oligonukleotide [0,5 µg/µl]	1

2.15.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR), entwickelt durch Kary Mullis, ist eine Methode, welche die Amplifikation beliebig gewählter Nukleinsäure-Sequenzen ermöglicht [240]. Die Technik basiert auf Nutzung einer hitzestabilen DNA-Polymerase (hier *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus*), welche die Synthese eines neuen DNA-Einzelstrangs anhand einer bereits bestehenden, Sequenz-komplementären DNA-Matrize katalysiert. Voraussetzung für die Aktivität des Enzyms ist die Präsenz eines Abschnitts doppelsträngiger DNA. Das Enzym katalysiert die Ausbildung einer Phosphorsäureester-Bindung aus der freien Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom der Desoxyribose am Ende des doppelsträngigen DNA-Bereichs mit der α-Phosphat-Gruppe am 5' C-Atom eines

neuen Nukleotids unter Abspaltung von Pyrophosphat. Durch Zugabe eines „Vorwärts“- und eines „Rückwärts“-Oligonukleotids (*Primers*), die komplementär zu zwei spezifischen Sequenzabschnitten einer DNA-Probe sind und den zu amplifizierenden Bereich flankieren, wird diese Voraussetzung geschaffen. Die weiteren Komponenten eines typischen PCR-Ansatzes sind in Tabelle 2-21 aufgeführt.

Tabelle 2-21: Ansatz für Standard-PCR

Komponente	Volumen [μ l]
Puffer [5 $\times$]	5
MgCl ₂ [25 mM]	1,5
dNTP-Mix [jeweils 10 mM]	0,5
<i>Primer</i> For + Rev [jeweils 10 μ M]	1
<i>Taq</i> -Polymerase [5 U/ μ l]	1
DNA- <i>Template</i> [1-10 ng/ μ l]	1
ad 25 μ l ddH ₂ O	14

Der PCR-Reaktionsverlauf besteht typischerweise aus 30 bis 40 Zyklen eines Temperaturprofils, welches sich hauptsächlich aus folgenden 3 Schritten zusammensetzt: einem Denaturierungsschritt bei 95 °C (Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge), dem *Primer-Annealing* (Hybridisierung der *Primer* an die einzelsträngige DNA, bei meist 50-60 °C) und der Elongation bei 72 °C (Katalyse der Synthese des zum Matrizen-Strang komplementären Nukleotid-Polymers mittels *Taq*-Polymerase). Ein typisches Temperaturprofil ist in Tabelle 2-22 zusammengefasst.

Tabelle 2-22: Temperaturprofil einer Standard-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	95	5 Min	1 $\times$
Denaturierung	95	30 Sek	
<i>Primer</i> -Hybridisierung	50-60	30 Sek	30-40 $\times$
Elongation	72	45 Sek ^a	
Finale Elongation	72	5 Min	1 $\times$

a: abhängig von der Länge des Amplifikats (1min/1000 bp); bp: Basen-Paare

Die Amplifikation der DNA folgt hypothetisch einem exponentiellen Verlauf (2^n), welcher jedoch aufgrund häufig vorhandener inhibitorisch wirkender Kontaminationen im Probenmaterial praktisch meist nicht erreicht wird. Dazu zählt beispielsweise ein Überschuss an Salzen, Rückstände von ionischen Detergenzien [241], Alkoholen und Phenolen [242] durch

die Probenaufbereitung sowie biologische Kontaminationen wie Kollagene [243], Hämoglobin [244] und Immunglobulin G [245].

2.15.6 Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Agarose-Gelelektrophorese

Das Prinzip zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einer Agarose-Gelmatrix entsprechend ihrem Molekulargewicht basiert auf der differentiellen Laufgeschwindigkeit der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem elektrischen Feld durch das als Molekularsieb fungierende Gel in Richtung Anode. Die Laufgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist dabei invers proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Je nach zu separierenden Molekülgrößen wurde Agarose in einer Konzentration zwischen 1-2% in 1×TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid versetzt (0,5 µg/ml). Nach Aushärten des Gels wurde dieses in eine Elektrophorese-Kammer eingebracht, welche mit Ethidiumbromid-haltigem (0,5 µg/ml) 1×TBE-Laufpuffer befüllt wurde. Größen-Standard sowie Probenvolumina zwischen 12-16 µl (versetzt mit 5×Ladepuffer) wurden anschließend auf das Gel geladen und die Elektrophorese bei einer Feldstärke von 5 V/cm durchgeführt. Die Visualisierung der separierten DNA-Fragmente im Gel erfolgte durch Anregung des in die kleine Furche der DNA-Doppelhelix interkalierenden Ethidiumbromids in einem UV-Transilluminator. Emittiertes Fluoreszenzlicht im sichtbaren Bereich wurde schließlich mithilfe einer hochauflösenden CCD-Kamera digitalisiert.

2.15.7 Semiquantitative *Real-Time*-PCR (RT-PCR)

Die bereits 1992 beschriebene Methode [246] wird auch heute noch in modifizierter Form sowohl in der klinischen Routine als auch der Forschung angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit diente die Methode der Quantifizierung von Genexpressionsunterschieden in Gewebeproben und Zelllinien. Die hier genutzte Technik basiert auf Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I, welcher in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert. Im Gegensatz zum kaum fluoreszierenden frei in Lösung vorliegenden Farbstoff-Molekül, weist der gebildete DNA-Farbstoff-Komplex ein Absorptionsmaximum für blaues Licht ($\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$) auf und emittiert grünes Fluoreszenzlicht ($\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$). Die Messung der Zunahme der Fluoreszenz nach jedem Amplifikationszyklus erlaubt somit eine Visualisierung der Vervielfältigung des dsDNA-Produkts in Echtzeit (*Real-Time*) und damit auch einen Rückschluss auf die Ausgangsmenge eines spezifischen Genproduktes (cDNA) in einer Probe.

Für die RT-PCR wurde der *Light Cycler iQ5* (Bio-Rad) sowie der *iQ SYBR Green Supermix* (Bio-Rad) den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Die Zusammensetzung eines RT-PCR-Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2-23 und das Temperaturprofil eines typischen Ansatzes in Tabelle 2-24 dargestellt.

Tabelle 2-23: Zusammensetzung eines RT-PCR-Reaktionsansatzes

Komponente	Volumen [µl]
iQ SYBR Green Supermix [2×]	10
Primer <i>Forward</i> + <i>Reverse</i> [10 µM]	jeweils 0,5
cDNA- <i>Template</i> [1 ng/µl]	1
ad 20 µl Nuklease-freies ddH ₂ O	8

Tabelle 2-24: Temperaturprofil eines typischen RT-PCR-Ansatzes

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung und Aktivierung <i>Taq</i> -Polymerase	95	5 Min	1×
Denaturierung	95	15 Sek	
Primer-Hybridisierung	60	15 Sek	40×
Elongation	72	20 Sek	
Finale Elongation	72	1 Min	1×
Schmelzkurvenanalyse	40-99	10-20 Min	1×

Zur Messung der Expression eines Zielgens in klinischem Material und Zelllinien wurde zunächst Gesamt-RNA isoliert und die darin befindliche mRNA in cDNA umgeschrieben. Für jede Probe wurde die Messung der Genexpression eines Zielgens im Dreifachansatz durchgeführt. Zwecks Normierung der Zielgen-Expression wurde die Expression des ubiquitär exprimierten Haushalts-Gens *Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) zusätzlich für jede Probe bestimmt und als Referenz für die eingesetzte cDNA-Menge herangezogen. Für jeden RT-PCR-Lauf wurde eine Negativkontrolle mit ddH₂O anstelle von cDNA mitgeführt, um mögliche Kontaminationen auszuschließen.

Quantifizierung der Gen-Expression

Grundlage für die Quantifizierung der Gen-Expression ist die Definition des *Cycle-Threshold* (CT)-Wertes [247]. Dieser Wert gibt die PCR-Zykluszahl an, bei der das gemessene Fluoreszenzsignal die Hintergrund-Fluoreszenz signifikant überschreitet. Dieser Zeitpunkt markiert den Übergang einer linearen in die exponentielle Amplifikationsphase. Der CT-Wert

ist umso kleiner, je höher die Ausgangs-Anzahl der zu amplifizierenden *Template*-cDNA ist bzw. je stärker folglich das analysierte Gen in der untersuchten Probe exprimiert wird. Ermittelt wird nicht die absolute Fluoreszenz, sondern die Differenz der Fluoreszenzsignale zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Der gemessene CT-Wert für ein Zielgen in einer Probe wurde schließlich auf die Expression des Referenzgens *GAPDH* normiert:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{GAPDH}} .$$

Um die normierte Zielgen-Expression einer Probe 1 zur Zielgen-Expression einer Probe 2 anzugeben, wurde die Differenz ihrer ΔCT -Werte ermittelt [248]:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Probe1}} - \Delta CT_{\text{Probe2}} .$$

Für den *Fold Change* (FC) der differentiellen Zielgen-Expression der Probe 1 im Vergleich zur Probe 2 ergibt sich:

$$\text{Expressionsstärke} = 2^{-\Delta\Delta CT} .$$

Schmelzkurvenanalyse

Die im Anschluss an die Amplifikation erfolgende Schmelzkurvenanalyse gestattet die Identifizierung aller während der RT-PCR gebildeten doppelsträngigen Amplifikate. Dies ist für die Etablierung eines neuen *Primer*-Paares von entscheidender Bedeutung, um eine Quantifizierung unspezifischer Nebenprodukte sowie häufig auftretender *Primer*-Dimere auszuschließen. Abhängig von der Länge des Produktes und dessen GC-Gehalt ergibt sich für eine dsDNA eine spezifische Temperatur, ab der diese denaturiert wird. Die Ermittlung der Schmelztemperatur wird durch simultane Messung des Fluoreszenzsignals über das interkalierende SYBR Green während der Temperaturerhöhung ermöglicht. Kommt es zum Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge wird ein Abfall der Fluoreszenz detektiert. Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse erfolgte zur Etablierung eines neuen *Primer*-Paares eine gelelektrophoretische Auftrennung mit anschließender Begutachtung der Produktgröße.

2.15.8 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Kommerziell erworbene sowie selbstständig klonierte Vektoren wurden vor ihrer Verwendung zwecks Überprüfung ihrer Sequenzabfolge auf Mutationen mithilfe des *Sequencer ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer 2001* unter Verwendung des *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Kit*

(Applied Biosystems, CA, USA) gemäß Herstellerangaben sequenziert. Der angewandten Sequenzier-Technik liegt das Prinzip der Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode nach Sanger zu Grunde [249]. Neben allen 4 dNTPs befinden sich im Ansatz der Sequenzierungs-PCR im Vergleich zu einem Standard-PCR-Ansatz zusätzlich Fluoreszenzfarbstoff-markierte 2'-3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs), welche nach Einbau in den neusynthetisierten DNA-Strang zum Abbruch der PCR führen. Weiterhin befindet sich je Sequenzierungs-PCR nur ein Primer im Ansatz, der die Sequenzierungs-Richtung vorgibt. Es entstehen so Amplifikate unterschiedlicher Länge, die an unterschiedlichen Positionen ein terminierendes ddNTP aufweisen. Da für jede der 4 Basen eine unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoff-Markierung gewählt wurde, können über die im Sequenzierer ablaufende Kapillar-Elektrophorese und Fluoreszenzanregung Position und Base bestimmt werden. Die Komponenten einer Standard-Sequenzierungs-PCR sowie das zugehörige Temperaturprofil sind in Tabelle 2-25 und Tabelle 2-26 zusammengefasst.

Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR wurde das Produkt jedes Ansatzes (separat) gefällt, indem das Gesamtvolumen mit 80 µl HPLC-H₂O, 10 µl einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,6) sowie 250 µl 100% EtOH vereint wurde. Die Fällung erfolgte durch einen 20-minütigen Zentrifugationsschritt bei 8000 × g. Das Präzipitat wurde anschließend in 75% EtOH gewaschen, getrocknet und für die Sequenzierung in 25 µl Formamid aufgenommen.

Tabelle 2-25: Zusammensetzung einer Standard-Sequenzierungs-PCR

Komponente	Volumen [µl]
Terminator Ready Reaction Mix [5×]	2
Puffer	2
Primer [10 pmol/µl]	1
Plasmid-DNA [1-10 ng/µl]	1
ad 20 µl ddH ₂ O	14

Tabelle 2-26: Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	96	5 Min	1×
Denaturierung	96	15 Sek	
Primer-Hybridisierung	55	15 Sek	38×
Elongation	60	4 Min	
Finale Elongation	60	1 Min	1×

2.15.9 Klonierung von Überexpressions-Vektoren zur Herstellung rekombinanter Proteine

Ziel war die Klonierung eines Vektors, der die Produktion sezernierten, rekombinanten AGR2- bzw. AGR3-Proteins ermöglicht. Dieses Protein sollte von Kooperationspartnern im MicroBioMed-Projekt (Fraunhofer-IME, Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen) in HEK 293T-Zellen erzeugt und zur Generierung monoklonaler Antikörper gegen diese Proteine genutzt werden. Dazu wurde die jeweilige Vollängen-cDNA (ohne Terminations-Codon) so in den Vektor pMS-L-SNAP-mut 2715 IV kloniert (siehe Abschnitt 2.13.1.2), dass sich diese in einem gemeinsamen offenen Leserahmen mit einem C-terminalen 6-fachen Histidin-*Tag* sowie unter Kontrolle eines CMV-Promotors befand.

2.15.9.1 PCR mit Linker-Primern

Um eine Ligation der AGR2- und AGR3-cDNA in den Zielvektor pMS-L-SNAP mut 2715 IV zu ermöglichen wurden für deren Amplifikation *Primer* mit *NheI*-bzw. *NotI*-Restriktionsschnittstelle im 5'-Überhang verwendet (siehe Tabelle 2-15). Die Amplifikation erfolgte zwecks Reduzierung möglicher Synthesefehler anstelle der herkömmlichen *Taq*- mit der genaueren *Phusion*-DNA-Polymerase (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), wobei der pT-REx-DEST30-Vektor mit AGR2-bzw. AGR3-Vollängen-cDNA (beide Source BioScience LifeSciences, Nottingham, England) als *Template* verwendet wurde. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 2-27 aufgeführt.

Tabelle 2-27: Zusammensetzung der PCR mit Linker-Primern

Komponente	Volumen [µl]
HF-Puffer [5x]	5
dNTP-Mix [je 10 mM]	0,5
Primer <i>Forward/Reverse</i> [10 µM]	1,25
<i>Phusion</i> -DNA-Polymerase [2 U/µl]	0,25
Plasmid-DNA [10 ng/µl]	1
ad 25 µl H ₂ O	15,75

2.15.9.2 Reinigung von DNA-Amplifikaten und –Fragmenten nach Restriktionsverdau

Zur Isolation von PCR-Produkten aus Agarosegelen und zur Entfernung von Enzymen oder Puffer-Rückständen vorausgegangener Reaktionen (wie Restriktionsverdau), wurde das *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

2.15.9.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung linearer Vektor-DNA

Die generierten AGR2- und AGR3-Amplifikate mit Restriktionsschnittstellen für NheI und NotI (siehe Abschnitt 2.15.9.1) sowie der Vektor pMS-L-SNAP-mut 2715 IV (Abschnitt 2.13.1.2) wurden in einem Doppelverdau-Ansatz mit den Restriktionsendonukleasen NheI und NotI nach Herstellerangaben (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) für 2 Stunden bei 37°C verdaut. Zusätzlich wurde das Enzym alkalische Phosphatase (New England Biolabs Inc., Ipswich, USA) zum Ansatz für den Vektor-Verdau gegeben (Tabelle 2-28 und Tabelle 2-29). Die Dephosphorylierung der linearisierten Vektor-DNA sollte eine Religation dieser verhindern, um so die Ligations-Effizienz mit der AGR2- bzw. AGR3-cDNA zu erhöhen. Abschließend wurde zur Inaktivierung der Enzyme eine Hitzebehandlung der Ansätze für 20 Minuten bei 80 °C durchgeführt.

Tabelle 2-28: Restriktionsverdau der AGR2- und AGR3-Amplifikate

Komponente	Volumen [µl]
Amplifikat	19
Puffer [10×]	2
NheI [10 U/µl]	1
NotI [10 U/µl]	1
ad 30 µl Nuklease-freies H ₂ O	7

Tabelle 2-29: Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektors pMS-L-SNAP-mut 2715 IV

Komponente	Volumen [µl]
1 µg Vektor	1,3
Puffer [10×]	2
NheI [10 U/µl]	1
NotI [10 U/µl]	1
Alkalische Phosphatase [10 U/µl]	1
ad 30 µl Nuklease-freies H ₂ O	13,7

2.15.9.4 Ligation

Nach erfolgter Reinigung (siehe Abschnitt 2.15.9.2) der verdauten Amplifikate sowie des linearisierten, dephosphorylierten Vektors, erfolgte deren Ligation. Der Ligationsansatz ist in Tabelle 2-30 aufgeführt. Der Berechnung der Menge an *Insert* bei Verwendung von 100 ng linearisierter Vektor-DNA lag folgende Formel zugrunde: $\frac{3 \times 100 \text{ ng} \times \text{Insert (bp)}}{\text{Vektor (bp)}}$. Die Ligation erfolgte bei 16 °C ü.N.

Tabelle 2-30: Ligationsansatz

Komponente	Volumen
Puffer [10×]	1
linearisierte Vektor-DNA (100 ng)	2,81
Insert-DNA (23,6 ng)	0,51
T4 DNA-Ligase [5 U/μl]	0,2
ad 10 μl ddH ₂ O	5,48

2.15.10 Transformation von *E.coli*

Der gesamte Ligationsansatz wurde anschließend mit 50 μl des chemisch-kompetenten DM5α *E.coli*-Stammes mittels Pipette vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der Vektor-DNA erfolgte durch einen Hitze-Schock von 1 Minute bei 42 °C.

Zur Vermehrung kommerziell erworbener Plasmide wurde der *E.coli*-Stamm JM83 für eine Transformation via Elektroporation genutzt. Dazu wurden 10 ng Vektor-DNA mit 40 μl kompetenter Zellen in einer Elektroporationsküvette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Das Anlegen eines Spannungsimpulses im Elektroporator von max. 2,5 kV für wenige Millisekunden sollte zur Aufnahme der Plasmide in die kompetenten Bakterien führen.

Zur Regenerierung der chemisch- sowie elektrisch-kompetenten Zellen wurden nach Transformation 400 μl vorgewärmtes SOC-Medium in den Ansatz pipettiert und dieser für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden 50-100 μl des Transformations-Ansatzes unter sterilen Bedingungen auf eine LB-Ampicillin-Platte (100 μg/ml Ampicillin) ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Zur Kontrolle der verwendeten Zellen wurden zusätzlich 50 μl transformierter Zellen auf LB-Platten ohne Ampicillin sowie zur Kontrolle der Ampicillin-Platten das gleiche Volumen nicht-transformierter Bakterien auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert und diese unter gleichen Bedingungen inkubiert.

2.15.11 Inokulation von Flüssigkulturen transformierter *E.coli*

Für eine Plasmid-Mini-Präparation (Abschnitt 2.15.12) wurden 2 ml LB-Ampicillin-Medium (100 μg/ml Ampicillin) mit Zell-Material einer herangewachsenen *E.coli*-Einzelkolonie mittels steriler Pipettenspitze inokuliert und das Gefäß für 16 Stunden bei 37 °C und 150 U/min inkubiert. Für eine Plasmid-Maxi-Präparation (Abschnitt 2.15.13) wurde zunächst eine Vorkultur (5 ml LB-Ampicillin-Medium in sterilem 50 ml-Erlenmeyer-Kolben) angeimpft und diese für 8 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (150 U/min) inkubiert. Anschließend wurden 500 μl der Vorkultur in einen 500 ml-Erlenmeyer-Kolben mit 150 ml vorgelegtem LB-Ampicillin-

Medium überführt und diese Hauptkultur unter den obigen Bedingungen über Nacht angereichert.

2.15.12 Plasmid-Mini-Präparation

Die Plasmid-Mini-Präparation wurde einer Plasmid-Klonierung angeschlossen, um so möglichst effizient eine größere Anzahl an Einzelklonen auf die Präsenz des gewünschten Plasmids via Sequenzierung prüfen zu können. Die Plasmid-Isolation erfolgte mithilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben.

2.15.13 Plasmid-Maxi-Präparation

Die Plasmid-Maxi-Präparation diente zur Gewinnung von Plasmid-DNA in großen Mengen und wurde mittels des *NucleoBond® Xtra Maxi Kit* des Herstellers Machery-Nagel (Düren) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.16 Proteinchemische und immunologische Methoden

2.16.1 Herstellung von Schnitten aus humanem Gewebematerial

Die Erzeugung von Gewebeschnitten aus humanem Formalin-fixiertem, Paraffin-eingebettetem Material für immunhistochemische Färbungen erfolgte mithilfe eines Mikrotoms. Dazu wurden die Paraffinblöcke in das Gerät eingespannt und Schnitte einer Dicke von 2 µm angefertigt. Diese wurden abschließend auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger gezogen und ü.N. bei 37°C getrocknet. Zur histologischen Begutachtung humaner Frischgewebe wurden hingegen 10 µm-Schnitte erzeugt.

2.16.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung humaner Frischgewebe

Die HE-Färbung humaner kryokonservierter Frischgewebe diente der sicheren mikroskopischen Diskriminierung gesunder von pathologisch-veränderten Gewebestrukturen. Gewebeschnitte wurden dazu zunächst für 2 Minuten in einer Küvette mit Hämalun-Lösung (nach Meyer) inkubiert. Der basische Farbstoff führt zur Blaufärbung anionischer Gewebestrukturen und damit auch der Nukleinsäure-haltigen Zellkerne. Nach einem Waschschrift mit VE-Wasser erfolgte die Anfärbung eosinophiler (kationischer) Strukturen wie

diversen zytoplasmatischen Proteinen, Hämoglobin und Kollagenfasern mittels Eosin-Lösung für eine Minute. Zur Entwässerung der gefärbten Schnitte wurden diese in einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe Tabelle 2-34) inkubiert und mit Vitro-Clud ® (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckelt.

2.16.3 Methylenblau-Färbung humaner Frischgewebe

Zur raschen Abschätzung des Epithelanteils humaner Frischgewebe-Schnitte der Mamma wurden Methylenblau-Präparate angefertigt. Methylenblau ist (wie Hämatoxylin) ein basischer Farbstoff und führt unter anderem zur Blaufärbung von Zellkernen. Dazu wurden Frischgewebe-Schnitte mit einigen Tropfen einer 0,1% Methylenblau-Lösung benetzt und für 30 Sekunden gefärbt. Anschließend wurde der überschüssige Farbstoff vorsichtig mit VE-Wasser entfernt.

2.16.4 Immunhistochemie (IHC) an humanem Paraffinmaterial

Die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten diente der histologischen Lokalisation (zelluläre/subzelluläre bzw. extrazelluläre Expression; exprimierender Zelltyp) von Zielproteinen. In der vorliegenden Arbeit sollten hauptsächlich Expressionsunterschiede dieser Zielproteine in Brusttumor- und korrespondierenden neoplastisch-unveränderten Mamma-Geweben analysiert werden. Der Detektion des Zielproteins lag eine Polymer-basierte (Biotin/Avidin-unabhängige) Technik zugrunde: der gegen das Zielprotein gerichtete Primärantikörper wird von einem Sekundärantikörper gebunden, welcher wiederum über eine Polymerstruktur an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP) gekoppelt ist. Durch Zugabe des HRP-Substrats 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) entsteht durch Oxidation ein braunes, in Alkohol unlösliches Endprodukt.

2.16.4.1 Vorbehandlung von Paraffin-Gewebeschnitten für die IHC

Die auf Objektträgern befindlichen paraffinierten humanen Gewebeschnitte wurden ü.N. bei 37°C getrocknet. Zwecks Entparaffinierung wurden die Schnitte mit Xylol behandelt und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (Tabelle 2-31).

Tabelle 2-31: Absteigende Alkoholreihe für die IHC

Lösung	Zeit
Xylol 100%	3 × 10 Min
Ethanol 100%	1 × 5 Min
Ethanol 100%	1 × 5 Min
Ethanol 96%	1 × 2 Min
Ethanol 96%	1 × 2 Min
Ethanol 70%	1 × 1 Min
VE-Wasser	1 × 1 Min

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebe wurden diese zwecks Antigen-Demaskierung einer Hitzevorbehandlung unterzogen. Diese Prozedur führt zur erhöhten Reaktivität der spezifischen Gewebean Antigene mit dem jeweiligen Primärantikörper [250]. Neben der Methode zur Hitze-Vorbehandlung ist die Wahl eines geeigneten Puffers entscheidend für eine effiziente Antigen-Demaskierung. In Tabelle 2-32 sind Vorbehandlungsmethode und verwendeter Puffer für die in dieser Arbeit mittels Immunhistochemie analysierten Antigene zusammengefasst.

Tabelle 2-32: Hitze-Vorbehandlung zur Antigen-Demaskierung

Antigen	Puffer	Methode
AGR3	Citrat-Puffer (pH 6,0)	Dampfdrucktopf (20 Min)
ASPN	Tris-Puffer (pH 9,0)	Wasserbad (98 °C; 30 Min)
CTHRC1	Citrat-Puffer (pH 6,0)	Wasserbad (98 °C; 30 Min)
NMU	Citrat-Puffer (pH 6,0)	Wasserbad (98 °C, 30 Min)

2.16.4.2 Immunhistochemische Färbung

Nach Abkühlung für 30 Minuten bei RT wurden die Gewebeschnitte in *Chamber-Slides* eingespannt und einmal mit VE-Wasser gewaschen. Die folgende immunhistochemische Färbung wurde mithilfe des Kits *UltraVision Quanto Detection System HRP DAB* des Herstellers Thermo Fisher Scientific (Fremont, CA, USA) den Herstellerangaben folgend durchgeführt. Um endogene Peroxidasen zu hemmen, welche unspezifische Hintergrund-Signale erzeugen, wurden die Schnitte mit 100 µl einer Peroxidase-Blockierungs-Lösung für 10 Minuten inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit Waschpuffer (Dako) wurde der entsprechende Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung auf die Schnitte pipettiert (Tabelle 2-33) und für 45 Minuten bei RT inkubiert.

Tabelle 2-33: Primärantikörper-Verdünnungen für die IHC

Antikörper	Verdünnung
AGR3 (ab82400)	1:1000
ASPN (HPA008435)	1:500
CTHRC1 (ab85739)	1:300
NMU (HPA025926)	1:10

Zur Entfernung unspezifisch gebundenen Primärantikörpers folgten zwei Waschschrte für jeweils 5 Minuten. Anschließend wurden 100 µl der *Primary Antibody Amplifier Quanto*-Lösung für 10 Minuten auf die Schnitte gegeben, bevor diese durch zwei Waschschrte entfernt wurde. Die Zugabe des über ein Polymer HRP-konjugierten Sekundärantikörpers (*HRP Polymer Quanto*) erfolgte für 10 Minuten bei RT. Um unspezifisch gebundenen Sekundärantikörper gründlich zu entfernen, wurden 4 Waschschrte mit Waschpuffer und VE-Wasser durchgeführt. Der visuelle Nachweis vorhandener Antigen-Antikörper-HRP-Komplexe wurde durch Zugabe von 150 µl des Chromogens DAB je Schnitt für eine Inkubationszeit von 5 Minuten realisiert. Abschließend wurden die Schnitte in VE-Wasser gewaschen und eine 5-minütige Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Nach Bläuen der Schnitte in lauwarmem Leitungswasser für 5 Minuten wurden die Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Tabelle 2-34) entwässert und darauf mit Vitro-Clud® (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckelt.

Tabelle 2-34: Aufsteigende Alkoholreihe für die IHC

Lösung	Zeit
VE-Wasser	1 × 1 Min
Ethanol 70%	1 × 1 Min
Ethanol 96%	1 × 1 Min
Ethanol 96%	1 × 1 Min
Ethanol 100%	1 × 1 Min
Ethanol 100%	1 × 1 Min
Xylol 100%	2 × 1 Min

2.16.5 Isolation von Gesamtprotein aus humanem kryokonserviertem Frischgewebe und humanen Mammakarzinom-Zelllinien

Für Proteinexpressions-Analysen humaner kryokonservierter Frischgewebe mittels Western Blot wurden 10 × 20 µm-Schnitte an einem Gefrier-Mikrotom angefertigt und in einem vorgekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereint. Zur Lyse des Gewebes wurden 300 µl eiskalter RIPA-Puffer versetzt mit Protease-Inhibitoren (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche, Mannheim) in das Gefäß pipettiert, dieses kurz gevortext und abschließend das Gewebe

2 × 15 Sekunden sonifiziert (35% Intensität, je 9 Zyklen). Zur Abtrennung der Zelltrümmer vom Proteinlysats wurden die Proben für 25 Minuten bei 16000 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Protein-haltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Zur Herstellung von Gesamtprotein-Lysaten aus Mammakarzinom-Zelllinien, wurden Zellen bis zu einer Anzahl von ca. 2×10⁶ Zellen in einer Petrischale kultiviert, nach Zugabe von 500 µl NuPage Lyse-Probenpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) oder RIPA-Puffer mit einem sterilen Zellschaber von der Oberfläche gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Sonifizierung und Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.16.6 Albumin (HSA)- und IgG-Abreicherung humaner Serumproben

Serum ist der flüssige Anteil des Blutes abzüglich aller Gerinnungsfaktoren (welche noch im Plasma vorhanden sind). Der Proteinanteil humanen Plasmas setzt sich zu 75% aus den abundanten Proteinen Serumalbumin (HSA) und Immunglobulin der Klasse G (IgG) zusammen, wobei ähnliche Werte für humanes Serum gelten [251]. Für den Nachweis weniger abundanter Proteine mittels Western Blot wurde daher zunächst eine Abreicherung von HSA und IgG mithilfe des *Vivapure Anti-HSA/IgG-Kits* (Sartorius, Göttingen) gemäß den Herstellerangaben vorgenommen. Die Säulen-basierte Technik nutzt eine Matrix bestehend aus einem anti-HSA-Antikörper-Fragment, sowie Protein G zur Bindung der IgG-Moleküle. In einer Säule wurden 440 µl Säulen-Matrix und 20 µl humanes Serum vereint und für 15 Minuten bei RT auf einem Schüttler (350 U/min) inkubiert. Der Durchfluss nach Zentrifugation (1 Min, 400 × g) enthielt das HSA/IgG-abgereicherte Serum. Zur Erhöhung der Proteinausbeute wurde die Zentrifugation dreimal mit jeweils 200 µl Bindungs-Puffer wiederholt, so dass sich ein Gesamtvolumen von ca. 1 ml abgereicherte Probe pro 20 µl eingesetztes Serum-Volumen ergab. Zwecks Konzentrierung und Umpufferung wurde die abgereicherte Probe zweimal zusammen mit 4 ml sterilem 1×PBS bei 2500 × g in einer Molekulargewichtsfiltersäule (*Vivaspin 6, 10 kDa MWCO*; Sartorius, Göttingen) zentrifugiert, bis ein finales Volumen von 200 µl erreicht war. Zum Laden der Probe auf ein Proteingel wurde diese 1:2 mit 2×NuPage Lyse-Probenpuffer (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt.

2.16.7 Proteinnachweis in konditioniertem Medium humaner Mammakarzinom-Zelllinien

Im Zuge des MicroBioMed-Projektes sollten Protein-Biomarker identifiziert werden, die im Mammakarzinom gegenüber korrespondierenden, nicht neoplastisch-veränderten Kontrollgeweben stärker exprimiert werden und so den Krebszustand anzeigen können. Der Nachweis der Brustkrebserkrankung sollte über humanes Blutserum erfolgen, so dass potentiell sezernierte und Membran-ständige Protein-Kandidaten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf eine Auffindbarkeit im Blutkreislauf ausgewählt wurden. Für Kandidaten (hier CELSR1), welche weder in der Literatur noch in Datenbanken als sezerniert (lösliche Proteine) bzw. für die bisher kein Ektodomänen-*Shedding* (Transmembranproteine) beschrieben wurde, sollte zunächst deren Auffindbarkeit im Zellkulturüberstand humaner Mammakarzinom-Zelllinien (konditioniertes Medium) überprüft werden. Dazu wurde eine Zelllinie ausgewählt, welche eine deutliche Protein-Expression des zu analysierenden Kandidaten im Gesamtprotein-Lysat aufwies. Diese wurde in einer 175T-Zellkulturflasche (Corning, Tewksbury MA, USA) so ausgesät, dass nach 24-stündiger Inkubation in 30 ml Medium ohne fetales Kälberserum (FKS) eine Konfluenz von ca. 80% erreicht war. Zur Detektion der Kandidatenproteine im konditionierten Medium war es notwendig die Zellen in Medium ohne FKS zu kultivieren, welches einen hohen Proteingehalt aufweist und damit die Detektion gering konzentrierter Proteine erschwert. Das konditionierte Medium (30 ml) wurde im Folgenden über eine Molekulargewichtsfiltersäule (*Vivaspin 20, 30 kDa MWCO*; Sartorius, Göttingen) in 1xPBS umgepuffert und konzentriert (Endvolumen 200 µl). Für eine Western Blot-Analyse wurden 15 µg Protein in *NuPage*-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt und auf ein Proteingel geladen. Da auch nicht-sezernierte/*gesheddete* Proteine durch Nekrose oder Apoptose in den Zellüberstand gelangen, wurde das Gesamtprotein-Lysat der kultivierten Zellen als Kontrolle herangezogen: ergab sich im Western Blot für das konditionierte Medium im Vergleich zum Gesamtprotein-Lysat ein deutlich vergrößerter Ratio aus Zielprotein- zu β -Aktin-Signal, so wurde das Protein als sezerniert/*gesheddete* angesehen.

2.16.8 Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen mittels Bicinchoninsäure

Die Konzentrationsbestimmung von Protein-Lösungen erfolgte mithilfe des *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) gemäß Herstellerangaben. Das Prinzip des 1985 von Smith et al. [252] entwickelten Verfahrens ist die Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen durch Peptide einer Länge von mindestens 3 Aminosäuren. Cu^{+} -Ionen bilden Chelat-Komplexe mit Peptidbindungen, welche eine Blaufärbung verursachen. Diese ist proportional zur Menge

vorhandener Peptide bzw. Proteine. Jedes gebildete Cu^+ -Ion chelatisiert in der Folge zwei Bicinchoninsäure (BCA)-Moleküle, was in einer um den Faktor 100 sensitiveren Violett-Färbung mündet, die ein Absorptionsmaximum von 562 nm aufweist und in einem Photometer vermessen werden kann. Die exakte Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung erfolgte unter Verwendung einer Standardreihe bekannter Proteinkonzentrationen mit bovinem Serumalbumin (BSA).

2.16.9 Nachweis der aktiven Form kleiner G-Proteine mittels *Pulldown-Assay*

Kleine (monomere) G-Proteine der Ras-Superfamilie beeinflussen zahlreiche zelluläre Funktionen wie Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose und Aktin-Zytoskelett-Organisation. In ihrem inaktiven Zustand liegen sie in einer Guanosindiphosphat (GDP) gebundenen Form vor, können jedoch durch Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) in ihren aktiven Zustand übergehen [253]. Zum Nachweis der aktiven GTP-gebundenen Form von Rac1 wurde ein kommerzielles Kit (*Active Rac1 Detection Kit*) des Herstellers Cell Signaling (Danvers, MA, USA) verwendet. Das Prinzip zur Isolation der aktiven Form von Rac1 beruht auf Verwendung eines spezifischen Bindungspartners, der Rac/Cdc42-Bindungsdomäne der Proteinkinase PAK1 (PAK1-PBD), welche nur die GTP-gebundene Form der beiden G-Proteine bindet. Diese Bindungsdomäne ist zudem mit dem Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert, so dass der Komplex aus Bindungsdomäne und Rac-GTP an einer Glutathion-haltigen Säulenmatrix immobilisiert werden kann. Die Versuche wurden zur Analyse einer differentiellen Aktivierung des kleinen G-Proteins in stabilen *NMU*-Transfektanten und Kontroll-Klonen der Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3 (siehe Abschnitt 3.2.4.11) durchgeführt. Von jedem zu analysierenden Zellklon wurden 2×10^6 Zellen in einer Petrischale ausgesät (10 cm Durchmesser) und über einen Zeitraum von 48 Stunden bis zum Erreichen einer Konfluenz von 80% kultiviert. Nach Waschen der Petrischale in eiskaltem $1 \times \text{PBS}$, wurde 1 ml Lyse/Bindungs/Wasch-Puffer versetzt mit 1 mM Proteinase-Inhibitor PMSF (Roth, Karlsruhe) auf die Zellen pipettiert, diese mithilfe eines sterilen Zellschabers von der Oberfläche abgelöst und die Suspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Lyse für 5 Minuten auf Eis wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation ($16000 \times g$, 4°C , 15 Minuten) abgetrennt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Für eine genaue Vergleichbarkeit der einzelnen Zelllysate wurde deren Proteinkonzentration auf $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt. Nach Äquilibration einer Glutathion-Agarose-haltigen Säule wurden $20 \mu\text{g}$ GST-PAK1-PBD und $550 \mu\text{g}$ Zelllysate in der Säule vereint. Nach kurzem Vortexen der Probe erfolgte die Präzipitation aktiver Rac1-Proteine für 1 Stunde bei 4°C auf einem Schüttler (150 U/min). Nach Zentrifugation der Lösung ($6000 \times g$, 20 Sekunden)

wurde die Säule zur Ablösung unspezifisch gebundener Proteine dreimal mit 400 µl Lyse/Bindungs/Wasch-Puffer gewaschen und schließlich aktives G-Protein durch Zugabe von 50 µl SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT durch Zentrifugation ($6000 \times g$, 2 Minuten) in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Für eine Western Blot-Analyse wurden 25 µl denaturiertes (95 °C, 5 Minuten) Eluat auf ein Gel aufgetragen. Zur Normierung der Western Blot-Signale für Rac1-GTP wurde der Ratio der Signale für Rac1-GTP und der Gesamtmenge zellulären Rac1-Proteins gebildet.

2.16.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli [254] ist eine Methode zur Separierung von Proteinen nach Molekulargewicht. Die Gelmatrix aus Acrylamid und Bisacrylamid lässt sich in ein Sammelgel (3-4%, pH 6,8) sowie ein Trenngel (5-25%, pH 8,8) gliedern. Zur Denaturierung der Proteine werden diese in einem Puffer aufgeköcht, der sowohl das Reagenz Dithiothreitol (DTT) zur Reduktion bestehender Disulfidbrücken als auch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) enthält. SDS lagert sich an die Polypeptidketten an (ca. 1,4 g SDS/1 g Polypeptid) und überdeckt so deren Eigenladung. Daraus ergibt sich für jedes Polypeptid ein gleiches Ladungs-Massenverhältnis, so dass die Auftrennung der Proteine im Gel im elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht (Kettenlänge) erfolgt. Die Funktion des großporigen Sammelgels besteht in der Konzentrierung der Proteine vor deren Übergang in das kleinporige Trenngel, in dem schließlich die Separierung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgt (Siebeffekt). Das im Laufpuffer enthaltene Glycin (Folge-Ion) liegt im leicht sauren Sammelgel als Zwitterion mit neutraler Nettoladung vor und weist somit eine geringe elektrophoretische Mobilität auf, wohingegen die Chlorid-Ionen (Leit-Ionen) im Puffer mit hoher Mobilität in Richtung Anode wandern. In der Ladungsträger-armen Zone zwischen Folge- und Leit-Ionen kommt es zur Konzentrierung („Stapelung“) der negativ geladenen Proteine (*protein stacking*).

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde das *NuPAGE-System* des Herstellers Invitrogen (Karlsruhe) genutzt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden in 1x*NuPage*-Probenpuffer (Invitrogen, Karlsruhe), versetzt mit DTT, für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Je nach Proteinkonzentration wurden Volumina zwischen 15 bis 35 µl der Probe auf ein Proteingel aufgetragen. Es kamen sowohl 5-12% Tris-Glycin-Gradientengele (NuPage, Invitrogen, Karlsruhe) zur Auftrennung von Proteinen im Molekulargewichtsbereich von 15 kDa bis 150 kDa als auch 3-8% Tris-Acetat-Gradientengele (NuPage, Invitrogen, Karlsruhe) zwecks

Separierung großer Proteine (klarer Auftrennungsbereich von 40 kDa bis 500 kDa) zum Einsatz. Für die Gelelektrophorese wurde das *XCell SureLock™ Mini-Cell System* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.16.11 Westernblotting und Immunodetektion

Zum Nachweis bestimmter Proteine in einer Probe werden die zunächst über eine SDS-PAGE nach Molekulargewicht aufgetrennten Polypeptide unter Erhaltung des Separierungs-Musters auf eine Trägermembran transferiert (Western Blot). Ein senkrecht zum Proteingel angelegtes elektrisches Feld führt zur Wanderung der negativ geladenen SDS-Polypeptid-Komplexe aus dem Gel in Richtung Anode, wobei diese über hydrophobe Wechselwirkungen an der auf das Polyacrylamid-Gel aufgelagerten Membran haften bleiben.

Der Western Blot wurde mithilfe eines Tank-Blot-Systems des Herstellers Biorad (München) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach 5-minütiger Aktivierung der Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran in Methanol wurden Proteingel und Luftblasen-frei aufgelagerte Membran (Biorad, München) beidseitig von jeweils einem äußeren Kunststoffschwamm (Biorad, München) und einem innen liegenden saugfähigen *Whatmann*-Filterpapier umschlossen. Dieses sogenannte *Sandwich* wurde anschließend in die mit Transferpuffer-gefüllte Blotkammer eingebracht. Um eine Kühlung während des Westernblottings zu gewährleisten wurde zusätzlich ein Kühlelement in der Kammer installiert. Der Transfer der Proteine auf die Trägermembran erfolgte für 1 Stunde bei konstanter Spannung von 100 V. Zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers wurde eine Ponceau S-Färbung (siehe Abschnitt 2.16.12) durchgeführt.

Immunodetektion

Der Nachweis bestimmter auf der Trägermembran befindlicher Proteine erfolgt durch das Prinzip der indirekten Immunodetektion, bei der zunächst ein Primärantikörper das auf der Membran befindliche Ziel-Epitop bindet. Anschließend wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter Enzym-konjugierter Sekundärantikörper hinzugefügt, der eine Detektion über eine Enzym-Substrat-Reaktion gestattet.

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran einmalig für 5 Minuten in Waschpuffer (1×TBS mit 0,1% Tween-20) zur Entfernung von Transferpuffer-Rückständen geschwenkt. Zur Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde die Membran in *Blocking*-Lösung (5% Milchpulver oder BSA in 1×TBS mit 0,1% Tween-20), abhängig vom jeweiligen

Antikörper, für 1 Stunde bei RT oder ü.N. bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper für 1 Stunde bei RT oder ü.N. bei 4 °C unter Schwenken auf der Membran inkubiert (siehe Tabelle 2-35). Nach dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 5 Minuten mit Waschpuffer (Entfernung unspezifisch gebundenen Primärantikörpers) wurde der Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper (Dako) nach Herstellerangabe für 1 Stunde bei RT unter Schwenken auf der Membran inkubiert. Erneut wurden durch dreimaliges Waschen (je 5 Minuten) unspezifisch gebundene Sekundärantikörper-Moleküle entfernt. Die Visualisierung der Proteinbanden in einer durch die HRP katalysierten Chemilumineszenz-Reaktion, wurde durch Verwendung des *ECL Western Blotting Substrate* (Pierce, Rockford, USA) bzw. das *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* gemäß den Herstellerangaben erreicht.

Tabelle 2-35: Primärantikörper für die Immunodetektion im Western Blot

Primärantikörper	Verdünnung und Puffer	Zeit und Temperatur
AGR2 (HPA007912)	1:250; MP	ü.N., 4 °C
AGR3 (ab82400)	1:1000; MP	1 Stunde, RT
ASPN (HPA008435)	1:250; MP	1 Stunde, RT
β-Aktin (A5441)	1:5000; MP	ü.N., 4 °C
β-Tubulin (ab6046)	1:500; MP	ü.N., 4 °C
CD44 (156-3C11)	1:1000; BSA	ü.N., 4 °C
CELSR1 (E-19)	1:500; MP	ü.N., 4 °C
CELSR1 (ABT119)	1:500; MP	ü.N., 4 °C
CTHRC1 (ab85739)	1:500; MP	1 Stunde, RT
c-Myc (D84C12)	1:1000; BSA	ü.N., 4 °C
DKK1 (#4687)	1:1000; BSA	ü.N., 4 °C
LRP6 (C47E12)	1:1000; BSA	ü.N., 4 °C
P-LRP6 (2568)	1:1000; BSA	ü.N., 4 °C
NKD2 (C67C4)	1:1000; BSA	ü.N., 4 °C
NMU (HPA025926)	1:250; MP	1 Stunde, RT
Rac1 (Kit #8815)	1:1000; BSA	ü.N., 4 °C

MP: 5% Milchpulver in TBS mit 0,1% Tween-20; BSA: 5% bovines Serumalbumin in TBS mit 0,1% Tween-20; ü.N.: über Nacht; RT: Raumtemperatur

2.16.12 Ponceau S-Färbung

Zum Nachweis eines erfolgreich verlaufenen Western Blots wurden die auf die Trägermembran transferierten Proteine mittels Ponceau S-Lösung für 5 bis 10 Minuten bei RT unter Schwenken gefärbt (Detektionsgrenze: 5-15ng/mm²). Anschließend wurde überschüssige Lösung solange mit ddH₂O von der Membran gewaschen, bis die angefärbten Proteinbanden deutlich sichtbar waren.

2.16.13 Peptid-Kompetitions-Assay (PCA)

Der Peptid-Kompetitions-Assay stellt eine gängige Möglichkeit dar, die Spezifität der in einem Western Blot-Experiment erhaltenen Banden zu überprüfen. Dazu wird der Primärantikörper vor seiner Zugabe auf die Membran mit einem ca. 2,5- bis 5-fachen Massenüberschuss an *Blocking*-Peptid inkubiert (bzw. 200-facher molarer Überschuss an Peptid). Dieses Peptid entspricht dem zu seiner Generierung verwendeten Immunisierungs-Peptid, welches dem Wirtstier injiziert wurde. Der so neutralisierte Antikörper wird anschließend mit der Membran inkubiert. Aufgrund seiner belegten Bindungsstellen kann keine spezifische Bindung an die auf der Membran befindlichen Epitope erfolgen (Kompetition). Parallel wird der gleiche Ansatz ohne *Blocking*-Peptid durchgeführt. Durch den direkten Vergleich der Bandenmuster beider Ansätze können so spezifische von unspezifischen Banden unterschieden werden. Dabei gelten nur solche Banden als spezifisch, die im Ansatz mit *Blocking*-Peptid nicht mehr vorhanden sind.

Der Kompetitions-Assay wurde in der vorliegenden Arbeit zur Etablierung des CELSR1-Antikörpers (E-19) der Firma Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) genutzt. Für die Peptid-Kompetition wurde diejenige Antikörper-Verdünnung gewählt, die in Vorversuchen zur Detektion eines Bandenmusters bestehend aus multiplen Banden führte: 1:500 mit 5% Milchpulver in 1×TBS/0,1% Tween-20 (siehe Tabelle 2-35). In einen der zwei Ansätze wurde nun das zugehörige *Blocking*-Peptid *E-19 P* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in einem 2,5-fachen Massenüberschuss (relativ zum Antikörper) hinzugefügt. In den Kontrollansatz ohne Peptid wurde ein äquivalentes Volumen an Puffer zugegeben. Beide Ansätze wurden anschließend für 30 Minuten bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. Auf zwei identische Protein-Membranen wurde nun jeweils einer der beiden Antikörper-Ansätze hinzugefügt und die Immunodetektion wie unter 2.16.11 beschrieben, durchgeführt.

2.16.14 Quantitativer Antigen-Nachweis in humanem Blutserum mittels ELISA

Im Zuge des MicroBioMed-Projektes identifizierte Serums-Biomarker-Kandidaten zur Erkennung von Brustkrebs, sollten innerhalb der letzten Validierungsstufe in humanen Seren von Brustkrebs-Patientinnen sowie gesunder Spenderinnen detektiert werden. Das genutzte quantitative Nachweisverfahren war der sogenannte *Sandwich*-ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Voraussetzung für diese Methode ist, dass der zu detektierende Analyt mindestens zwei verschiedene Epitope aufweist, die von zwei unterschiedlichen Primärantikörpern – einem Fang-Antikörper zur Immobilisierung des Antigens sowie einem

Detektions-Antikörper zur Signalgenerierung – gebunden werden können [255]. Auf der Oberfläche der Kavitäten einer 96-Well-Platte wird der Fang-Antikörper immobilisiert. Nach Zugabe eines Proben-Aliquots in die Kavität kommt es zur Bindung darin befindlicher spezifischer Antigene an den Fang-Antikörper. Anschließend erfolgt die Komplettierung des „Sandwichs“ durch Bindung des primären Detektions-Antikörpers an das noch freie Epitop. Die Signalgenerierung wird durch Zugabe eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers ermöglicht, der nach Substrat-Applikation eine quantifizierbare Farbreaktion katalysiert (Abbildung 2-4). Die Quantifizierung komplexer Proben (Matrizes) wie Serum mittels Antikörper-basierter Messverfahren wird häufig durch den sogenannten Matrix-Effekt erschwert. Dieser bezeichnet einen störenden Einfluss durch in der Proben-Matrix befindliche Komponenten auf die Quantifizierung und führt zu Messfehlern [256]. Ein weiteres zu berücksichtigendes Phänomen stellt der *Hook*-Effekt dar [257], der im Fall sehr hoher Analyten-Konzentrationen eintritt. Dies führt zu einer Sättigung der *Assay*-Antikörper und resultiert in gemessenen Konzentrationen, die deutlich unterhalb der realen liegen. Durch Verdünnung der Probe können diese Effekte oft reduziert oder umgangen werden.

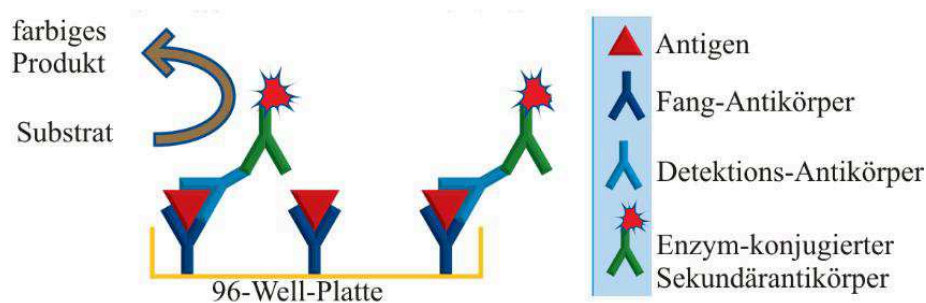


Abbildung 2-4: Prinzip des Sandwich-ELISA. An einer Oberfläche (hier: 96-Well-Platte) immobilisierte primäre Fang-Antikörper binden nach Zugabe eines Analyten die darin befindlichen spezifischen Antigene. Ein zweiter Primärantikörper (Detektions-Antikörper) bindet an ein weiteres, freies Epitop des über den Fang-Antikörper immobilisierten Antigens. Nach Applikation eines gegen den Detektions-Antikörper gerichteten Enzym-konjugierten Sekundärantikörpers, erfolgt die Signalgenerierung durch enzymatischen Substrat-Umsatz in ein farbiges Produkt. (Verändert nach *Sandwich ELISA Protocol Summary*, Abcam).

Die Analyse der Serums-Konzentrationen wurde mithilfe kommerziell erhältlicher *Sandwich*-ELISA-Kits für die Kandidaten ASPN (*ASPN ELISA Kit*, Cusabio, Wuhan, China), AGR2 (*ELISA Kit for AGR2*, USCN Life Science Inc, Wuhan, China), AGR3 (*AGR3 ELISA Kit*, Cusabio, Wuhan, China) und CTHRC1 (*ELISA Kit for CTHRC1*, USCN Life Science Inc,

Wuhan, China) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Für jedes ELISA-Kit wurde in einem Vorversuch die optimale Verdünnungsstufe der Serum-Proben zwecks Ausschluss von Messfehlern verursacht durch *Hook*- sowie Matrix-Effekt ermittelt. Um eine systematische Messabweichung (*Bias*) verursacht durch festgelegte Lokalisation der beiden zu vergleichenden Versuchsgruppen auf der ELISA-Platte zu umgehen, wurde die Anordnung von Brustkrebs- und Kontroll-Seren randomisiert. Die Vermessung jeder Probe erfolgte zudem in Doppelbestimmung.

2.17 Zellbiologische Methoden

2.17.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (an einer Sterilbank) zur Vermeidung von Kontaminationen (Bakterien, Pilze) durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien in einem Inkubator (37 °C, CO₂-Sättigung von 5%, 95% Luftfeuchtigkeit) erfolgte, abhängig von der vorhandenen Zellmenge, in Kulturflaschen mit folgenden Flächen: T25 (25 cm²), T75 (75 cm²) und T175 (175 cm²). Zusätzlich wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm genutzt. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien für die einzelnen Mammakarzinom-Zelllinien ist in Abschnitt 2.6 dargestellt. Das Medium wurde zwecks akkumulierender Stoffwechselprodukte und dem Verbrauch der enthaltenen Nährstoffe alle zwei bis drei Tage erneuert.

2.17.2 Ernte humaner Zelllinien

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 70-80% wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal in 1×PBS gewaschen und diese anschließend durch Inkubation für 5 Minuten bei 37 °C mit einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Oberfläche der Kulturgefäße abgelöst. EDTA führt zur Komplexbildung zweiwertiger Kationen wie Mg²⁺ und Ca²⁺, welche eine zentrale Rolle für die Zell-Matrix-Adhäsion haben. Trypsin bewirkt den proteolytischen Abbau von an der Adhäsion beteiligten Proteinen. Der Verlauf der Ablösung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert. Durch Zugabe von FKS-haltigem Medium wurde die proteolytische Reaktion abgestoppt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (250 × g, 5 Minuten) und nach Aufnahme in frisches Medium entweder für Zellkultur-Experimente ausgesät sowie zur Kryokonservierung oder Isolation von Protein und Nukleinsäuren verwendet.

2.17.3 Kryokonservierung und Inkulturnahme humaner Zelllinien

Zur Kryokonservierung von Zelllinien wurden diese wie unter Abschnitt 2.17.2 beschrieben nach Erreichen entsprechender Konfluenz von 80% in einer T75-Zellkulturflasche mit Trypsin-EDTA geerntet und pelletiert. Das Zellpellet wurde darauf in 3 ml Einfriermedium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20% FKS resuspendiert. DMSO fungiert als Gefrierschutzmittel, indem es in die Zellmembran eindringt und die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses unterbindet, welche zum Absterben der Zellen führen können. Da DMSO zudem zytotoxisch wirkt wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt (1 ml-Aliquots) und diese für eine möglichst geringe Verstoffwechselung des Zellgifts umgehend auf Eis gelagert. Zum Einfrieren der Zellen (ü.N., -80 °C) wurden die Kryoröhrchen in einen mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (*Mr. Frosty*, Thermo Scientific, Waltham, USA) eingebracht, welcher eine zellschonende Abkühlungsrate (-1 °C/Minute) gewährleistet. Die Lagerung der Zellen erfolgte ab dem nächsten Tage in flüssigem Stickstoff (-196 °C).

Zur Inkulturnahme eingefrorener Zellen wurde ein 1ml-Aliquot auf Eis aufgetaut und dieses in eine T75-Kulturflasche mit vorgelegtem Zellkulturmedium mit 20% FKS (10 ml) überführt. Zur Entfernung von DMSO-Resten und toten Zellen erfolgte bereits am nächsten Tag ein Mediumwechsel.

2.17.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension erfolgte mithilfe des *CASY® Cell Counter and Analyser* (OLS OMNI Life Science, Bremen). Nach Aufnahme eines 100 µl-Aliquots in 9,9 ml isotonische Messlösung (*Casyton*, OLS OMNI Life Science, Bremen) wurde die Messkapillare des Gerätes in die Messlösung eingetaucht. Die unter elektrischer Spannung stehende Kapillare weist eine Messpore auf, durch die nacheinander Zellen eingesaugt werden. Bei Durchtritt einer Zelle durch die Pore kommt es zu einer Änderung des elektrischen Stromflusses: vitale Zellen mit intakter Zellmembran blockieren den Stromfluss und generieren ein Volumen-abhängiges Signal. Tote Zellen/Zelltrümmer erlauben aufgrund ihrer Membran-Perforation das Schließen des Stromkreises und werden ebenfalls größenspezifisch erfasst.

2.17.5 Generierung stabiler genetisch-veränderter Mammakarzinom-Zelllinien

Die Erzeugung stabil genetisch-veränderter Mammakarzinom-Zelllinien (stabile Transfektion) diente in der vorliegenden Arbeit der erstmaligen funktionellen Analyse der Gene *AGR3* und *NMU* im humanen Mammakarzinom. Mithilfe dieser generierten Tumor-Modelle sollte in

nachfolgenden *in vitro*-Experimenten (siehe Abschnitt 2.18) die Bedeutung der Kandidaten für die Vermittlung fundamentaler Krebszell-Eigenschaften, die entscheidend für Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms sind [37], untersucht werden. Für die Überexpression der Gene *AGR3* in BT549 und *NMU* in den Zelllinien SKBR3 und Hs578T wurde der kommerziell erhältliche Vektor pT-REx-DEST30 mit der jeweiligen Vollängen-cDNA des Gens (Source BioScience LifeSciences, Nottingham, England) sowie der korrespondierende Leer-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) in die Zellen eingebracht (Abschnitt 2.13.1.1). Ein RNA-Interferenz (Abschnitt 2.17.6) vermittelter Expressionsverlust von *AGR3* in der Zelllinie MCF7 wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen shRNA-Plasmids (Qiagen, Hilden) (Abschnitt 2.13.2) durchgeführt. Um den Erhalt stabil genetisch-veränderter Zellen zu gewährleisten und nicht-transfizierte Zellen zu entfernen (Selektion), wurden die Zellen nach Transfektion in Medium mit dem Antibiotikum G418 (Invitrogen, Karlsruhe) kultiviert.

2.17.5.1 G418-Konzentrationsbestimmung

Die Aufnahme der in den Abschnitten 2.13.1.1 und 2.13.2 beschriebenen Vektoren in die Zelle führt aufgrund eines Plasmid-kodierten Neomycin-Resistenzgens zur Unempfindlichkeit der Transfektanden gegenüber dem Antibiotikum G418. Die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen erfolgte daher über den Zusatz von G418 in das Zellkulturmedium. Die optimale, letale G418-Konzentration wurde ermittelt, indem $2-3 \times 10^5$ Zellen (abhängig von der Zelllinie) in den Kavitäten steriler 6-Well-Platten ausgesät wurden. Am nächsten Tage erfolgte die Zugabe von G418 in unterschiedlichen Konzentrationen. Als Kontrolle fungierte ein Ansatz ohne G418. Die Inkubation in G418-haltigem Medium erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen, wobei das Medium alle zwei Tage erneuert wurde. Als optimale, letale G418-Konzentration wurde die niedrigste Konzentration erachtet, die zum Absterben aller Zellen führte. Tabelle 2-36 zeigt die ermittelten letalen G418-Konzentrationen für die in dieser Arbeit stabil transfizierten Mammakarzinom-Zelllinien.

Tabelle 2-36: Letale G418-Konzentrationen

Zelllinie	letale G418-Konzentration [$\mu\text{g/ml}$]
BT549	400
Hs578T	600
MCF7	350
SKBR3	1000

2.17.5.2 Lipofektion

Am Vortag der Transfektion wurden $2\text{--}3 \times 10^5$ Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät, so dass für diese eine Konfluenz von 70-80% erreicht wurde. Die Transfektion wurde gemäß den Herstellerangaben mithilfe des *FuGene HD Kit* der Firma Roche (Mannheim) durchgeführt. Die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgt durch Bindung der negativ geladenen DNA an die positiv geladene Oberfläche von Liposomen im Reagenz. Die DNA gelangt schließlich durch Fusion von DNA-Liposomen-Komplexen mit der eukaryotischen Zellmembran in die Zelle (Lipofektion). Das optimale Verhältnis von Vektor-DNA-Menge zum Volumen an *FuGene HD*-Reagenz wurde in einem Vorversuch für jede Zelllinie ermittelt, wobei sich für alle in Tabelle 2-36 aufgeführten Zelllinien ein Verhältnis von 2 µg Vektor-DNA zu 6 µl und 8 µl *FuGene HD* als geeignet erwies. Tabelle 2-37 zeigt das Transfektions-Schema, welches allen durchgeführten stabilen Transfektionen dieser Arbeit zugrunde liegt.

Tabelle 2-37: Transfektions-Schema

Ansatz	Funktion	Vektor-DNA [µg]	<i>FuGene HD</i> [µl]	ddH ₂ O [µl]
A	Selektionskontrolle	-	-	100
B	Reagenzkontrolle	-	8	92
C	Voll-Vektor 6:2	2	6	94
D	Voll-Vektor 8:2	2	8	92
E	Leer-Vektor 6:2	2	6	94
F	Leer-Vektor 8:2	2	8	92

Nach sorgfältigem Mischen erfolgte eine Inkubation der Transfektionsansätze für 10 Minuten bei RT. Anschließend wurde das Gemisch tropfenweise auf die in 2 ml Medium befindlichen Zellen pipettiert. Nach einer Kultivierungszeit von 72 Stunden wurden die Zellen in den Ansätzen A, C, D, E und F durch Trypsinieren geerntet (Ansatz B wurde verworfen). Zur Generierung eines *Pools* aus verschiedenen stabilen Transfektanten wurden die geernteten Zellen in eine T75-Kulturflasche mit 10 ml G418-haltigem Medium überführt und diese vor ihrer Verwendung in Experimenten für mindestens 14 Tage unter Selektionsdruck kultiviert. Zur Selektion von stabilen Einzelklonen wurde das geerntete Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und die Zellsuspension entsprechend dem in Tabelle 2-38 aufgeführten Schema in Petrischalen (10 cm Durchmesser) mit G418-haltigem Medium verdünnt.

Tabelle 2-38: Verdünnungsschema für Einzelklon-Isolierung

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

Die Kultivierung der Zellen in G418-haltigem Medium (siehe Tabelle 2-36) erfolgte für mindestens 14 Tage. Erst nach vollständigem Absterben der mitgeführten, nicht-transfizierten Wildtypzellen (Selektionskontrolle, Ansatz A) wurde mit der Isolierung stabiler Einzelklone begonnen. Dazu wurden die bereits makroskopisch sichtbaren Kolonien (Einzelklone) in den Petrischalen (Ansätze C bis F) durch Auflage von Klonierungsringsen und anschließender Zugabe von Trypsin in die so entstandenen isolierten Kompartimente von der Petrischale abgelöst und in einzelne Kavitäten von 96-Well-Platten überführt. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurden die Klone in ein nächstgrößeres Platten- (48-, 24-, 6-Well) bzw. Kulturflaschen-Format (T25, T75) umgesetzt. Zur Überprüfung der stabilen Integration der Konstrukte in das Genom wurden DNA-Proben und für die Expressionsanalyse des jeweiligen Gens RNA- sowie Proteinproben isoliert.

2.17.6 RNA-Interferenz (RNAi)

Das Phänomen der effektiven Abschaltung der Genexpression über dsRNA wurde 1998 erstmals von Fire und Kollegen beschrieben [258]. Diese injizierten dsRNA in den Nematoden *C. elegans* und beobachteten neben einer Abschaltung der Zielgen-Expression eine stabile Weitergabe dieser Gen-Stilllegung an die Nachkommen (RNA-Interferenz, RNAi). RNAi ist ein natürlich vorkommender Prozess in Eukaryoten, dessen funktioneller Ursprung vermutlich die Abwehr bzw. Stilllegung von RNA-Viren und Transposons ist [259]. Die Existenz von dsRNA in der Euzyte führt vermittelt durch die Doppelstrang-spezifische RNase III „Dicer“ zur Spaltung dieser in siRNAs (*small interfering RNAs*) einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden mit beidseitigem 3'-Überhang aus je 2 Nukleotiden. Der zur Ziel-mRNA komplementäre Einzelstrang der siRNA (*guide strand*) wird in einen Multiprotein-Komplex inkorporiert (RISC, *RNA-induced silencing complex*) und vermittelt so die post-transkriptionelle Degradation der Ziel-mRNA [260].

In dieser Arbeit wurde ein transienter Expressionsverlust von *CELSR1* in der Zelllinie MCF7 sowie *CTHRC1* in BT549 mittels siRNA-Transfektion (siehe Abschnitt 2.14) induziert. Zudem wurde durch Einbringung eines shRNA (*short hairpin RNA*)-Plasmids ein stabiler Expressionsverlust von *AGR3* in der Zelllinie MCF7 generiert (siehe Abschnitt 2.17.5). Die

vom stabil im Genom integrierten Vektor kodierte RNA bildet durch intramolekulare Basenpaarung eine Haarnadelstruktur mit doppelsträngigem Anteil aus, der wie oben beschrieben, die Erzeugung von siRNAs induziert. Für die transiente siRNA-Transfektion wurden siRNAs sowie das Transfektionsreagenz *HiPerfect* vom Hersteller Qiagen (Hilden) bezogen. Für beide Zellmodelle und Ziel-Gene wurde in Vorversuchen ein Protokoll etabliert. Für den *Knockdown* von *CTHRC1* in BT549 sowie *CELSRI* in MCF7 wurden am Vortag der Transfektion 2×10^5 Zellen in den Kavitäten einer 6-Well-Platte ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag mit insgesamt 600 ng *CTHRC1*-spezifischer (je 300 ng zweier verschiedener siRNAs) bzw. 300 ng *CELSRI*-spezifischer siRNA (je 150 ng zweier verschiedener siRNAs). Als Negativkontrolle wurde jeweils die entsprechende Menge einer kommerziellen, artifiziellen siRNA (Qiagen) verwendet, die keine Homologie zum menschlichen Genom aufweist. Nach 8-minütiger Inkubation der siRNAs mit dem Transfektionsreagenz wurde der Ansatz tropfenweise auf die in 2,3 ml Medium (ohne LG/PS) befindlichen Zellen pipettiert. Nach 72 Stunden wurde der konfluente Zellrasen trypsiniert, die gleiche Anzahl an Zellen ausgesät und diese nach obigem Protokoll direkt erneut transfiziert. Zwei Tage später (nach 120 Stunden) konnten die Experimente mit dem *CTHRC1-Knockdown*-Modell begonnen werden. Für das *CELSRI*-Modell wurde eine dritte Transfektion (nach 144 Stunden) durchgeführt und die Versuche nach insgesamt 192 Stunden gestartet. In Tabelle 2-39 ist die Zusammensetzung der Transfektionsansätze aufgeführt.

Tabelle 2-39: Zusammensetzung Ansatz für siRNA-Transfektion

Komponente	<i>CTHRC1</i> (600 ng)	<i>CELSRI</i> (300 ng)
siRNA, 1 μ M [μ l]	48	24
Medium ^a [μ l]	52	76
<i>HiPerfect</i> [μ l]	12	12

a: ohne FKS und LG/PS

2.18 Funktionelle *in vitro*-Experimente

2.18.1 XTT-Proliferationstest

Die Analyse des Zellwachstums von Mammakarzinom-Zelllinien wurde mithilfe des *XTT Cell Proliferation Kit II* (Roche, Mannheim) durchgeführt. Der Assay basiert auf der Reduktion des Tetrazolium-Salzes XTT zu einem wasserlöslichen, orangefarbenen Formazan-Salz mittels des mitochondrialen Succinat-Tetrazolium Reduktase Systems in metabolisch-aktiven (vitalen)

Zellen [261]. Die Menge gebildeten Formazans (Absorption von Licht einer Wellenlänge zwischen $\lambda=450$ nm und $\lambda=500$ nm) korreliert direkt mit der Anzahl vitaler Zellen im analysierten Ansatz und konnte über Messung an einem Spektralphotometer (Infinitive 500, Tecan) quantifiziert werden. Anstelle der direkten Messung der Zellproliferation wurde folglich die Anzahl vorhandener lebender Zellen (Resultat aus Proliferation und Apoptose) zu verschiedenen Zeitpunkten einer Messreihe ermittelt (nach 24, 48, 72, 96 Stunden nach Zellaussaat). Dazu wurden 1000 Zellen jeder Versuchsgruppe im 6-fachen Ansatz in einer 96-Well-Platte ausgesät und in einem Brutschrank inkubiert (4 Platten insgesamt). Als Negativkontrolle wurden auf jeder Platte 2 Wells mit (zellfreiem) Medium mitgeführt. 24 Stunden nach Aussaat erfolgte die erste Messung, welche zur Normierung der darauffolgenden Messwerte genutzt wurde. Nach Erneuerung des Mediums (100 μ l) wurden 50 μ l des aktivierten XTT-Reagenz in jedes Well pipettiert. Zur Aktivierung wurde dem XTT-Reagenz zuvor ein Elektronenkopplungs-Reagenz im Verhältnis 1:50 zugesetzt. Nach einer Inkubation für 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank erfolgte die Quantifizierung der Farbreaktion am ELISA-Reader. Die erhaltenen Absorptions-Werte bei $\lambda=492$ nm wurden durch Subtraktion der Messwerte bei $\lambda=650$ nm (unspezifische Absorption) korrigiert.

2.18.2 Koloniebildungstest (*Colony Formation Assay*, CFA)

Der Koloniebildungstest stellt neben dem XTT-Proliferationstest eine Methode zur Quantifizierung des Zellwachstums (Resultat aus Proliferation und Apoptose) dar. Zudem gibt der Assay Aufschluss über die Fähigkeit der Zellen zur Koloniebildung und gestattet zusätzlich anhand der Analyse ihrer Morphologie Rückschlüsse auf Progressions-assoziierte Zelleigenschaften (Migration, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion) zu ziehen. Von jeder Versuchsgruppe wurden 1000-2000 Zellen/Well einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium ausgesät, wobei jede Gruppe in Dreifachbestimmung analysiert wurde. Für stabile Einzelklone wurde der Selektionsdruck durch Zugabe der entsprechenden Menge G418 in das Medium aufrechterhalten. Die Zellen wurden insgesamt für 10-14 Tage bei 37 °C im Brutschrank kultiviert und das Medium alle zwei bis drei Tage erneuert. Anschließend wurde jedes Well einmal vorsichtig mit 2 ml PBS gewaschen und zur Fixierung und Anfärbung der Einzelkolonien 1 ml einer 0,5%igen Kristallviolett-Lösung (80% Methanol, 10% Formaldehyd, 10% ddH₂O) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT sowie drei Waschschritten mit H₂O wurden die fixierten und gefärbten Kolonien fotografiert. Die densitometrische Auswertung des Koloniewachstums wurde mithilfe der Software ImageJ (1.45, National Institute of Health, USA) durchgeführt.

2.18.3 Caspase 3/7-Aktivitätsmessung

Als Maß für ablaufende Apoptose in stabilen SKBR3 NMU- und Kontroll-Klonen wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 mithilfe des *ApoOne® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega) entsprechend den Herstellerangaben ermittelt. Die Detektion aktiver Caspase 3/7 erfolgte durch Zugabe des nicht-fluoreszierenden Rhodamin-Derivats Z-DEVD-R110, das ein Substrat der Caspase 3/7 darstellt und nach Abspaltung des DEVD-Peptids in den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 110 (Anregung: $\lambda=485$ nm; Emission: $\lambda=577$ nm) umgewandelt wird. Die an einem ELISA-Reader quantifizierbare Fluoreszenz korreliert mit der als Apoptose-Maß geltenden Caspase 3/7-Aktivität. Dazu wurden 15×10^3 Zellen jedes Einzelklons in 50 μ l in einem 6-fachen Ansatz in den Kavitäten einer 96-Well-Platte ausgesät und ü.N. bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Zur Induktion der Apoptose wurde Staurosporin (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in einer finalen Konzentration von 1 μ M in 3 der 6 Wells hinzugegeben. Die Wells ohne Staurosporin fungierten als Negativkontrolle. Zusätzlich wurde ein Blank (Medium ohne Zellen) in Zweifach-Bestimmung mitgeführt. Nach 24-stündiger Apoptose-Induktion bei 37 °C erfolgte die Zugabe von 50 μ l des Caspase 3/7-Substrates (1:100 in Lysepuffer verdünnt) für 4 Stunden bei RT unter Lichtausschluss. Abschließend wurden alle Ansätze in eine schwarze ELISA-Platte überführt und das Fluoreszenzsignal an einem ELISA-Reader (Infinite 500, Tecan) quantifiziert.

2.18.4 Zell-Matrix-Adhäsionstest

In ihrer physiologischen Umgebung treten alle Zellen (ausgenommen Erythrozyten) transient oder dauerhaft in Kontakt zur umgebenden Extrazellulärmatrix. Epithelzellen sind an einer Basalmembran verankert, die sie vom Stroma abtrennt. Zwecks Simulation der *in vivo*-Situation wurden 6-Well-Platten mit *Matrigel™ Basement Membrane Matrix* der Firma BD Bioscience (Bedford, MA, USA) beschichtet. Matrigel™ entstammt einem Engelbrecht-Holm Swarm (EHS) Maus Sarkom, einem an extrazellulärem Matrixprotein reichen Tumor und simuliert mit Komponenten wie Laminin und Collagen IV die natürliche Basalmembran. Matrigel™ wurde mit FKS-freiem Zellkulturmedium zu einer Arbeitslösung gemischt (10 μ g/ml Endkonzentration) und zur Beschichtung je 1 ml dieser Lösung in die Wells pipettiert. Nach einer Polymerisationsphase für 2 Stunden wurde der flüssige Überstand abgenommen und die Oberfläche vorsichtig zweimal mit je 1 ml FKS-freiem Medium gewaschen. Anschließend wurden $2,5$ bis 5×10^5 Zellen (abhängig von der Zelllinie) in 2 ml FKS-freiem Medium ausgesät und für 1 Stunde in einem Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch zweimaliges vorsichtiges Waschen mit je 1 ml FKS-freiem Medium wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt und

adhärente Zellen durch 10-minütige Inkubation mit 70% EtOH bei RT fixiert. Die adhärenen Zellen wurden nachfolgend mit einer 0,1% Kristallviolett-Lösung angefärbt und nach 20 Minuten überschüssiger Farbstoff durch dreimaliges Waschen mit je 2 ml H₂O entfernt. Nach Trocknung der Platten ü.N. bei 37 °C wurde der Farbstoff mit 0,02% Triton-X und Isopropanol gelöst und jeweils 200 µl des Überstandes in einer Dreifach-Bestimmung in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590$ nm wurde in einem ELISA-Reader gemessen.

2.18.5 Wundheilungstest

Zur Analyse des Migrationsverhaltens von Mammakarzinom-Zelllinien wurde ein Wundheilungstest (auch als *Scratch Assay* bezeichnet) durchgeführt. Dieser Test untersucht die Fähigkeit der Zellen durch Migration über einen Zeitraum eine zellfreie Fläche (*Scratch*) zu besiedeln. Zur Erzeugung einer zellfreien Fläche definierter Breite wurden spezielle, sterile Silikonrahmen (Ibidi, Martinsried) verwendet. Diese umgeben jeweils zwei Teilkammern (je 0,22 cm²), die in der Mitte durch einen Steg einer Breite von 500 ± 50 µm voneinander getrennt sind. Diese Silikonrahmen wurden unter sterilen Bedingungen in die Kavitäten einer 6-Well-Platte eingebracht und eine entsprechende Zellzahl (SKBR3: 40×10^3 , Hs578T: 18×10^3 , BT549: 15×10^3 , MCF7: 20×10^3 Zellen) in einem Gesamtvolumen von 100 µl je Teilkammer ausgesät, so dass nach ca. 24-stündiger Inkubation ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen in beiden Teilkammern entstand.

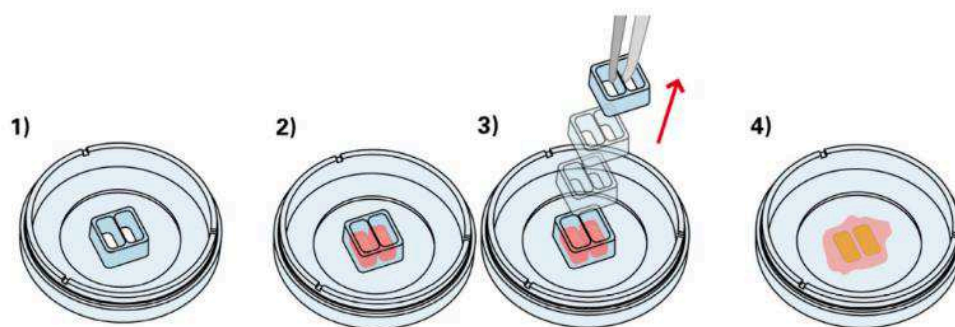


Abbildung 2-5: Wundheilungstest mit Ibidi-Zellkultureinsätzen. Die Zellkultureinsätze werden unter sterilen Bedingungen in die Kavitäten einer 6-Well-Platte eingebracht (1) und anschließend die Zellsuspension in die beiden Teilkammern pipettiert (2). Nach Ausbildung eines konfluenter, einschichtigen Zellrasens werden die Einsätze mit einer sterilen Pinzette entfernt (3), um nach zwei Waschschritten frisches Medium auf die Zellen zu geben (4). (*Instruction Manual*, Ibidi).

Nach Entfernung des Rahmens mit einer Pinzette wurde eine zellfreie Fläche freigelegt, die der Breite des Stegs entsprach. Nach zweimaligem, vorsichtigem Waschen mit 1×PBS zur Entfernung nicht-adhärenter Zellen und Zelltrümmer und dem Befüllen der Kavität mit 2 ml Medium, konnte der Versuch gestartet werden (Abbildung 2-5).

Zur Dokumentation der Besiedlung der zellfreien Fläche wurde ein Mikroskop (Axiovert TV100, Zeiss, Jena) mit einer hochauflösenden *ColourVision III CCD* Kamera verwendet. Zur Erfassung eines möglichst großen Ausschnitts wurden die Aufnahmen des für jede Probe immer gleich gewählten Ausschnitts bei 25-facher Vergrößerung in definierten Zeitabständen durchgeführt. Die Quantifizierung der zellfreien Fläche (in Pixel) für jeden Messzeitpunkt erfolgte mithilfe der Software ImageJ (1.45, National Institute of Health, USA). Der Wert für jeden Messzeitpunkt wurde in Relation zur jeweiligen zellfreien Ausgangsfläche zum Messzeitpunkt $T = 0$ Stunden angegeben.

2.18.6 Boyden Chamber-Migrationstest

Eine weitere Methode zur Analyse des Migrationsverhaltens von Zellen stellt der *Boyden Chamber*-Migrationstest [262] dar, welcher mithilfe des *CytoSelect™ 24-Well Cell Migration Assay* (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) Kits durchgeführt wurde. Der Test beruht auf Nutzung sogenannter Transwell-Einsätze, Kammern, deren Böden aus Polycarbonat-Filtern einer Porengröße von 8 µm bestehen und die die chemotaktische Migration von Zellen durch den Filter gestatten. Für die Analyse des Migrationsverhaltens von BT549-Mammakarzinom-Zellen nach siRNA-vermitteltem *CTHRC1-Knockdown*, wurden diese sowie zugehörige Kontrollen für 20 Stunden durch FKS-Entzug im Medium ausgehungert. Nach Einbringung der Transwell-Einsätze in mit 10% FKS-haltigem Medium (500 µl) befüllte Kavitäten einer 24-Well-Platte (untere Kammer) wurden 15×10^4 Zellen in FKS-freiem Medium (300 µl) in die Transwell-Einsätze ausgesät (obere Kammer) und die Platte für 7 Stunden bei 37 °C in einem Brutschrank inkubiert. Die in dieser Zeit in Richtung des chemotaktischen Reizes FKS durch die Membran migrierten Zellen bleiben auf der Unterseite des Filters haften. Zur Entfernung nicht-migrierter Zellen innerhalb der oberen Kammern wurde das Medium abgenommen und diese gründlich mit sterilen Wattestäbchen gereinigt. Die Anfärbung der migrierten Zellen für 10 Minuten bei RT erfolgte durch Transfer der Einsätze in eine frische 24-Well-Platte, die je Kavität mit 400 µl *Cell Stain Solution* befüllt wurde. Nach mehrmaligem gründlichem Waschen der Einsätze in Wasser zur Entfernung überschüssiger Färbelösung, wurden diese zwecks Entfärbung migrierter Zellen in jeweils 200 µl *Extraction Solution* für 10 Minuten bei RT in einer neuen 24-Well-Platte inkubiert. Die so herausgelöste Menge an Farbstoff ist proportional

zur Anzahl migrierter Zellen und konnte durch Vermessung der Absorption bei $\lambda = 560$ nm eines Aliquots (100 μ l) in einem ELISA-Reader quantifiziert werden (Abbildung 2-6).

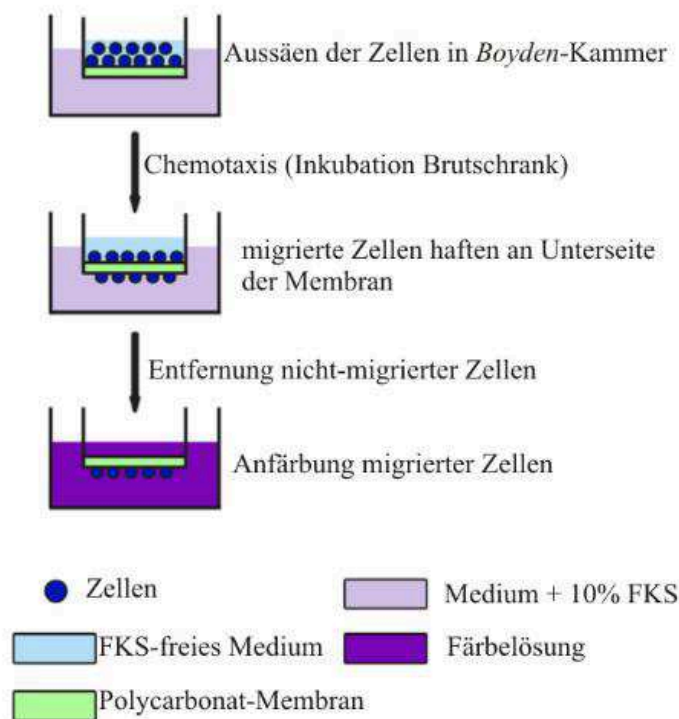


Abbildung 2-6: Prinzip des Boyden Chamber-Migrationstests. Die Zellen werden in FKS-freiem Medium in der Boyden-Kammer ausgesät, die über eine Membran mit dem in der darunter liegenden Kavität befindlichen 10% FKS-haltigen Medium in Kontakt steht. Während der Inkubationszeit im Brutschrank migrieren Zellen, dem chemotaktischen Reiz (FKS) folgend, durch die Membran und bleiben an deren Unterseite haften. Nach Entfernung nicht-migrierter Zellen erfolgt die Anfärbung der migrierten Zellen durch den Transfer der Kammer in Färbelösung. (Verändert nach *Product Manual*, Cell Biolabs, Inc.).

2.18.7 Induzierter Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER)

Das in zahlreichen humanen Krebsentitäten stark exprimierte, zur Proteindisulfidisomerase (PDI)-Familie zählende Protein AGR2 wird unter ER-Stress im Zuge der UPR (*unfolded protein response*) induziert und vermittelt den Tumorzellen als Chaperon vermutlich einen Wachstums- bzw. berlebensvorteil [103]. Um zu überprüfen, ob dem homologen Protein AGR3 mit bisher unbeschriebener zellulärer Funktion eine ähnliche Rolle innerhalb der UPR zukommen kann, wurden Zellen der humanen Mammakarzinom-Zelllinien MCF7 (2×10^5) und BT549 ($1,8 \times 10^5$) in den Kavitäten von 6-Well-Kulturschalen ausgesät und nach Erreichen einer Konfluenz von 70% mit Tunicamycin (5 μ g/ml in DMSO; Sigma-Aldrich) versetzt. Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung von Proteinen im ER und führt zur Anhäufung

fehlgefalteter Proteine [263]. Als Kontroll-Gruppen wurden DMSO- und unbehandelte Zellen der jeweiligen Zelllinie mitgeführt. Nach Inkubationszeiten von 12 und 24 Stunden bei 37 °C in einem Brutschrank wurden die Zellen in 1 ml Trizol aufgenommen und nach RNA-Isolation die Expression der Gene *AGR3*, *AGR2* sowie des ER-Stress-Indikators *DDIT3* (*CHOP*) [264] gemessen. Die Expression der Zielgene wurde auf die Expression des Haushaltsgens *GAPDH* normiert.

2.18.8 Microarray-basierte Genexpressionsanalyse des SKBR3 NMU-Tumormodells

Um erstmalig durch Neuromedin U (NMU) modulierte biologische Prozesse sowie NMU-assoziierte Gen-Signaturen im humanen Mammakarzinom zu identifizieren, wurde eine *Microarray*-Analyse unter Einschluss von jeweils drei unabhängigen SKBR3 NMU-Einzelklonen (Testgruppe) und SKBR3 Leervektor-Kontrollen (Kontrollgruppe) durchgeführt. Die experimentelle Durchführung sowie die statistische Auswertung der Rohdaten wurden in der *Chip Facility* des IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung) der Uniklinik RWTH Aachen, unter Verwendung des *GeneChip Human Gene 2.0 ST Array* des Herstellers Affymetrix (Santa Clara CA, USA), durchgeführt. Der *Chip* deckte mehr als 33.500 Proteinkodierende sowie mehr als 11.000 nicht-kodierende *RefSeq*-, Ensembl- und IncRNAdb-annotierte Transkripte ab. Um differentiell exprimierte Gene zwischen Test- und Kontrollgruppe zu identifizieren wurde eine Klassen-Vergleichsanalyse mithilfe der *Software Affymetrix Transcriptome Analysis Console* (TAC) 2.0 durchgeführt. Gene wurden als differentiell exprimiert angesehen, wenn ein P-Wert < 0,05 (*one-way* ANOVA) vorlag. Um durch NMU-modulierte biologische Prozesse und Signalwege zu ermitteln wurde eine *Gene Ontology* (GO)-Analyse [265] mithilfe der Programme *AltAnalyze* (Version 2.0.8) [266] und *GO-Elite* [267] durchgeführt. Die Filter-Parameter für die Identifizierung signifikant überrepräsentierter GO-Annotationen (unterteilt in die drei GO-Klassen „zelluläre Komponente“, „biologischer Prozess“, „molekulare Funktion“), waren ein *Z-Score* von mindestens 1,96 („Beobachtet-Erwartet-Verhältnis“), ein P-Wert < 0,05 (exakter Test nach Fisher) sowie eine Anzahl von mindestens zwei veränderten Genen der jeweiligen GO-Annotation. Gene, die zwischen Test- (NMU) und Kontrollgruppe (Leervektor) um einen Faktor größer 1,5 mit einem P-Wert < 0,05 differentiell exprimiert waren, wurden als „verändert“ definiert.

2.19 Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen wurden mithilfe der Programme *SPSS 17.0* (SPSS, IL, USA) oder *GraphPad Prism* (5.0, CA, USA) durchgeführt und waren zweiseitig angelegt. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ wurde als statistisch signifikant definiert. Vergleiche zweier unabhängiger Gruppen wurden mithilfe des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests vorgenommen, hingegen erfolgte der Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben mithilfe des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests. Bivariate Korrelationsanalysen zwischen Expressionsdaten und klinisch-pathologischen Parametern wurden mittels Kontingenztabellen unter Anwendung des exakten Tests nach Fisher durchgeführt. Die Evaluierung der klinischen Relevanz der Protein-Serumbiomarker-Kandidaten AGR2 und AGR3 für das humane Mammakarzinom erfolgte mittels Durchführung einer ROC (*Receiver Operating Characteristics*)-Analyse. Als Maß für die Güte des Tests kann die Fläche unterhalb der ROC-Kurve herangezogen werden (*Area Under Curve*, AUC). Zur Beurteilung der prognostischen Relevanz eines potentiellen Biomarker-Kandidaten im humanen Mammakarzinom wurden univariate Überlebensanalysen nach der Methode von Kaplan und Meier durchgeführt und die Signifikanz der Funktion mittels Log-Rank-Test beurteilt. Eine multivariate Cox Regressions-Analyse mit Einschluss-Methode wurde anschließend durchgeführt, um die Unabhängigkeit eines innerhalb der univariaten Analyse als signifikant ermittelten prognostischen Faktors von anderen Kovariaten zu überprüfen. In die multivariate Analyse wurden nur die Faktoren einbezogen, die innerhalb der univariaten Analyse das Signifikanz-Niveau erreichten.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Validierung potentieller Proteinbiomarker für die Blut-basierte Brustkrebs-Früherkennung

Das humane Mammakarzinom, die am häufigsten diagnostizierte maligne Krebserkrankung der Frau weltweit, ist zudem die Entität, welche für den größten Anteil Krebs-bedingter Sterbefälle von Frauen verantwortlich ist [2]. Die Prognose der Erkrankung ist entscheidend abhängig vom Zeitpunkt der Diagnosestellung. Wird die Brustkrebserkrankung in einem frühen, noch lokal begrenzten Stadium diagnostiziert, liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei 90%, hingegen sinkt diese auf 20% bei Diagnose einer bereits metastasierten Brustkrebserkrankung [63]. Der dringende Bedarf an neuen, komplementären Diagnose-Strategien wird durch die erkannten Limitationen der *Screening*-Mammographie [66, 69] verdeutlicht. Einen vielversprechenden Ansatz stellt die Identifizierung von in Körperflüssigkeiten wie Blutserum detektierbaren Proteinbiomarkern dar [268]. Ein darauf basierendes Feld mit enormem Potential für die Krebs-Früherkennung ist die Entwicklung mikrofluidischer Chip-basierter Technologien [78]. Als Partner im interdisziplinären Kooperationsprojekt MicroBioMed sollten im Rahmen dieser Arbeit zirkulierende Proteinbiomarker identifiziert und validiert werden, welche das Vorliegen einer Brustkrebserkrankung mit adäquater klinischer Spezifität und Sensitivität robust anzeigen können. Dabei wurde eine minimale Kombination von Markern zu einem *Panel* angestrebt, das in der Lage ist möglichst alle molekularen Subtypen der heterogenen Brustkrebserkrankung [23] zu erfassen. Von Kooperationspartnern generierte Antikörper gegen die validierten Biomarker sollten schließlich in einen mikrofluiden, Chip-basierten Biosensor integriert werden.

3.1.1 Erste Stufe: Identifizierung potentieller Proteinbiomarker

Zur Identifizierung eines initialen Kandidaten-*Pools* wurden drei unterschiedliche Strategien verfolgt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Dahl (Molekulare Onkologie, Pathologie, Uniklinik RWTH Aachen) konnte ein *Set* differentiell im Mammakarzinom im Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe exprimierter Gene mittels *Microarray*-Technologie identifiziert werden [236, 269]. In weiteren Vorarbeiten in Kooperation mit Dr. Corinna Henkel (Medizinisches Proteom-Center Bochum, Bochum) wurde ein proteomischer Identifizierungsansatz verfolgt, der einen direkten Vergleich der Proteinzusammensetzung von Serum-Proben gesunder Spenderinnen und Brustkrebspatientinnen zum Ziel hatte und auf der

Kombination von 2D-DIGE (zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese)-Technik mit anschließender Massenspektrometrie basierte (unveröffentlichte Daten). Weitere Biomarker-Kandidaten konnten in einer *in silico*-Analyse unter Verwendung der TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)-Datenbank [237, 238] mit kombinierter Literaturrecherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) identifiziert werden. Die Auswahl der Kandidaten orientierte sich an folgenden Kriterien: 1. die Expression des Kandidaten war in Mammakarzinom-Proben signifikant ($P < 0,05$) um einen Faktor > 2 gegenüber Normalgewebe-Kontrollen gesteigert, 2. das Protein wird sezerniert oder weist eine Ektodomäne auf (Membranproteine) und gelangt so mit hoher Wahrscheinlichkeit in den Blutkreislauf (basierend auf Literaturrecherche und *in silico*-Analyse). Der so identifizierte Kandidaten-*Pool* setzte sich aus insgesamt 15 Kandidaten zusammen (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Identifizierter Kandidaten-*Pool*

HUGO-Genname
<i>AGR2</i>
<i>AGR3</i>
<i>ASPN</i>
<i>COL10A1</i>
<i>COL11A1</i>
<i>CELSR1</i>
<i>CTHRC1</i>
<i>FN1</i>
<i>GREM1</i>
<i>MMP1</i>
<i>NMU</i>
<i>PLG</i>
<i>S100P</i>
<i>SPP1</i>
<i>VCAN</i>

3.1.1.1 Expression der Biomarker-Kandidaten in humanen Mammakarzinom-Zelllinien

In einem ersten Schritt wurde die Expression der Biomarker-Kandidaten in humanen Mammakarzinom-Zelllinien analysiert. Zelllinien stellen adäquate Tumor-Modelle dar und erlauben erste Informationen über mögliche im Tumor deregulierte Gene zu erhalten [239].

Abbildung 3-1 zeigt repräsentativ die mRNA-Expression der Kandidatengene *AGR3*, *CELSR1*, *CTHRC1* und *NMU* in 14 malignen Brustkrebs-Zelllinien in Relation zur mittleren Expression des jeweiligen Gens in den beiden benignen Brust-Zelllinien MCF10A und MCF12A.

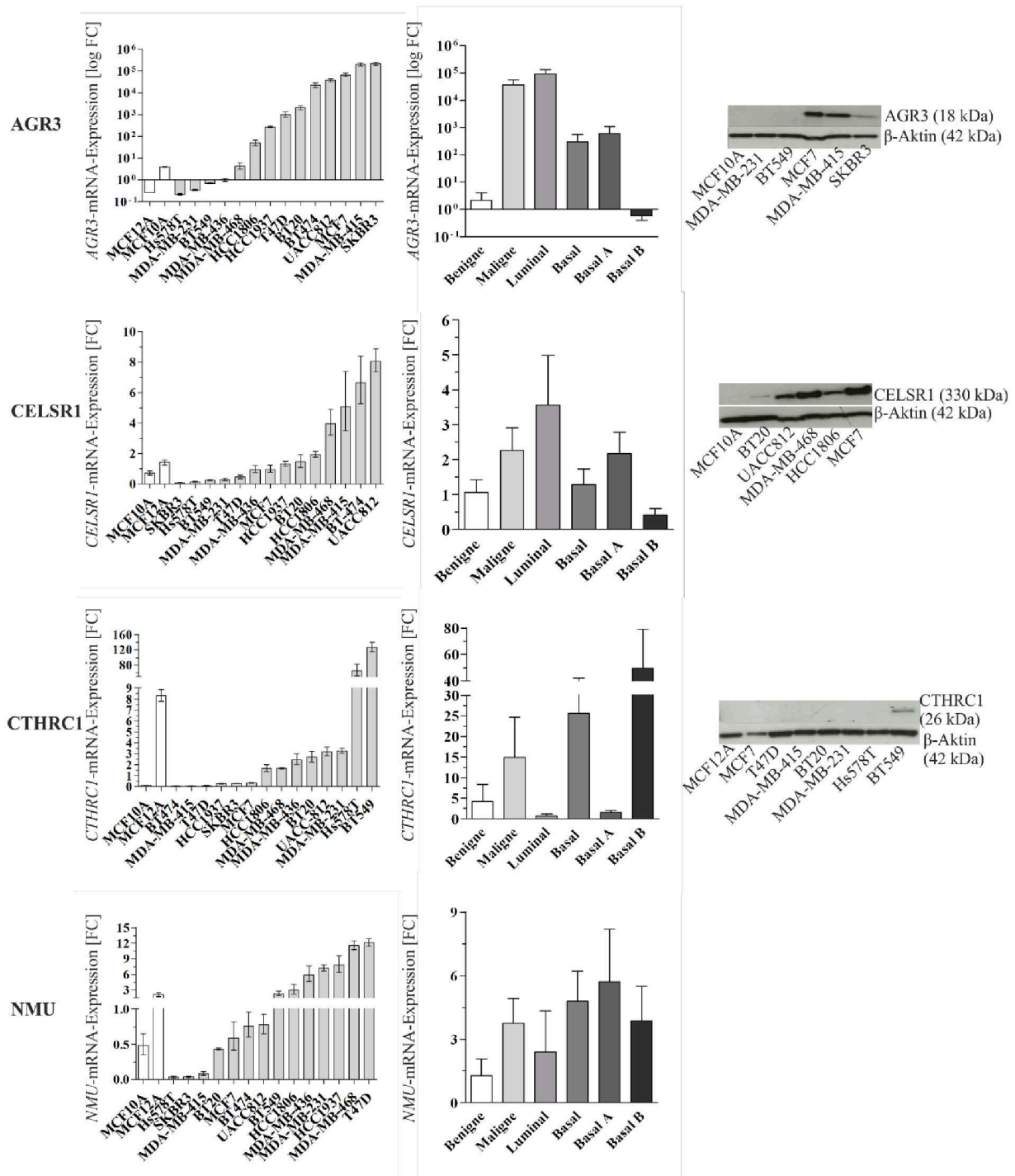


Abbildung 3-1: Identifizierung aufregulierter Biomarker-Kandidaten in malignen Mammakarzinom-Zelllinien. Linke Graphen: mRNA-Expression der Gene *AGR3*, *CELSR1*, *CTHRC1* und *NMU* in 14 malignen Mammakarzinom- und zwei benignen Brust-Zelllinien. Die Expression jeder Zelllinie ist relativ zur mittleren Expression des jeweiligen Gens in den beiden benignen Zelllinien MCF10A und MCF12A angegeben. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Balken: $\pm$ SEM der Dreifachbestimmung. Mittlere Graphen: relative mRNA-Expression der Gene *AGR3*, *CELSR1*, *CTHRC1* und *NMU* nach Gruppierung der Zelllinien ihrem molekularen Subtypen entsprechend. Vertikale Linien: $\pm$ SEM. Rechte Western Blots: Expression der Proteine AGR3, CELSR1 und CTHRC1 in malignen Mammakarzinom-Zelllinien und der benignen Zelllinie MCF10A bzw. MCF12A. NMU-Protein konnte in keiner der untersuchten Zelllinien detektiert werden. β -Aktin fungierte als Ladekontrolle der aufgetragenen Gesamtproteinmenge.

Tabelle 3-2: Übersicht über mRNA-Expressionsänderungen analysierter Kandidatengene in humanen Mammakarzinom-Zelllinien. Angegeben ist die Änderung der mittleren mRNA-Expression (FC, *Fold Change*) der Kandidatengene in verschiedenen Gruppen relativ zur mittleren Expression dieser Gene in den beiden benignen Brust-Zelllinien MCF10A und MCF12A.

	Maligne / Benigne	Luminal / Benigne	Basal / Benigne	Basal A / Benigne	Basal B / Benigne
<i>AGR3</i>	≥ 10,0 (+)	≥ 10,0 (+)	≥ 10,0 (+)	≥ 10,0 (+)	≥ 3,0 (-)
<i>ASPN</i>	=	≥ 1,5 (-)	=	k.A.	k.A.
<i>CELSR1</i>	≥ 2,0 (+)	≥ 3,0 (+)	=	≥ 2,0 (+)	≥ 2,0 (-)
<i>CTHRC1</i>	≥ 3,0 (+)	≥ 5,0 (-)	≥ 5,0 (+)	≥ 2,0 (-)	≥ 10,0 (+)
<i>GREM1</i>	≥ 5,0 (+)	≥ 2,0 (+)	≥ 5,0 (+)	k.A.	k.A.
<i>MMP1</i>	≥ 5,0 (+)	≥ 5,0 (+)	≥ 5,0 (+)	k.A.	k.A.
<i>NMU</i>	≥ 2,0 (+)	≥ 1,5 (+)	≥ 3,0 (+)	≥ 4,0 (+)	≥ 3,0 (+)
<i>PLG</i>	=	≥ 1,5 (-)	=	k.A.	k.A.
<i>S100P</i>	≥ 2,0 (+)	≥ 3,0 (+)	≥ 10,0 (-)	k.A.	k.A.

(+): mRNA-Expression aufreguliert; (-): mRNA-Expression herabreguliert; = : FC < 1,5; k.A.: keine Angabe aufgrund geringer Probenanzahl

Die mRNA-Expressionsanalyse veranschaulicht eine Expressionssteigerung aller vier Kandidatengene in den malignen gegenüber den benignen Zelllinien um einen Faktor > 2, wobei die deutlichste Erhöhung der Expression für den Kandidaten *AGR3* verzeichnet wurde (FC, *Fold Change*: 17.502). Durch Gruppierung der Zelllinien entsprechend ihrem molekularen Subtypen [239] ließ sich eine Assoziation der *AGR3*-, sowie *CELSR1*-mRNA-Expression mit dem luminalen, hingegen für die Gene *CTHRC1* und *NMU* mit dem basalen Subtypen feststellen. Die mRNA-Expressionsdaten konnten ferner durch Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot für die Kandidaten *AGR3*, *CELSR1* und *CTHRC1* bestätigt werden, wohingegen eine Detektion von *NMU*-Protein in keiner der untersuchten Zelllinien möglich war. Tabelle 3-2 fasst die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalyse für alle neun untersuchten Biomarker-Kandidaten zusammen.

Parallel zur *in vitro*-Analyse wurde die Expression der Kandidaten auf mRNA- und Proteinebene in humanen Mammakarzinomen und Brust-Normalgeweben untersucht (siehe Abschnitt 3.1.1.3).

3.1.1.2 Nachweis von CELSR1-Protein im konditionierten Medium humaner Mammakarzinom-Zelllinien

Ein Kriterium für die Auswahl potentieller Serum-Proteinbiomarker für weiterführende Analysen stellte deren Sezernierung dar. Daneben wurden auch Membranproteine mit extrazellulärer Domäne berücksichtigt, welche durch Abspaltung als lösliches Proteinfragment in den Extrazellularraum gelangen kann [270]. Bei acht der insgesamt neun analysierten Kandidaten (siehe Tabelle 3-2) handelte es sich um lösliche Proteine, deren Sezernierung in der Literatur bereits belegt ist. Die Ausnahme bildete der 7-Transmembran-Rezeptor CELSR1, für dessen Homolog Flamingo aus *Drosophila melanogaster* eine autokatalytische Abspaltung der Ektodomäne (bereits im Lumen des endoplasmatischen Retikulums) beschrieben wurde [165]. Um eine mögliche Abspaltung der Ektodomäne von CELSR1 zu überprüfen wurde konditioniertes Medium (KM) der stark CELSR1-Protein exprimierenden Zelllinie MCF7 (siehe Abbildung 3-1) mithilfe eines gegen die N-terminale, extrazelluläre Region von CELSR1 gerichteten Antikörpers, untersucht. Es ist anzumerken, dass sich der für die Sezernierungs-Experimente verwendete Antikörper (E-19, sc-46839) von demjenigen für die Expressionsstudie in Abbildung 3-1 genutzten (ABT119), unterscheidet.

Im konditionierten Medium konnte ein distinktes Signal detektiert werden, welches der CELSR1-Ektodomäne (269 kDa) entsprechen könnte (Abbildung 3-2). Das Volllängen-Protein (328 kDa) konnte erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Da Proteine auch passiv über apoptotische oder nekrotische Zellen in den Zellkulturüberstand gelangen, wurde das Gesamtprotein-Lysat von MCF7-Zellen als Kontrolle mitgeführt. Im Gesamtprotein-Lysat konnten sowohl das Volllängen-Protein, die putative Ektodomäne von CELSR1 sowie eine mögliche zweite, lösliche Isoform von CELSR1 (150 kDa; <http://www.uniprot.org>) detektiert werden, die jedoch nicht im konditionierten Medium nachweisbar war. Die Spezifität des Bandenmusters wurde in einem *Blocking*-Experiment durch Inkubation des Primärantikörpers mit dem zugehörigen Immunisierungs-Peptid überprüft. Der deutlich sichtbar erhöhte Quotient aus CELSR1- zu β -Aktin-Signal im Überstand im Vergleich zum Gesamtprotein-Lysat sowie fehlendes Volllängen-Protein im konditionierten Medium, deuten auf eine Abspaltung der Ektodomäne und damit auf eine potentielle Nutzbarkeit von CELSR1 als Serum-Proteinbiomarker hin.

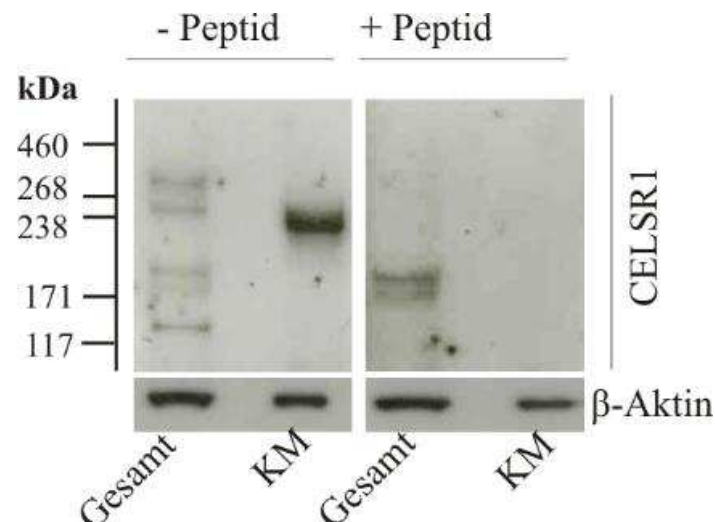


Abbildung 3-2: Detektion von CELSR1-Protein in konditioniertem Medium der Zelllinie MCF7. Möglicher Western Blot-Nachweis der CELSR1-Ektodomäne (269 kDa) in konditioniertem Medium (KM) der Zelllinie MCF7. Als Vergleich wurde die Proteinexpression von CELSR1 im Gesamtprotein-Lysat (Gesamt) von MCF7-Zellen untersucht. Es wurden 3 spezifische Signale identifiziert: Volllängen-Protein (328 kDa), die putative CELSR1-Ektodomäne (269 kDa) sowie eine mögliche weitere Isoform (150 kDa). Ein *Blocking*-Experiment mit dem zur Antikörper-Generierung genutzten CELSR1-Peptid diente der Diskriminierung spezifischer und unspezifischer Banden: verbleibende Banden nach Inkubation des Primärantikörpers mit *Blocking*-Peptid (+ Peptid) wurden als unspezifische Signale gewertet. β -Aktin fungierte als Ladekontrolle.

3.1.1.3 Expression der Biomarker-Kandidaten in humanen Mammakarzinomen und Brust-Normalgeweben

Parallel zur *in vitro*-Analyse humaner Mammakarzinom-Zelllinien (siehe Abschnitt 3.1.1.1) wurde eine Tumor-spezifische Expression potentieller Biomarker-Kandidaten in humanen Mammakarzinomen im Vergleich zu Brust-Normalgeweben untersucht - eine gängige Vorgehensweise zur Identifizierung geeigneter Serum-Proteinbiomarker [271]. Dazu erfolgte zunächst die Etablierung eines Kollektivs bestehend aus 62 kryoasservierten Brusttumoren und 13 Brust-Normalgeweben. Die klinisch-pathologischen Parameter des Kollektivs sind in Tabelle 6-1 des Anhangs zusammengefasst. Die Validierung der generierten mRNA-Expressionsdaten für die Kandidatengene und deren Korrelationen mit klinisch-pathologischen Parametern erfolgte zusätzlich durch *in silico*-Analyse einer unabhängigen Studie (siehe Abschnitt 2.1.4). Diese umfasste mRNA-Expressionsdaten für insgesamt 997 Brusttumoren. Die Rohdaten dieser Studie sind überwiegend durch das TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)-Netzwerk veröffentlicht worden [237]. Die klinisch-pathologischen Parameter des Kollektivs sind zusätzlich in Tabelle 6-4 des Anhangs aufgeführt. Abschließend wurde überprüft, ob sich auf mRNA-Ebene gezeigte Expressionsunterschiede zwischen Brusttumor- und Normalgewebe sowie herausgestellte Korrelationen auch auf Proteinebene bestätigen lassen.

3.1.1.3.1 Der Biomarker-Kandidat AGR3

Die semi-quantitative *AGR3*-mRNA-Expressionsanalyse der kryoasservierten Tumor- und Normalgewebe der Brust ergab bei Vergleich aller Tumoren (n=62) mit der Normalgewebe-Gruppe (n=13) eine Erhöhung der *AGR3*-Expression in den Mammakarzinomen im Median um einen Faktor von 2,3 (Abbildung 3-3A). Die Gruppierung aller Mammakarzinome, basierend auf immunhistochemischen (IHC) und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungs (FISH)-Daten für Östrogen-, Progesteron- und HER2/NEU-Rezeptor, in die Subtypen „Luminal“, „HER2-positiv“ und „triple-negativer Brustkrebs (TNBC)“ [18], ergab eine signifikante ($P < 0,05$) Aufregulation der *AGR3*-Expression in luminalen Brustkrebs-Fällen im Vergleich zum Normalgewebe (medianer FC: 6,7; Abbildung 3-3B). Die Assoziation zwischen luminalem Subtypen und erhöhter *AGR3*-mRNA-Expression konnte ferner mittels Durchführung eines exakten Tests nach Fisher bestätigt werden. Dieser zeigte eine hochsignifikante, positive Korrelation zwischen positivem Östrogen- sowie Progesteronrezeptor-Status und der *AGR3*-mRNA-Expression (für beide $P < 0,001$; Tabelle 3-3). Hingegen wurde eine reduzierte *AGR3*-Expression in den HER2-positiven und triple-negativen Brustkrebs-Fällen (medianer FC: 10,0 und 100,0) im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt (Abbildung 3-3B). Zudem konnte eine signifikante Aufregulation der *AGR3*-Expression in gut (G1) und mäßig (G2) ($P < 0,05$; medianer FC: 9,1), jedoch nicht in schlecht (G3) differenzierten Mammakarzinomen (medianer FC: 1,3) im Vergleich zum normalen Brustgewebe gezeigt werden (Abbildung 3-3C). Die Assoziation zwischen Grad 1/2-Tumoren und erhöhter *AGR3*-Expression wurde mittels exaktem Test nach Fisher bestätigt ($P < 0,05$; Tabelle 3-3).

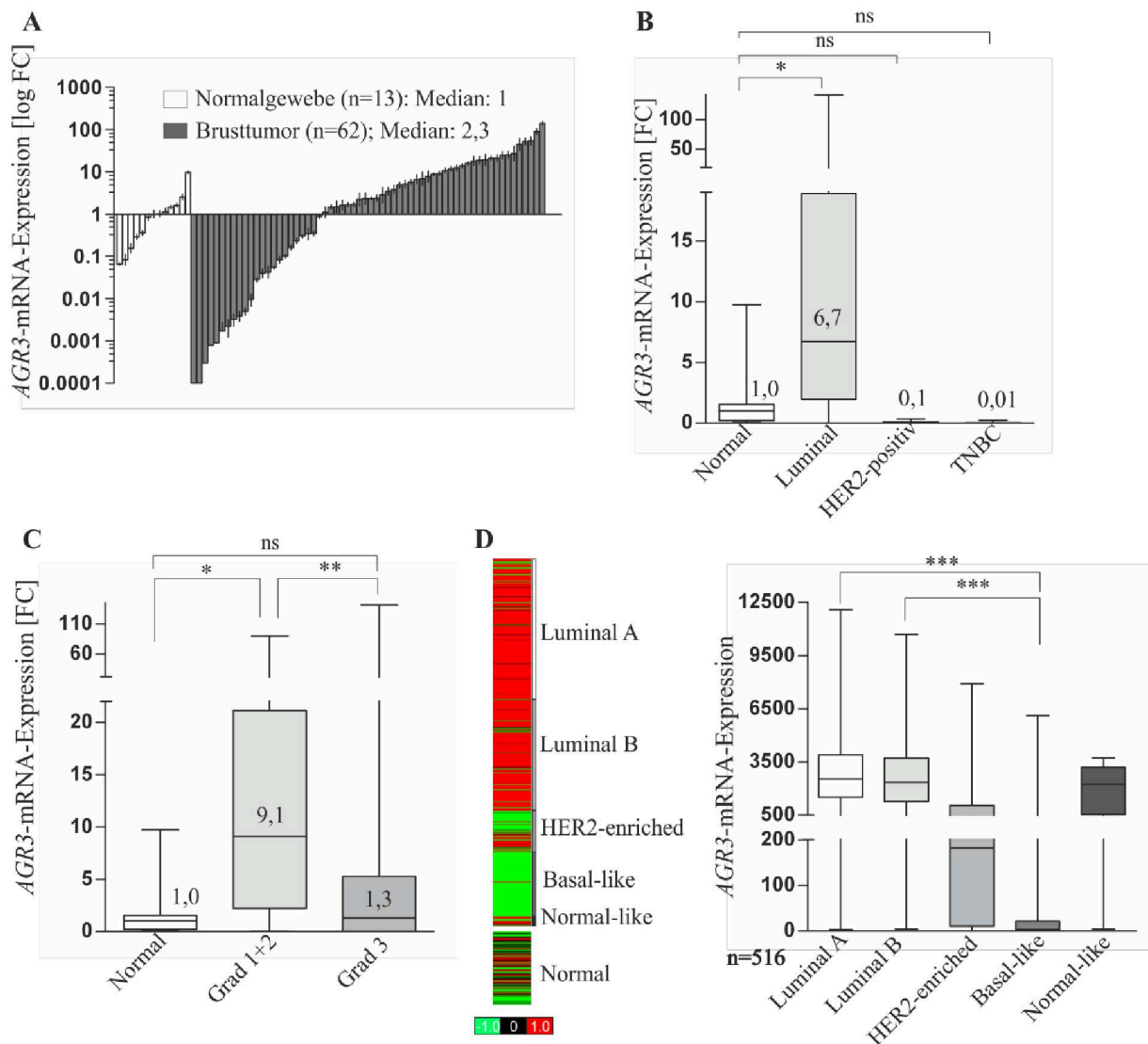


Abbildung 3-3: Aufregulation der AGR3-mRNA-Expression in G1/G2- und luminalen Brusttumoren. (A) Real-Time-PCR-basierte AGR3-mRNA-Expressionsanalyse in 62 kryoasservierten Mammakarzinomen und 13 Brust-Normalgeweben. Die Expression aller Proben wurde auf die mediane AGR3-mRNA-Expression der Normalgewebe normiert. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: $\pm$ SEM der Dreifachbestimmung. (B und C) Box Plots der Proben aus A verdeutlichen eine signifikante Aufregulation der AGR3-mRNA-Expression im IHC-klassifizierten luminalen Brustkrebs-Subtypen sowie gut (G1) und mäßig (G2) differenzierten Mammakarzinomen. TNBC: triple-negative Mammakarzinome, G3: schlecht differenzierte Mammakarzinome. Horizontale Linien: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Zahlen innerhalb bzw. oberhalb der Boxen entsprechen dem Median. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ns: nicht signifikant (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest). (D) In silico-AGR3-mRNA-Expressionsanalyse in 516 PAM50-klassifizierten Brusttumoren. Die Expressionsdaten der Tumoren sind als Heat Map zusammen mit Normalgewebe-Expressionsdaten (links) sowie als Box Plot (rechts) dargestellt. Rot: hohe, schwarz: intermediäre, grün: niedrige AGR3-mRNA-Expression. Horizontale Linien: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

Tabelle 3-3: Korrelation klinisch-pathologischer Parameter des Kryogewebe-Kollektivs mit der AGR3-mRNA-Expression

Parameter	Kategorisierung	n ^a	AGR3 hoch ^b	AGR3 niedrig ^b	P-Wert ^c
Gesamt	-	62	31 (50,0%)	31 (50,0%)	-
Alter bei Diagnosestellung	Median: 63,5 Jahre				
	<63,5 Jahre	31	14 (45,2%)	17 (54,8%)	0,612
	≥63,5 Jahre	31	17 (54,8%)	14 (45,2%)	
Tumorgröße^d	pT1	35	19 (54,3%)	16 (45,7%)	0,609
	pT2-3	27	12 (44,4%)	15 (55,6%)	
Lymphknoten-Status^d	pN0	34	15 (44,1%)	19 (55,9%)	0,444
	pN1-3	27	15 (55,6%)	12 (44,4%)	
Histologischer Tumorgrad^e	G1-2	23	16 (69,6%)	7 (30,4%)	0,018
	G3	38	14 (36,8%)	24 (63,2%)	
Histologischer Subtyp	invasiv-duktral	55	27 (49,1%)	28 (50,9%)	1,000
	invasiv-lobulär	5	3 (60,0%)	2 (40,0%)	
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^f 0-2)	18	0 (0,0%)	18 (100,0%)	<0,001
	positiv (IRS ^f 3-12)	42	30 (71,4%)	12 (28,6%)	
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^f 0-2)	20	2 (10,0%)	18 (90,0%)	<0,001
	positiv (IRS ^f 3-12)	39	28 (71,8%)	11 (28,2%)	
HER2-Status^g	negativ	53	29 (54,7%)	24 (45,3%)	0,147
	positiv	8	2 (25,0%)	6 (75,0%)	

^aWeibliche Patienten mit primärem, unilateralen, invasiven Mammakarzinom. ^bDie Expression aller Tumor-Proben wurde auf die mediane AGR3-mRNA-Expression der Normalgewebe normiert. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Die Dichotomisierung der relativen Expressionsdaten erfolgte am Median. ^cExakter Test nach Fisher; zweiseitiges Signifikanzniveau. ^dGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [20]. ^eGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [19]. ^fImmunreaktiver *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^gÜberexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-*Score*-System diagnostiziert. Zweifelhafte (DAKO-IHC: 2+) Fälle wurden zusätzlich mittels FISH-Analyse auf Amplifikation des Gens hin analysiert. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehlern ungleich 100% sein. Signifikante P-Werte (P < 0,05) sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Validierung der generierten mRNA-Expressionsdaten für *AGR3* erfolgte über die *in silico*-Analyse eines unabhängigen Datensatzes des TCGA-Portals [237]. Für 516 Fälle der insgesamt 997 Mammakarzinome lag eine PAM50-Klassifizierung in die molekularen Brustkrebs-Subtypen (Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like) vor [27]. Die eigenen mRNA-

Daten unterstützend zeigte sich eine hochsignifikant aufregulierte *AGR3*-mRNA-Expression in beiden luminalen Subtypen (Luminal A und B) gegenüber den basalen Brusttumoren (Basal-like) (für beide $P < 0,001$; Abbildung 3-3D).

Tabelle 3-4: Korrelation klinisch-pathologischer Parameter des *in silico*-Datensatzes mit der *AGR3*-mRNA-Expression

Parameter	Kategorisierung	n ^a	<i>AGR3</i> hoch ^b	<i>AGR3</i> niedrig ^b	P-Wert ^c
Gesamt	-	993	497 (50,1%)	496 (49,9%)	-
Alter bei Diagnosestellung	Median: 58 Jahre				
	<58 Jahre	500	221 (44,2%)	279 (55,8%)	
	≥58 Jahre	483	271 (56,1%)	212 (43,9%)	<0,001
Tumorgroße^d	pT1	252	135 (53,6%)	117 (46,4%)	
	pT2-4	705	345 (48,9%)	360 (51,1%)	0,213
Lymphknoten-Status^d	pN0	451	219 (48,6%)	232 (51,1%)	
	pN1-3	493	254 (51,5%)	239 (48,5%)	0,397
Fernmetastasierung^d	pM0	837	416 (49,7%)	421 (50,3%)	
	pM1	15	7 (46,7%)	8 (53,3%)	1,000
Tumor-Stadium^d	Stadium 1	161	93 (57,8%)	68 (42,2%)	
	Stadium 2-4	781	380 (48,7%)	401 (51,3%)	0,038
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^e 0-2)	175	8 (4,6%)	167 (95,4%)	
	positiv (IRS ^e 3-12)	592	385 (65,0%)	207 (35,0%)	<0,001
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^e 0-2)	249	44 (17,7%)	205 (82,3%)	
	positiv (IRS ^e 3-12)	515	346 (67,2%)	169 (32,8%)	<0,001
HER2-Status^f	negativ	638	339 (53,1%)	299 (46,9%)	
	positiv	114	45 (39,5%)	69 (60,5%)	0,008

^aWeibliche Patienten mit Mammakarzinom. ^bDie Dichotomisierung der relativen RNA-Expressionsdaten für *AGR3* erfolgte am Median. ^cExakter Test nach Fisher; zweiseitiges Signifikanzniveau. ^dGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [20]. ^eImmunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^fÜberexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-Score-System diagnostiziert. Zweifelhafte (DAKO-IHC: 2+) Fälle wurden zusätzlich mittels FISH-Analyse auf Amplifikation des Gens hin analysiert. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehlern ungleich 100% sein. Signifikante P-Werte ($P < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Ferner wurde eine positive Korrelation zwischen positivem Östrogen- sowie Progesteronrezeptor-Status und *AGR3*-mRNA-Expression mittels exaktem Test nach Fisher bestätigt (für beide $P < 0,001$; Tabelle 3-4). Überdies konnte eine hochsignifikante negative Korrelation zwischen positivem HER2-Rezeptor-Status und *AGR3*-Expression herausgestellt werden ($P < 0,01$; Tabelle 3-4), die sich tendenziell anhand der eigenen mRNA-Expressionsdaten bereits andeutete (siehe Tabelle 3-3). Aufgrund fehlender Information über den Differenzierungsgrad der Tumoren konnte eine mögliche Korrelation zwischen guter (G1) bis mäßiger (G2) Differenzierung der Tumoren und erhöhter *AGR3*-Expression nicht am unabhängigen *in silico*-Kollektiv des TCGA-Datenportals verifiziert werden. Im Hinblick auf die potentielle Nutzung von *AGR3* als Biomarker für die Brustkrebs-Früherkennung wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen *AGR3*-Expression und Tumor-Stadium untersucht. Es zeigte sich eine signifikante ($P < 0,05$) Assoziation zwischen erhöhter *AGR3*-Expression und frühem Tumor-Stadium (Tabelle 3-4).

Abschließend galt es die auf mRNA-Ebene gezeigte differentielle Expression für *AGR3* zwischen Normal- und Tumorgewebe auf Proteinebene zu bestätigen. Dazu wurde ein *Tissue Microarray* (TMA) bestehend aus 39 Normalgeweben und 190 Brustkrebsfällen mithilfe eines monoklonalen *AGR3*-Antikörpers gefärbt. Die klinisch-pathologischen Parameter des TMA sind in Tabelle 6-2 (Anhang) zusammengefasst.

Die Spezifität für *AGR3* sowie eine ausbleibende Kreuzreaktivität mit dem homologen Protein *AGR2* wurden zuvor mittels Western Blot-Analyse überprüft (Abbildung 3-4A). Im normalen Brustgewebe konnte eine zytoplasmatische *AGR3*-Proteinexpression in vereinzelten Zellen des Brustepithels detektiert werden (Abbildung 3-4B). In Übereinstimmung mit den mRNA-Daten zeigte sich eine starke zytoplasmatische *AGR3*-Expression in epithelialen Krebszellen des luminalen Subtyps (Abbildung 3-4C), hingegen eine ausbleibende oder schwache Anfärbung in triple-negativen Brusttumoren (Abbildung 3-4D und E). Die statistische Quantifizierung der *AGR3*-Färbung unter Verwendung eines von Remmele und Stegner entwickelten immunreaktiven *Scores* (IRS) [272] ergab eine signifikante ($P < 0,05$) mediane Aufregulation der *AGR3*-Proteinexpression in den analysierten Brusttumoren im Vergleich zu den Normalgewebe-Kontrollen (Abbildung 3-4F). Erneut im Einklang mit den mRNA-Daten bestätigte sich einerseits eine hochsignifikante ($P < 0,001$) Aufregulation der *AGR3*-Proteinexpression in den IHC-klassifizierten luminalen Tumoren, andererseits eine signifikant ($P < 0,05$) reduzierte Expression in den triple-negativen Brustkrebs-Fällen (TNBC) im Vergleich zur Normalgewebe-Expression. Kein signifikanter Expressionsunterschied wurde zwischen HER2-positiven Fällen und der Normalgewebe-Gruppe festgestellt.

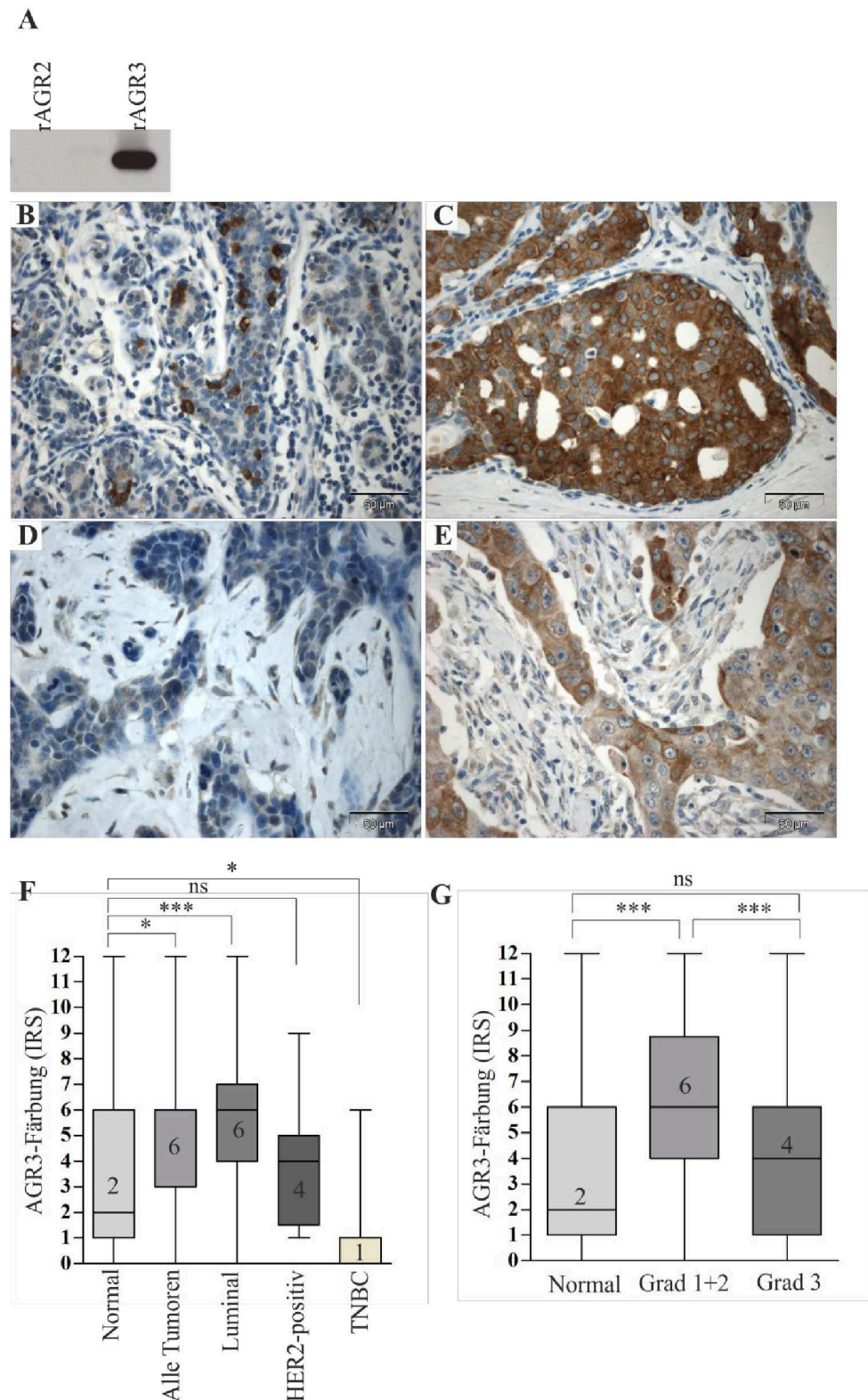


Abbildung 3-4: Aufregulation der AGR3-Proteinexpression in G1/G2- und luminalen Tumoren der Brust. (A) Spezifischer Nachweis rekombinanten AGR3-(rAGR3, 100 ng), jedoch nicht des homologen AGR2-Proteins (rAGR2, 100 ng) mithilfe des für die IHC genutzten monoklonalen AGR3-Antikörpers. (B) Zytoplasmatische Anfärbung von AGR3 in vereinzelt Zellen des normalen Brustepithels. (C) Starke zytoplasmatische Anfärbung von AGR3-Protein in epithelialen Krebszellen eines IHC-klassifizierten luminalen Brusttumors. (D) Ausbleibende und (E) schwache zytoplasmatische AGR3-Proteinexpression in zwei triple-negativen (TNBC) Brustkrebs-Fällen. Alle Messbalken: 50μm. (F) Die Box Plot-Analyse zeigt eine signifikante Aufregulation der AGR3-Proteinexpression in allen Brusttumoren (n=190) und im IHC-klassifizierten luminalen Sybtypen (n=113), hingegen eine

signifikante Herabregulation von AGR3 in triple-negativen Brustkrebs-Fällen (TNBC, n=23) im Vergleich zur Normalgewebe-Expression (n=39). (G) Der *Box Plot* verdeutlicht eine hochsignifikante Aufregulation von AGR3-Protein in gut (G1) und mäßig (G2) differenzierten Mammakarzinomen (n=104) im Vergleich zur Normalgewebe-Expression (n=39). Die Zahlen innerhalb der Boxen entsprechen dem jeweiligen medianen IRS. Horizontale Linien: Mediane, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile, vertikale Linien: Minima und Maxima. Signifikanzen beruhen auf zweiseitigem Dunn's multiplem Vergleichstest. *: $P < 0,05$, ***: $P < 0,001$, ns: nicht signifikant. IRS: immunreaktiver *Score* nach Remmele und Stegner [272].

Tabelle 3-5: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des TMA mit der AGR3-Proteinexpression

Parameter	Kategorisierung	n ^a	AGR3 hoch ^b	AGR3 niedrig ^b	P-Wert ^c
Gesamt	-	190	101 (53,2%)	89 (46,8%)	-
Alter bei Diagnosestellung	Median: 58 Jahre				
	<58 Jahre	92	44 (47,8%)	48 (52,2%)	
	≥58 Jahre	96	55 (57,3%)	41 (42,7%)	0,242
Tumorgröße^d	pT1	61	32 (52,5%)	29 (47,5%)	
	pT2-4	125	66 (52,8%)	59 (47,2%)	1,000
Lymphknoten-Status^d	pN0	81	40 (49,4%)	41 (50,6%)	
	pN1-3	102	55 (53,9%)	47 (46,1%)	0,555
Histologischer Tumorgrad^e	G1-2	104	64 (61,5%)	40 (38,5%)	
	G3	82	34 (41,5%)	48 (58,5%)	0,008
Histologischer Subtyp	invasiv-duktral	173	91 (52,6%)	82 (47,4%)	
	invasiv-lobulär	7	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0,126
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^f 0-2)	44	9 (20,5%)	35 (79,5%)	
	positiv (IRS ^f 3-12)	101	66 (65,3%)	35 (34,7%)	<0,001
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^f 0-2)	107	51 (47,7%)	56 (52,3%)	
	positiv (IRS ^f 3-12)	51	33 (64,7%)	18 (35,3%)	0,060
HER2-Status^g	negative (0; 1+; 2+)	132	74 (56,1%)	58 (43,9%)	
	positive (3+)	30	11 (36,7%)	19 (63,3%)	0,069

^aWeibliche Patienten mit primärem, unilateralen, invasiven Mammakarzinom. ^bDie Dichotomisierung erfolgte am Median des immunreaktiven *Scores* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]: IRS 0-4 (niedrig), IRS 6-12 (hoch). ^cExakter Test nach Fisher; zweiseitiges Signifikanzniveau. ^dGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [20]. ^eGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [19]. ^fIRS nach Remmele und Stegner [272]. ^gÜberexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-Score-System diagnostiziert. Prozentangaben können aufgrund von Rundungsfehlern ungleich 100% sein. Signifikante P-Werte ($P < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Weiterhin übereinstimmend mit den mRNA-Daten konnte eine hochsignifikante ($P < 0,001$) Aufregulation der AGR3-Proteinexpression in G1- und G2-Brusttumoren im Vergleich zur Normalgewebe-Expression gezeigt werden (Abbildung 3-4G). Die positive Korrelation zwischen AGR3-Proteinexpression und dem luminalen Subtypen sowie mit gut (G1) und mäßig (G2) differenzierten Tumoren, wurde schließlich mittels exaktem Test nach Fisher untermauert (Tabelle 3-5).

Von Bedeutung für einen Früherkennungsmarker ist neben der Detektion früher Stadien invasiver Tumoren bereits der Nachweis von prä-invasiven Läsionen, die im Vergleich zu invasiven Stadien eine deutlich bessere Prognose aufweisen [273]. Dazu wurde die AGR3-Proteinexpression in invasiven Tumorzellen, der Expression in nicht-invasiven Tumoranteilen (hier nur duktales Karzinome *in situ* (DCIS)) und Brust-Normalgeweben gegenüber gestellt. Abbildung 3-5 zeigt eine graduelle Zunahme der AGR3-Proteinexpression vom Normalgewebe über die DCIS-Anteile bis hin zu den invasiven Tumorzellen (medianer FC des IRS gegenüber Normalgewebe: 2 (DCIS), 3 (invasiver Tumor)).

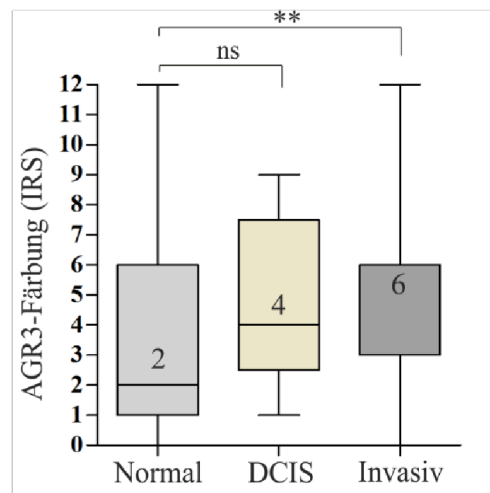


Abbildung 3-5: Graduelle Zunahme der AGR3-Proteinexpression vom Brust-Normalgewebe bis zum invasiven Mammakarzinom. Darstellung der AGR3-Proteinexpression in Brust-Normalgeweben (n=39), prä-invasiven Brustläsionen (DCIS, duktales Karzinom *in situ*, n=9) und invasiven Brusttumoren (n=181) mittels *Box Plot*. Im Median ergab sich eine hochsignifikante Aufregulation der AGR3-Proteinexpression in den invasiven Tumoren im Vergleich zum Normalgewebe. **: $P < 0,01$; ns: nicht signifikant (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest). IRS: immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner [272]. Zahlen innerhalb der Boxen entsprechen dem Median des IRS.

Zusammenfassend konnte mit AGR3 ein potentieller Brustkrebs-Biomarker identifiziert werden, der vor allem die Detektion gut (G1) bis mittelgradig (G2) differenzierter, luminaler Tumoren gewährleisten kann. Seine putative Eignung für die Früherkennung zeigte sich ferner

in einem detektierbaren graduellen Anstieg der AGR3-Proteinexpression in Präkanzerosen, mit einer maximalen Expression in den invasiven Mammakarzinomen im Vergleich zum Normalgewebe.

3.1.1.3.2 Weitere Biomarker-Kandidaten

Die Ergebnisse der semi-quantitativen mRNA-Expressionsanalyse für die Kandidatengene *ASPN*, *CELSRI*, *CTHRC1*, *GREM1* und *NMU* im Mamma-Kryogewebe-Kollektiv (siehe Tabelle 6-1 des Anhangs) sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst. Dargestellt ist der mediane *Fold Change* (FC) der Expression für das jeweilige Gen betrachtet über alle Mammakarzinome sowie nach Gruppierung in die Subtypen Luminal, HER2-positiv und triple-negativer Brustkrebs (TNBC) relativ zur Normalgewebe-Expression.

Tabelle 3-6: Medianer FC der Kandidatengen-mRNA-Expression über alle Tumoren und in IHC-klassifizierten Brustkrebs-Subtypen in Relation zur Normalgewebe-Expression

	n ^a	alle Tumoren ^b	Luminal ^c	HER2-positiv ^c	TNBC ^c
<i>ASPN</i>	62	4,5 (+)**	8,1 (+)***	3,4 (+)	1,4 (-)
<i>CELSRI</i>	62	1,5 (+)	2,6 (+)	3,0 (-)	2,9 (-)
<i>CTHRC1</i>	62	9,2 (+)***	11,0 (+)***	9,7 (+)	3,9 (+)*
<i>GREM1</i>	37	1,6 (+)	2,2 (+)	k.A.	1,2 (-)
<i>NMU</i>	62	1,2 (+)	1,7 (-)	3,0 (+)	3,5 (+)

^aAnzahl analysierter Mammakarzinome. ^bSignifikanz nach zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test. **: P < 0,01; ***: P < 0,001. ^cSignifikanz nach zweiseitigem Dunn's multiplem Vergleichstest. *: P < 0,05; ***: P < 0,001. (+): aufreguliert in Gruppe, (-): herabreguliert in Gruppe relativ zur medianen Normalgewebe-Expression (n=13); FC: *Fold Change*, TNBC: triple-negativer Brustkrebs, k.A.: keine Angabe aufgrund zu geringer Probenanzahl

Als weiterer vielversprechender Kandidat neben AGR3 stellte sich das Gen *ASPN* heraus, dessen Expression über alle analysierten Mammakarzinome betrachtet hochsignifikant (P < 0,01) um einen Faktor von 4,5 im Median gegenüber der Normalgewebe-Expression aufreguliert war, zudem eine deutliche Assoziation mit dem luminalen Subtypen (medianer FC gegenüber dem Normalgewebe: 8,1; P < 0,001) aufwies (Tabelle 3-6). Die Assoziation zwischen einer erhöhten *ASPN*-Expression mit Mammakarzinomen des luminalen Subtyps wurde mittels exaktem Fisher-Test am oben erwähnten Kryogewebe-Kollektiv sowie durch Analyse des unabhängigen *in silico*-Mammakarzinom-Kollektivs (siehe Abschnitt 2.1.4) bestätigt (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8). Als bedeutsam für eine potentielle Nutzung als Früherkennungsmarker stellte sich die signifikante Assoziation einer erhöhten *ASPN*-

Expression mit pT1-Tumoren in beiden unabhängigen Kollektiven (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8) heraus.

Das Gen *CTHRC1* wies die stärkste Überexpression aller analysierten Kandidaten auf, sowohl bei Betrachtung der Gesamtheit der Mammakarzinome (medianer FC: 9,2; $P < 0,001$) als auch innerhalb der einzelnen Brustkrebs-Subtypen (medianer FC $\geq 3,9$) gegenüber den Normalgeweben (Tabelle 3-6) und stellte somit einen aussichtsreichen Kandidaten dar.

Als potentieller Marker für nicht-luminale Tumoren erwies sich das Gen *NMU*, dessen stärkste Expression in den HER2-positiven und triple-negativen Mammakarzinomen verzeichnet wurde (medianer FC gegenüber der Normalgewebe-Expression: 3,0 und 3,5; Tabelle 3-6). Die mittels exaktem Test nach Fisher herausgestellte signifikante positive Korrelation zwischen *NMU*-Expression und negativem Östrogen- sowie Progesteronrezeptor-Status beziehungsweise positivem HER2-Status, bestätigte die obige Feststellung (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8).

Für den Kandidaten *CELSRI* zeigte sich eine relativ geringe Aufregulation der Expression in den Brusttumoren gegenüber der Normalgewebe-Expression (medianer FC: 1,5; Tabelle 3-6). Die Subgruppenanalyse verdeutlichte eine verstärkte *CELSRI*-Expression im luminalen Subtypen (medianer FC gegenüber Normalgewebe-Expression: 2,6; Tabelle 3-6). Die Assoziation zwischen erhöhter *CELSRI*-Expression und dem luminalen Brustkrebs-Subtypen konnte durch den Nachweis einer hochsignifikanten positiven Korrelation der *CELSRI*-Expression mit positivem Östrogen- sowie Progesteronrezeptor-Status belegt werden (für alle $P < 0,001$; Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8). Von besonderer Relevanz im Hinblick auf eine potentielle Nutzung als Früherkennungsmarker stellte sich eine signifikante Assoziation der *CELSRI*-Expression mit pT1-Tumoren und einem insgesamt niedrigeren Tumorstadium heraus (Tabelle 3-8, für beide $P < 0,05$).

Aufgrund der nur geringen Tumor-spezifischen Aufregulation der mRNA-Expression wurden die Kandidatengene *CELSRI* und *GREM1* (siehe Tabelle 3-6) für nachfolgende Analysen auf Proteinebene nicht weiter berücksichtigt.

Tabelle 3-7: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des Kryogewebe-Kollektivs^a mit mRNA-Expressionsdaten für die Kandidatengene *ASPEN*, *CELSRI*, *CTHRC1*, *GREM1* und *NMU*

Parameter	<i>ASPEN</i> ^b [nN; nH (H [%])]	<i>CELSRI</i> ^b [nN; nH (H [%])]	<i>CTHRC1</i> ^b [nN; nH (H [%])]	<i>GREM1</i> ^b [nN; nH (H [%])]	<i>NMU</i> ^b [nN; nH (H [%])]
Alter;					
Median: 63,5 Jahre					
<63,5 Jahre	13; 18 (58,1)	18; 13 (41,9)	17; 14 (45,2)	8; 9 (52,9)	14; 17 (54,8)
≥63,5 Jahre	18; 13 (41,9)	13; 18 (58,1)	14; 17 (54,8)	11; 7 (45,0)	17; 14 (45,2)
Tumorgroße^c					
pT1	13; 22 (62,9)	16; 19 (54,3)	16; 19 (54,3)	8; 11 (57,9)	21; 14 (40,0)
pT2-3	18; 9 (33,3)*	15; 12 (44,4)	15; 12 (44,4)	11; 7 (38,9)	10; 17 (63,0)
Lymphknoten-Status^c					
pN0	18; 16 (47,1)	17; 17 (50,0)	17; 17 (50,0)	12; 9 (42,9)	18; 16 (47,1)
pN1-3	12; 15 (55,6)	14; 13 (48,1)	13; 14 (51,9)	7; 8 (53,3)	13; 14 (51,9)
Histologischer Tumorgrad^d					
G1-2	6; 17 (73,9)	6; 17 (73,9)	9; 14 (60,9)	5; 9 (64,3)	14; 9 (39,1)
G3	24; 14 (36,8)**	25; 13 (34,2)**	22; 16 (42,1)	14; 9 (39,1)	17; 21 (55,3)
Histologischer Subtyp					
invasiv-duktral	27; 28 (50,9)	28; 27 (49,1)	27; 28 (50,9)	15; 18 (54,5)	27; 28 (50,9)
invasiv-lobulär	2; 3 (60,0)	2; 3 (60,0)	2; 3 (60,0)	2; 0 (0,0)	3; 2 (40,0)
Östrogenrezeptor-Status					
negativ (IRS 0-2) ^e	17; 1 (5,6)	17; 1 (5,6)	10; 8 (44,4)	10; 2 (16,7)	3; 15 (83,3)
positiv (IRS 3-12) ^e	13; 29 (69,0)***	14; 28 (66,7)***	20; 22 (52,4)	8; 15 (65,2)*	27; 15 (33,3)**
Progesteronrezeptor-Status					
negativ (IRS 0-2) ^e	16; 4 (20,0)	18; 2 (10,0)	13; 7 (35,0)	8; 4 (33,3)	4; 16 (80,0)
positiv (IRS 3-12) ^e	13; 26 (66,7)**	13; 26 (66,7)***	16; 23 (59,0)	9; 13 (59,1)	26; 13 (33,3)**
HER2-Status^f					
negativ	27; 26 (49,1)	25; 28 (52,8)	27; 26 (49,1)	14; 17 (54,8)	29; 24 (45,3)
positiv	3; 5 (62,5)	6; 2 (25,0)	3; 5 (62,5)	4; 1 (20,0)	1; 7 (87,5)

^aWeibliche Patienten mit primärem, unilateralem, invasivem Mammakarzinom (n=62). ^bDie Expression aller Tumor-Proben wurde auf die mediane Zielgen-Expression der Normalgewebe normiert. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Die Dichotomisierung der relativen Expressionsdaten erfolgte jeweils am Median. nN: Anzahl Tumoren mit niedriger Zielgen-Expression; nH: Anzahl Tumoren mit hoher Zielgen-Expression; H[%]: Prozentualer Anteil der Tumoren mit hoher Zielgen-Expression in Relation zur analysierten Gesamtprobenzahl. ^cGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [20]. ^dGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston

und Ellis [19]. ^eImmunreaktiver *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^fÜberexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-*Score*-System diagnostiziert. Zweifelhafte (DAKO-IHC: 2+) Fälle wurden zusätzlich mittels FISH-Analyse auf Amplifikation des Gens hin analysiert. Signifikante Korrelationen ($P < 0,05$) beruhend auf exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) sind durch Fettdruck hervorgehoben.*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabelle 3-8: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des *in silico*-Datensatzes^a mit mRNA-Expressionsdaten für die Kandidatengene *ASPN*, *CELSRI*, *CTHRC1* und *NMU*

Parameter	<i>ASPN</i> ^b [nN; nH (H%)]	<i>CELSRI</i> ^b [nN; nH (H%)]	<i>CTHRC1</i> ^b [nN; nH (H%)]	<i>NMU</i> ^b [nN; nH (H%)]
Alter;				
Median: 58 Jahre				
<58 Jahre	239; 261 (52,2)	270; 230 (46,0)	241; 259 (51,8)	227; 273 (54,6)
≥58 Jahre	253; 230 (47,6)	223; 260 (53,8)*	253; 230 (47,6)	267; 216 (44,7)**
Tumorgroße^c				
pT1	106; 147 (58,1)	112; 141 (55,7)	115; 138 (54,5)	136; 117 (46,2)
pT2-4	377; 328 (46,5)**	366; 339 (48,1)*	366; 339 (48,1)	345; 360 (51,1)
Lymphknoten-Status^c				
pN0	235; 216 (47,9)	235; 216 (47,9)	233; 218 (48,3)	210; 241 (53,4)
pN1-3	240; 253 (51,3)	238; 255 (51,7)	240; 253 (51,3)	261; 232 (47,1)
Fernmetastasierung^c				
pM0	427; 410 (49,9)	428; 409 (48,9)	426; 411 (49,1)	425; 412 (49,2)
pM1	6; 9 (60,0)	9; 6 (40,0)	4; 11 (73,3)	7; 8 (53,3)
Tumor-Stadium^c				
Stadium 1	73; 88 (54,7)	69; 92 (57,1)	80; 81 (50,3)	89; 72 (44,7)
Stadium 2-4	406; 375 (48,0)	403; 378 (48,3)*	397; 384 (49,2)	387; 394 (50,4)
Östrogenrezeptor-Status				
negativ (IRS 0-2) ^d	129; 46 (26,3)	162; 13 (7,4)	87; 88 (50,3)	36; 139 (79,4)
positiv (IRS 3-12) ^d	246; 346 (58,4)***	220; 372 (62,8)***	289; 303 (51,2)	347; 245 (41,4)***
Progesteronrezeptor-Status				
negativ (IRS 0-2) ^d	169; 80 (32,1)	199; 50 (20,1)	125; 124 (49,8)	72; 177 (71,1)
positiv (IRS 3-12) ^d	203; 312 (60,6)***	181; 334 (64,9)***	248; 267 (51,8)	310; 205 (39,8)***
HER2-Status^e				
negativ	316; 322 (50,5)	302; 336 (52,7)	329; 309 (48,4)	337; 301 (47,2)
positiv	47; 67 (58,8)	66; 48 (42,1)*	40; 74 (64,9)**	48; 66 (57,9)*

^aWeibliche Patienten mit Mammakarzinom (n=993). ^bDie Dichotomisierung der relativen RNA-Expressionsdaten erfolgte jeweils am Median. nN: Anzahl Tumoren mit niedriger Zielgen-Expression; nH: Anzahl Tumoren mit hoher Zielgen-Expression; H%: Prozentualer Anteil der Tumoren mit hoher Zielgen-Expression in Relation zur analysierten Gesamtprobenzahl. ^cGemäß TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [20]. ^dImmunreaktiver *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^eÜberexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-*Score*-System diagnostiziert. Zweifelhafte (DAKO-IHC: 2+) Fälle wurden zusätzlich mittels FISH-Analyse auf Amplifikation des Gens hin analysiert. Signifikante Korrelationen ($P < 0,05$) beruhend auf exaktem Test nach Fisher (zweiseitig) sind durch Fettdruck hervorgehoben. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$. k.A.: keine Angabe.

Für den Biomarker-Kandidaten ASPN konnte, in Übereinstimmung mit seiner beschriebenen Rolle als Kollagen-bindendes Protein [274], eine auf die extrazelluläre Matrix (EZM) beschränkte immunhistochemische Färbung in Normal- und Tumorgewebe der Brust beobachtet werden (Abbildung 3-6A und B).

Für CTHRC1 zeigte sich eine mäßig bis starke zytoplasmatische Anfärbbarkeit des Epithels und stromaler Zellen sowohl im Normalgewebe der Brust als auch im Mammakarzinom. Hingegen wurde eine auffällige Zunahme von CTHRC1-Protein in der Tumor-assoziierten im Vergleich zur EZM des Normalgewebes verzeichnet (Abbildung 3-6C und D).

Eine verlässliche Aussage hinsichtlich einer Tumor-spezifischen Aufregulation, wie nach den mRNA-Daten für *ASPN* und *CTHRC1* erwartet (siehe Tabelle 3-6), ließ sich für beide Proteine anhand immunhistochemischer Färbungen nicht treffen. Zwecks besserer Quantifizierbarkeit der Expression wurden die gleichen Antikörper für ASPN und CTHRC1 im Western Blot für die Analyse von Gewebelysaten genutzt (Abbildung 3-7). Zwar ließ sich eine teils starke spezifische Expression beider Proteine in den analysierten Mammakarzinom-Proben nachweisen, jedoch konnte auch hier aufgrund nur eines für Western Blot-Analysen zur Verfügung stehenden Normalgewebes keine verlässliche Quantifizierung vorgenommen werden.

Der Nachweis überwiegend zytoplasmatisch lokalisierten, endogenen NMU-Proteins im Normal- und Tumorgewebe der Brust konnte nur in wenigen Fällen mit sehr starker *NMU*-mRNA-Expression erbracht werden, so dass eine Quantifizierung der Proteinexpression in Normal- und Tumorproben nicht möglich war. Im analysierten Gewebe wurde eine die mRNA-Daten unterstützende, gesteigerte NMU-Proteinexpression in epithelialen Krebszellen eines triple-negativen Mammakarzinoms im Vergleich zum Tumor-assoziierten Normalepithel der Brust nachgewiesen (Abbildung 3-6E und F). Die ektopische NMU-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien erlaubte unter Verwendung des gleichen Antikörpers den

spezifischen Western Blot-Nachweis von NMU-Protein (siehe Abbildung 3-31). Hingegen war die Detektion endogenen Proteins in Gewebelysaten nur in wenigen Einzelfällen möglich.

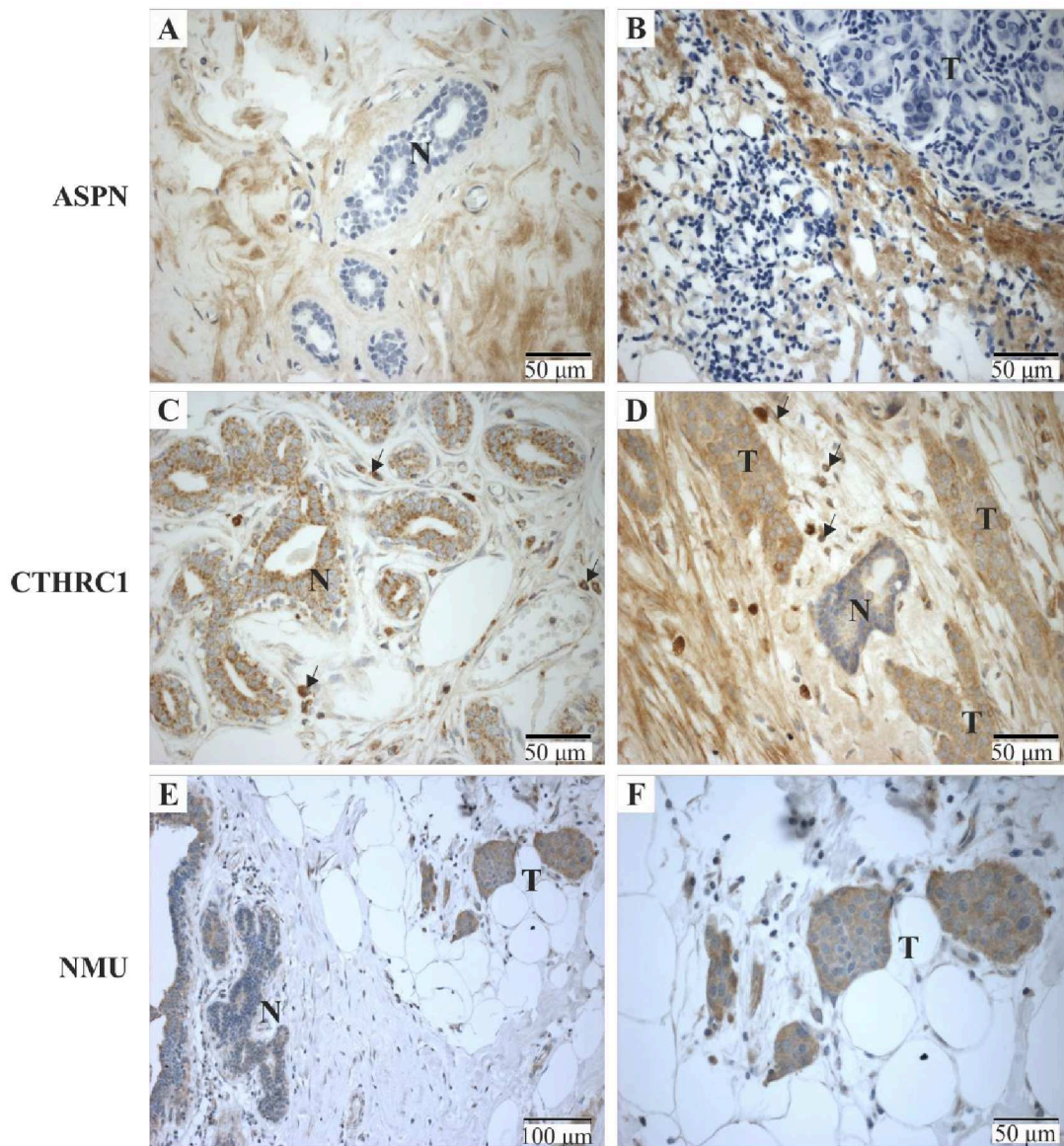


Abbildung 3-6: Charakterisierung der Proteinexpression der Biomarker-Kandidaten ASPN, CTHRC1 und NMU in humanem Normal- und Tumorgewebe der Brust. Auf die extrazelluläre Matrix (EZM) beschränkte ASPN-Expression in (A) Brust-Normalgewebe und (B) einem IHC-klassifizierten luminalen Mammakarzinom. Normal (N)- und Tumor (T)-Epithel zeigten keine Expression. (C) Mäßig bis starke zytoplasmatische CTHRC1-Expression im normalen Brustepithel (N) und assoziierten stromalen Zellen (Pfeile) sowie Detektion einer schwachen Färbung der umgebenden EZM. (D) Starke Zunahme der CTHRC1-Anfärbbarkeit in der Tumor-assoziierten EZM im Vergleich zu der des Normalgewebes in C. Mäßig bis starke zytoplasmatische Expression in epithelialen Krebszellen (T) des IHC-klassifizierten luminalen Subtyps sowie stromalen Zellen (Pfeile). Schwache Färbung im Tumor-assoziierten Normalepithel (N). (E und F) Schwache zytoplasmatische Färbung im Tumor-assoziierten normalen Brustepithel (N), hingegen gesteigerte NMU-Expression in epithelialen Krebszellen (T) eines triple-negativen Mammakarzinoms.

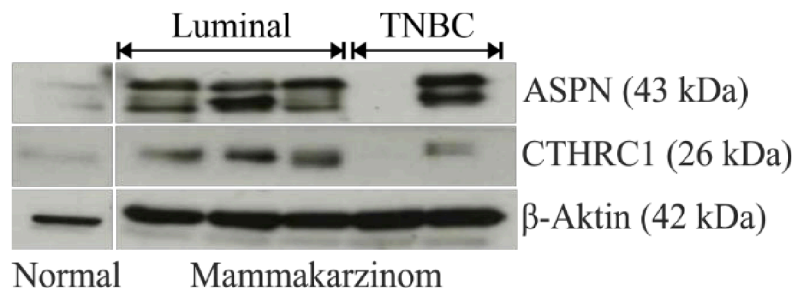


Abbildung 3-7: Proteinexpression von ASPN und CTHRC1 in humanem Normal- und Tumorgewebe der Brust. Western Blot-Nachweis von ASPN und CTHRC1 in Gewebelysaten der normalen Brust und Mammakarzinom-Proben. Als Ladekontrolle fungierte β -Aktin. TNBC: Triple-negativer Brustkrebs.

3.1.2 Zweite Stufe: Validierung potentieller Serumbiomarker im humanen Serum

Die Auswahl vielversprechender potentieller Serumbiomarker für eine Validierung an humanen Serumproben erfolgte auf Grundlage 1. der festgestellten Stärke (*Fold Change*) der Aufregulation in Brusttumor- gegenüber Normalgeweben, 2. Korrelationen der Expression mit für die Früherkennung wichtigen Indikatoren eines frühen Tumorstadiums, sowie 3. unter Berücksichtigung der Abdeckung aller molekularen Brustkrebs-Subtypen zwecks Erzielung maximal möglicher klinischer Spezifität und Sensitivität eines angestrebten Biomarker-*Panels*.

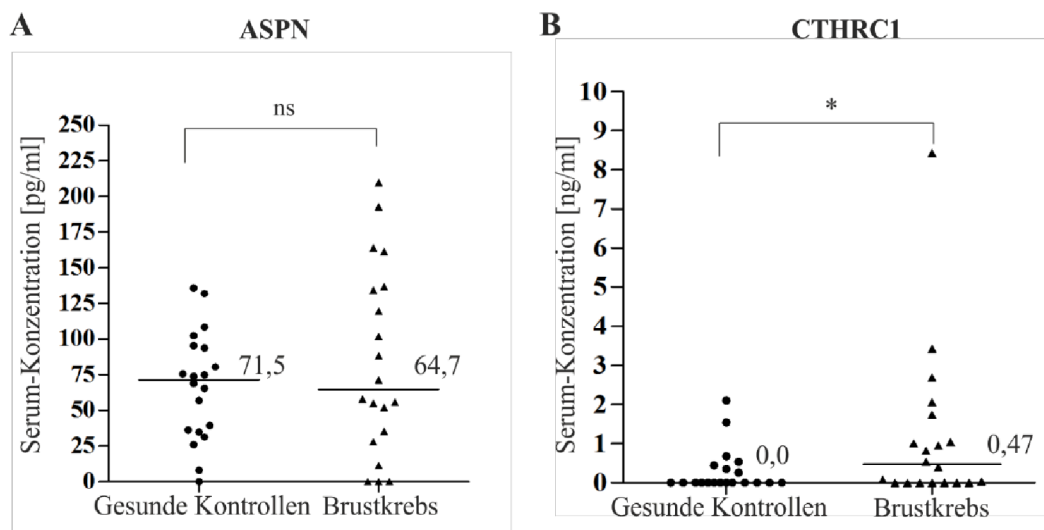


Abbildung 3-8: Protein-Konzentrationen der Biomarker-Kandidaten ASPN und CTHRC1 im Blutserum von Brustkrebs-Patientinnen und gesunden Spenderinnen. *Scatter Plot*-Darstellung der Konzentrationen der Biomarker-Kandidaten (A) ASPN und (B) CTHRC1 im Serum von Brustkrebs-Patientinnen (n=20) und gesunden Spenderinnen als Kontrollgruppe (n=20). *: $P < 0,05$; ns: nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig). Horizontale Linien: Median der Konzentration für die jeweilige Gruppe. Die mediane Konzentration der jeweiligen Gruppe ist in der Abbildung dargestellt.

In einem Vorversuch wurde zunächst der qualitative Nachweis der Biomarker-Kandidaten AGR3, ASPN und CTHRC1 in Serumalbumin (HSA)- und Immunglobulin G (IgG)-abgereicherten humanen Serumsproben angestrebt (siehe Abschnitt 2.16.6), welcher jedoch nicht erbracht werden konnte.

Der quantitative Nachweis sollte schließlich mithilfe der sensitiven *Sandwich-ELISA*-Technik erfolgen (siehe Abschnitt 2.16.14). Dazu wurde ein Serum-Kollektiv aus 48 Brustkrebs-assoziierten Seren (überwiegend frühes Tumorstadium) sowie Seren gesunder Spenderinnen als Kontrollgruppe etabliert. Beide Gruppen wiesen ein medianes Alter von 59,5 Jahren auf (mittleres Alter: 60,8 Jahre (Normal-Seren); 60,9 Jahre (Brustkrebs-assoziierte Seren)). Die klinisch-pathologischen Parameter der Tumor-assoziierten Seren sind in Tabelle 6-3 des Anhangs dargestellt.

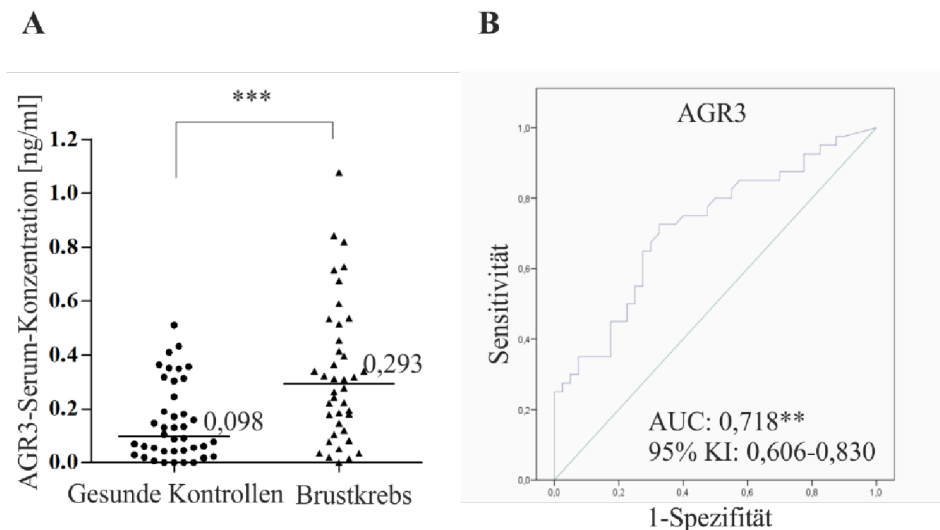


Abbildung 3-9: Evaluierung der Biomarker-Effizienz für den Kandidaten AGR3. (A) *Scatter Plot*-Darstellung der AGR3-Proteinkonzentration im Blutserum von Brustkrebs-Patientinnen (n=40) und gesunden Spenderinnen als Kontrollgruppe (n=40). Es zeigte sich eine hochsignifikant erhöhte AGR3-Konzentration im Serum von Brustkrebs-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. ***: $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig). Horizontale Linien und Werte: Mediane Konzentration der jeweiligen Gruppe. (B) Bestimmung der Biomarker-Effizienz (Sensitivität/Spezifität) für den Kandidaten AGR3 mittels *ROC (Receiver Operating Characteristic)*-Analyse. Dargestellt ist eine *ROC*-Kurve (blau) mit einer Diskriminierungsstärke (*AUC*, *Area Under Curve*) von 0,718 (**: $P < 0,01$). Die diagonale Linie (grün) veranschaulicht eine *AUC* von 0,5, bei der keine Diskriminierung von Test- und Kontrollgruppe möglich ist. Abhängig vom definierten Schwellenwert für die AGR3-Serum-Konzentration weist die *ROC*-Kurve einem bestimmten Spezifitäts- einen korrespondierenden Sensitivitätswert zu: ein Schwellenwert für die AGR3-Konzentration von 0,51 ng/ml definierte bei einer Spezifität von 100%, eine Sensitivität von 25%. KI: Konfidenzintervall.

Für den Kandidaten ASPN zeigte sich eine nicht-differentielle Konzentration des Proteins in Brustkrebs-assoziierten Seren (n=20, mediane Konzentration: 64,7 pg/ml) im Vergleich zu

gesunden Kontrollen (n=20, mediane Konzentration: 71,5 pg/ml) (Abbildung 3-8A). Hingegen lag eine statistisch signifikant ($P < 0,05$) erhöhte CTHRC1-Proteinkonzentration in den Brustkrebs-assoziierten Seren (n=20, mediane Konzentration: 0,47 ng/ml) im Vergleich zur Kontrollgruppe vor (n=20, mediane Konzentration: 0,0 ng/ml) (Abbildung 3-8B). Da der überwiegende Anteil der gemessenen Konzentrationen an der unteren Grenze des Detektionslimits für den genutzten Assay lag, wurde auch die Analyse des Kandidaten CTHRC1 nicht an weiteren Seren des Kollektivs fortgesetzt.

Für AGR3 konnte eine hochsignifikant erhöhte Konzentration in den Brustkrebs-assoziierten Seren (n=40) im Vergleich zu den Kontrollen gesunder Spenderinnen (n=40) ermittelt werden ($P < 0,001$; medianer FC: 3,0; Abbildung 3-9A). Die Evaluierung der Effizienz von AGR3 als putativer Serumbiomarker für die Brustkrebs-Detektion, erfolgte mittels ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Analyse. Die Definition des Schwellenwertes für die AGR3-Serum-Konzentration (0,51 ng/ml), bei dessen Erreichen vom Vorliegen einer Brustkrebserkrankung ausgegangen wird, erfolgte unter Berücksichtigung der Erzielung maximaler klinischer Spezifität (Richtig-Negativ-Rate). Die Definition erlaubte die Diskriminierung von Brustkrebs-Patientinnen und gesunden Spenderinnen mit einer klinischen Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) von 25% bei 100% Spezifität ($P < 0,01$; AUC: 0,718; 95% KI: 0,606 bis 0,830) (Abbildung 3-9B).

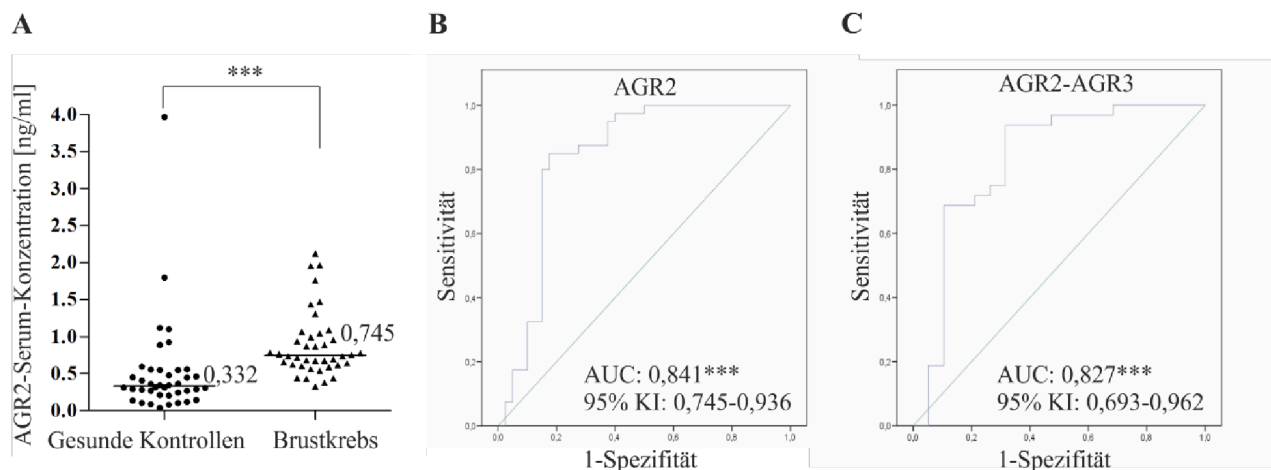


Abbildung 3-10: Evaluierung der Effizienz des Biomarker-Kandidaten AGR2 und des AGR2-AGR3-Biomarker-Dupletts. (A) *Scatter Plot*-Darstellung der AGR2-Proteinkonzentration im Serum von Brustkrebs-Patientinnen (n=40) und gesunden Spenderinnen als Kontrollgruppe (n=40). Es zeigte sich eine hochsignifikant erhöhte AGR2-Konzentration im Serum von Brustkrebs-Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. ***: $P < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig). Horizontale Linien und Werte: mediane Konzentration der jeweiligen Gruppe. (B und C) Bestimmung der Effizienz (Sensitivität/Spezifität) für den Biomarker-Kandidaten AGR2 sowie des AGR2-AGR3-Biomarker-Dupletts mittels ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Analyse. Dargestellt ist die jeweilige ROC-Kurve (blau) mit einer Diskriminierungsstärke (AUC, *Area Under Curve*) für AGR2 von 0,841 (***: $P < 0,001$) und des AGR2-AGR3-Dupletts von 0,827 (***: $P < 0,001$). Die jeweilige diagonale Linie

(grün) veranschaulicht eine *AUC* von 0,5, bei der keine Diskriminierung von Test- und Kontrollgruppe möglich ist. Abhängig vom definierten Schwellenwert für die AGR2- bzw. die gemittelte Konzentration von AGR2 und AGR3 in einer Probe (19 Kontroll-, 32-Brustkrebs-Seren) weist die *ROC*-Kurve einem bestimmten Spezifitäts-, einen korrespondierenden Sensitivitätswert zu: ein Schwellenwert für die AGR2-Konzentration von 1,88 ng/ml definierte bei einer Spezifität von 97,5% eine Sensitivität von 7,5%. Ein Schwellenwert für die gemittelte AGR2-AGR3-Konzentration von 0,48 ng/ml definierte bei einer Spezifität von 89,5% eine Sensitivität von 64,5%. KI: Konfidenzintervall.

Mit dem Hintergrund die klinische Sensitivität der Serum-basierten Brustkrebs-Detektion weiter zu steigern, erfolgte die Fokussierung auf einen zusätzlichen Biomarker-Kandidaten, namentlich AGR2. Das wahrscheinliche Paralog von AGR3 [113] wurde bereits als möglicher Serumbiomarker für das Ovarial-[109], Lungen-[123] und Prostatakarzinom [124] beschrieben. Trotz der bekannten starken Aufregulation der AGR2-Expression im Brustkrebs im Vergleich zum Brust-Normalgewebe und seiner wahrscheinlichen Sezernierung [112] wurde das Biomarker-Potential von AGR2 für das humane Mammakarzinom noch nicht untersucht. Unter Verwendung eines etablierten ELISA-Assays [124, 275] wurde die AGR2-Konzentration in 40 altersgematchten Serum-Paaren ermittelt. Es zeigte sich eine hochsignifikante Erhöhung der AGR2-Konzentration im Serum von Brustkrebs-Patientinnen im Vergleich zu den Kontroll-Seren ($P < 0,001$; medianer FC: 2,2; Abbildung 3-10A).

Basierend auf den Ergebnissen der ROC-Analyse erlaubte die Festlegung eines Schwellenwertes für die AGR2-Serum-Konzentration von 1,88 ng/ml eine Diskriminierung von Brustkrebs-Patientinnen und gesunden Frauen mit einer klinischen Sensitivität von 7,5% bei maximal möglicher Spezifität von 97,5% ($P < 0,001$; *AUC*: 0,841; 95% KI: 0,606 bis 0,830) (Abbildung 3-10B). Die Kombination der beiden putativen Biomarker AGR2 und AGR3, durch Bestimmung ihrer gemittelten Konzentration in den analysierten Seren (19 Kontroll- und 32 Brustkrebs-assoziierte Seren) zu einem Biomarker-Duplett, resultierte bei Definition des Schwellenwertes für die gemittelte AGR2-AGR3-Serumkonzentration von 0,48 ng/ml in einer deutlichen Erhöhung der klinischen Sensitivität auf 64,5% bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung einer hohen klinischen Spezifität von 89,5% ($P < 0,001$; *AUC*: 0,827; KI: 0,693 bis 0,962) (Abbildung 3-10C).

Gegen die als aussichtsreiche putative Biomarker für die Brustkrebs-Früherkennung identifizierten Kandidaten AGR2 und AGR3 sollten im Rahmen des MicroBioMed-Projektes schließlich monoklonale Antikörper durch Kooperationspartner (Fraunhofer-IME, Institut für Molekularbiologie und Angewandte Ökologie, Aachen) generiert, um letztlich in das angestrebte mikrofluide Chip-System für die Brustkrebs-Diagnostik integriert zu werden. Dazu wurde die AGR3- bzw. AGR2-Volllängen-cDNA (ohne Terminations-Codon) in einen Vektor

mit Hexa-Histidin-*Tag* kloniert, der von den Kooperationspartnern für die Erzeugung rekombinanten Proteins für die Immunisierung von Wirtstieren zwecks Antikörper-Produktion genutzt werden sollte. Die vollständige Klonierungsstrategie ist im Abschnitt 2.15.9 dargestellt.

3.2 Prognostische und funktionelle Relevanz ausgewählter Kandidaten für das Mammakarzinom

Die im Rahmen des MicroBioMed-Projektes ursprünglich als potentielle Brustkrebs-Früherkennungsmarker identifizierten Kandidaten sollten in der vorliegenden Arbeit zusätzlich hinsichtlich ihrer putativen prognostischen Nutzbarkeit sowie ihrer möglichen Bedeutung für Entstehung und Progression des humanen Mammakarzinoms untersucht werden.

3.2.1 Der Kandidat AGR3

Die potentielle klinische Relevanz von AGR3 als prognostischer Marker für das humane Mammakarzinom sowie seine putative funktionelle Bedeutung hinsichtlich Entstehung und Progression der Brustkrebserkrankung sind bisher nicht untersucht worden. Das homologe Protein AGR2 ist hingegen als ein das Tumor-Zellwachstum und die -Progression fördernder Faktor im Brustkrebs und anderen Entitäten beschrieben [99] und wird zudem als prognostischer Marker für einen ungünstigen Verlauf des humanen Mammakarzinoms [118, 119] diskutiert.

3.2.1.1 AGR3 ist ein prognostischer Faktor für einen ungünstigen Verlauf des gut bis mittelgradig differenzierten Mammakarzinoms

Die Untersuchung einer potentiellen prognostischen Relevanz von AGR3 für das humane Mammakarzinom erfolgte durch Färbung eines 190 Brustkrebsfälle umfassenden *Tissue Microarrays* mit zugehörigen Überlebensdaten. Die klinisch-pathologischen Parameter des Kollektivs sind in Tabelle 6-2 des Anhangs zusammengefasst. Die Dichotomisierung nach Proteinexpressionsstärke für AGR3 erfolgte am Median des nach Remmele und Stegner [272] berechneten immunreaktiven *Scores* (IRS) in die Gruppen „AGR3 niedrig“ (IRS 0-4) und „AGR3 hoch“ (IRS 6-12). Für die univariate Überlebensanalyse wurde der Log-Rank-Test entsprechend der Kaplan-Meier-Methode angewendet.

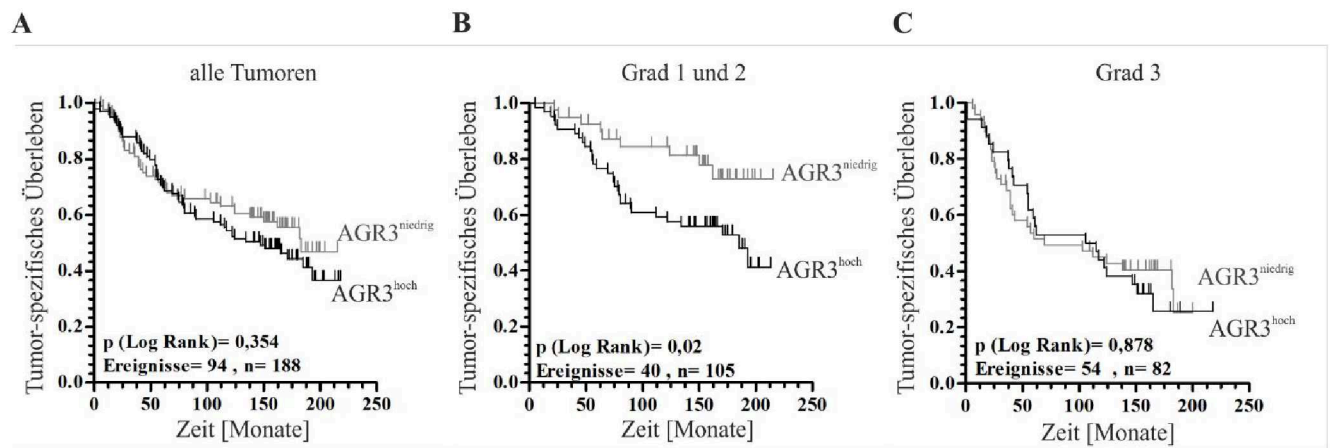


Abbildung 3-11: Eine erhöhte AGR3-Proteinexpression in Grad 1/2-Brustkrebs-Fällen ist mit einem verringerten Tumor-spezifischen Überleben assoziiert. Univariate Kaplan-Meier-Überlebenskurven illustrieren das Tumor-spezifische Überleben von Patientinnen mit niedriger (graue Kurven) in Relation zu Patientinnen mit hoher AGR3-Proteinexpression (schwarze Kurven) in (A) allen Mammakarzinomen, (B) Grad 1/2, sowie (C) Grad 3-Brusttumoren. Die Dichotomisierung der AGR3-Proteinexpression erfolgte am Median des immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner [272] : „AGR3 niedrig“ (IRS = 0-4), „AGR3 hoch“ (IRS = 6-12). Vertikale Linien: zensierte Fälle.

Tabelle 3-9: Univariate Analyse klinisch-pathologischer Parameter in Grad^a 1/2-Brusttumoren im Hinblick auf das Tumor-spezifische Überleben

Parameter	Kategorisierung	Tumor-spezifisches Überleben		
		n	Ereignisse	P-Wert ^b
AGR3-Proteinexpression ^c				
	AGR3 ^{niedrig}	40	9	0,02
	AGR3 ^{hoch}	64	31	
Alter bei Diagnosestellung				
	<54,5 Jahre	52	13	0,002
	≥54,5 Jahre	52	27	
Tumorgroße ^d				
	pT1	44	8	<0,001
	pT2-4	59	31	
Lymphknoten-Status ^d				
	pN0	53	14	0,016
	pN1-3	47	22	
Histologischer Subtyp				
	invasiv-duktral	92	35	0,165
	invasiv-lobulär	5	3	
Östrogenrezeptor-Status				
	negativ (IRS ^e 0-2)	15	6	0,636
	positiv (IRS ^e 3-12)	59	21	
Progesteronrezeptor-Status				
	negativ (IRS ^e 0-2)	45	20	0,108
	positiv (IRS ^e 3-12)	39	12	
HER2-Status ^f				
	negativ (0; 1+; 2+)	75	31	0,270
	positiv (3+)	12	2	

^aGemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [19]. ^bLog-Rank Test mit zweiseitigem Signifikanzniveau von P < 0,05. ^cDichotomisierung am medianen immunreaktiven Score (IRS) nach Remmele und Stegner [272]: „AGR3 niedrig“ (IRS = 0-4), „AGR3 hoch“ (IRS = 6-12).

^dNach TNM-Klassifikation gemäß Sobin und Wittekind [20]. ^eImmunreaktiver *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^fÜberexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-Score-System diagnostiziert. Signifikante P-Werte ($P < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Bei Betrachtung aller Brustkrebs-Fälle konnte kein signifikanter Einfluss der AGR3-Proteinexpression auf das Tumor-spezifische Überleben festgestellt werden (Abbildung 3-11A). Nach Subgruppierung der Patienten-Kohorte war jedoch innerhalb der gut (G1) bis mittelgradig (G2) differenzierten Mammakarzinome, in welchen AGR3 stark exprimiert wird (siehe Abbildung 3-4G), ein signifikanter ($P < 0,05$) prognostischer Effekt der AGR3-Proteinexpression auf das Tumor-spezifische Überleben ersichtlich (Abbildung 3-11B und Tabelle 3-9). Die isolierte Analyse der schlecht differenzierten (G3) Brusttumoren ließ hingegen keinen signifikanten Einfluss der AGR3-Expression auf das Tumor-spezifische Überleben erkennen (Abbildung 3-11C). Patientinnen mit gut bzw. mittelgradig differenziertem Mammakarzinom und hoher AGR3-Proteinexpression zeigten ein signifikant verkürztes Tumor-spezifisches Überleben (Mittelwert: $142,5 \pm 9,6$ Monate; 95% KI: 123,8 – 161,2) im Vergleich zu den Fällen mit niedriger AGR3-Expression (Mittelwert: $181,7 \pm 10,1$ Monate; 95% KI: 162,0 – 201,4).

Tabelle 3-10: Multivariates Cox-Regressionsmodell mit allen potentiell das Tumor-spezifische Überleben von Grad^a 1/2-Brusttumoren beeinflussenden Faktoren

Variable	HR	P-Wert	95% KI	
			Untere Grenze	Obere Grenze
AGR3-Proteinexpression ^b				
AGR3 ^{niedrig}	1,000			
AGR3 ^{hoch}	2,186	0,048	1,008	4,740
Tumorgroße ^c				
pT1	1,000			
pT2-4	3,453	0,005	1,455	8,194
Lymphknoten-Status ^c				
pN0	1,000			
pN1-3	1,879	0,087	0,912	3,869
Alter bei Diagnosestellung				
<54,5 Jahre	1,000			
≥54,5 Jahre	2,481	0,011	1,231	4,999

^a Gemäß Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [19]. ^b Dichotomisierung am medianen immunreaktiven *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]: „AGR3 niedrig“ (IRS = 0-4), „AGR3 hoch“ (IRS = 6-12). ^c Nach TNM-Klassifikation gemäß Sobin und Wittekind [20].

Signifikante P-Werte ($P < 0,05$) sind durch Fettdruck hervorgehoben. HR: *Hazard*-Rate; KI: Konfidenzintervall.

Anschließend galt es zu überprüfen, ob der in der univariaten Überlebensanalyse herausgestellte putative prognostische Wert von AGR3 innerhalb der Subgruppe der G1/2-Mammakarzinome unabhängig von bekannten prognostischen Faktoren ist und somit einen eigenständigen Informationsgewinn liefern kann. Dazu wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse unter Einschluss aller Faktoren durchgeführt, die in der univariaten Analyse einen signifikanten Einfluss auf das Tumor-spezifische Überleben innerhalb der Gruppe der G1/G2-Mammakarzinome zeigten (Tabelle 3-10). Das Cox-Regressionsmodell bestätigte die Unabhängigkeit von AGR3 als prognostischer Marker für einen ungünstigen Verlauf gut bis mittelgradig differenzierter Mammakarzinome (multivariate *Hazard*-Rate: 2,186; 95% KI: 1,008 – 4,740; $P < 0,05$).

3.2.1.2 Der Einfluss von AGR3 auf die Koloniebildungsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen

In Anbetracht des herausgestellten unabhängigen prognostischen Wertes von AGR3 in gut bis mittelgradig differenzierten Mammakarzinomen sollte im Folgenden überprüft werden, ob dieser Beobachtung eine biologische Funktion des Proteins AGR3 innerhalb der Karzinogenese dieser Subgruppe des Mammakarzinoms zugrunde liegt. Als geeignetes repräsentatives *in vitro*-Tumormodell für gut bis mittelgradig differenzierte Mammakarzinome wurde die luminal, epithelial-wachsende Brustkrebs-Zelllinie MCF7 ausgewählt [239], welche eine starke endogene AGR3-Proteinexpression aufweist (siehe Abbildung 3-1).

Unter Verwendung eines shRNA-Plasmids für den RNA-Interferenz-vermittelten Expressionsverlust von AGR3 sowie eines Negativkontroll-shRNA-Plasmids, wurden unter Selektionsdruck zwei genetisch stabil-veränderte Zellpools (Gemisch aus Transfektanden, die mit dem gleichen Vektor transfiziert wurden) generiert, deren AGR3-Expression auf RNA- und Proteinebene in Abbildung 3-12A gegenübergestellt ist. Die Untersuchung des Zellwachstums in Abhängigkeit von der AGR3-Expression erfolgte mithilfe eines Koloniebildungstests. Von jeder Versuchsgruppe wurden 1000 Zellen in einer 6-Well-Zellkulturschale in Dreifachbestimmung ausgesät und die Koloniebildung nach 10 Tagen Kultivierung analysiert. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt. Wie bereits makroskopisch erkennbar war, führte der Expressionsverlust von AGR3 im gut differenzierten MCF7-Tumormodell zu einem deutlich reduzierten Koloniewachstum (Abbildung 3-12B). Die

Quantifizierung der qualitativen Beobachtungen mittels densitometrischer Auswertung angefärbter Kolonien, ergab ein im Median um 39,9% hochsignifikant ($P < 0,01$) reduziertes Koloniewachstum infolge des AGR3-Expressionsverlustes gegenüber der Negativkontrolle (Abbildung 3-12C).

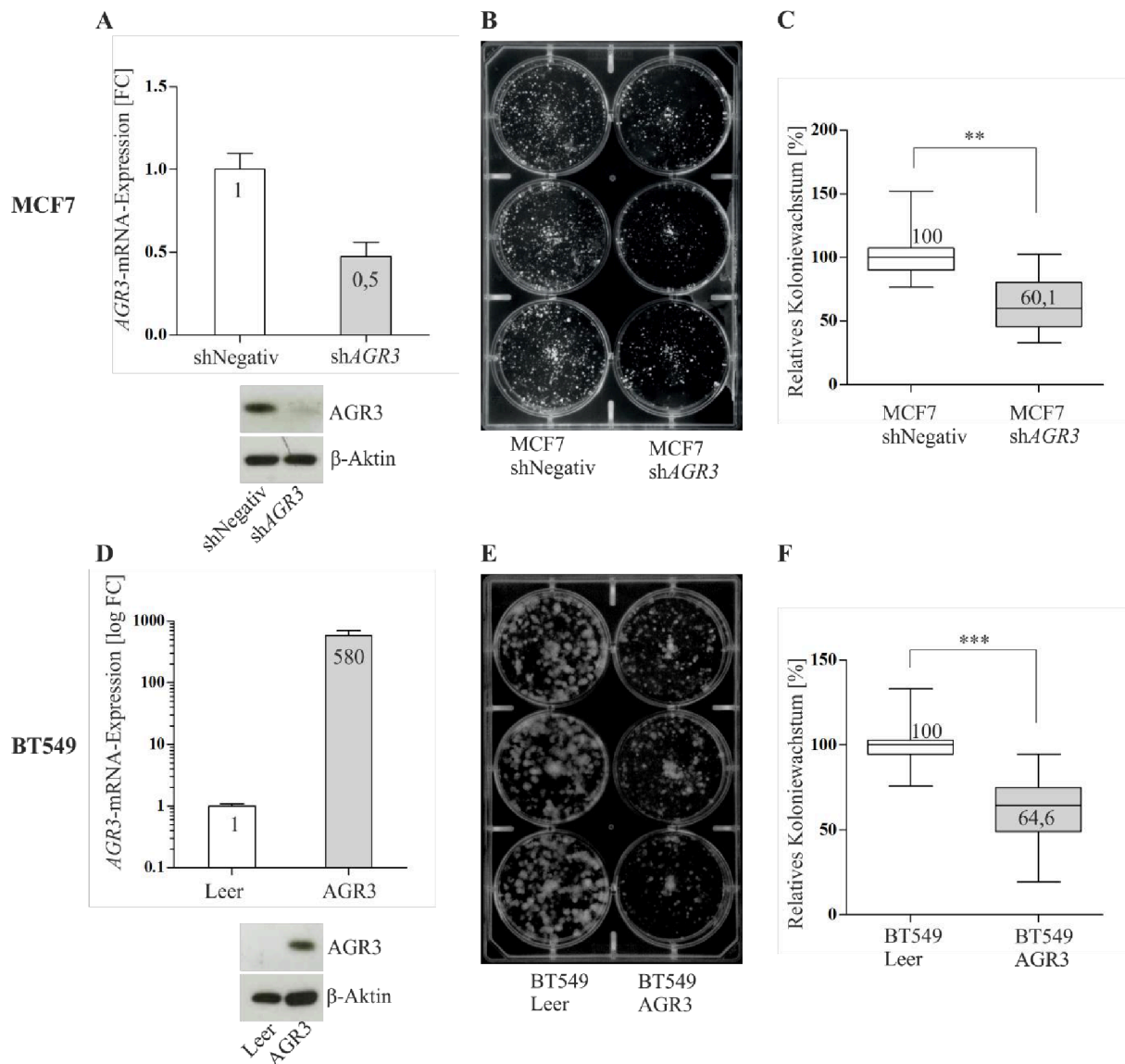


Abbildung 3-12: Einfluss der AGR3-Expression auf das Koloniewachstum der humanen Brustkrebs-Zelllinien MCF7 und BT549. (A) Oben: Vergleich der AGR3-mRNA-Expression stabiler MCF7-Zellpools, transfiziert mit einem Negativkontroll-shRNA-Plasmid (shNegativ) bzw. einem gegen AGR3-mRNA gerichteten shRNA-Plasmid (shAGR3). Die Expression der Kontrollgruppe (shNegativ) wurde gleich 1 gesetzt. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: + SEM der Dreifachbestimmung. Unten: AGR3-Proteinexpression der beiden MCF7-Zellpools. Ladekontrolle: β-Aktin. (B) Repräsentative Aufnahme eines Koloniebildungstests in einer 6-Well-Kulturschale nach 10-tägiger Kultivierung stabiler MCF7-Zellpools in Dreifachbestimmung. (C) Box Plot-Analyse nach densitometrischer Auswertung des Koloniewachstums der beiden Versuchsgruppen. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Normiert wurde auf das mediane Koloniewachstum der Kontrollgruppe (shNegativ). Horizontale Linien: Mediane; vertikale Linien: Minima und Maxima; Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. **: $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig). (D) Oben: AGR3-

mRNA-Expression in stabilen BT549-Zellpools, transfiziert mit einem Leervektor (Leer) bzw. einem AGR3-Überexpressionsvektor (AGR3). Die Expression der Kontrollgruppe (Leer) wurde gleich 1 gesetzt. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: + SEM der Dreifachbestimmung. Unten: AGR3-Proteinexpression der beiden BT549-Zellpools. Ladekontrolle: β -Aktin. (E) Repräsentative Aufnahme eines Koloniebildungstests in einer 6-Well-Kulturschale nach 10-tägiger Kultivierung stabiler BT549-Zellpools in Dreifachbestimmung. (F) *Box Plot*-Analyse nach densitometrischer Auswertung des Koloniewachstums der beiden Versuchsgruppen. Insgesamt wurden fünf unabhängige Versuche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Normiert wurde auf das mediane Koloniewachstum der Kontrollgruppe (Leer). Horizontale Linien: Mediane; vertikale Linien: Minima und Maxima; Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. ***: $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig).

Zusätzlich wurde unter Verwendung der Mammakarzinom-Zelllinie BT549 des basalen Subtyps [239] ein genetisch stabil-verändertes AGR3-Überexpressionsmodell (*gain-of-function*) generiert, welches die schlecht differenzierten (G3) Brusttumoren *in vitro* abbilden sollte. Die Transfektion erfolgte mithilfe des Vektors pT-REx-DEST30, in welchem die Vollängen-AGR3-cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors stand beziehungsweise einem Leervektor ohne inserierte cDNA als Negativkontrolle. Die AGR3-Expression der beiden generierten stabilen Zellpools ist in Abbildung 3-12D dargestellt. Die *in vitro*-Versuche mit dem generierten BT549-Modell wurden unter Mithilfe der Master-Studentin Natalie Klotz unter meiner Anleitung durchgeführt. Im Koloniebildungstest führte die forcierte AGR3-Expression zu einem deutlich reduzierten, makroskopisch sichtbaren Koloniewachstum (Abbildung 3-12E). Die densitometrische Auswertung ergab eine im Median um 35,4% hochsignifikant ($P < 0,001$) reduzierte Koloniebildung der AGR3-überexprimierenden BT549-Zellen im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle (Abbildung 3-12F).

Zusammenfassend zeigte sich, in Übereinstimmung mit den prognostischen Daten, ein das Krebszellwachstum fördernder Effekt von AGR3 im MCF7-*in vitro*-Tumormodell zur Abbildung gut differenzierter Tumoren der Brust. Im BT549-Tumormodell, welches die schlecht differenzierten, aggressiven Mammakarzinome repräsentierte, wurde hingegen eine tumorsuppressive Wirkung von AGR3 festgestellt.

3.2.1.3 Analyse der ER-Stressinduktion von AGR3 in humanen Brustkrebszellen

Das in zahlreichen humanen Krebsentitäten stark aufregulierte, zur Proteindisulfidisomerase (PDI)-Familie zählende Protein AGR2 [99] wird unter Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) im Zuge der UPR (*Unfolded Protein Response*) induziert und vermittelt so den Tumorzellen als Chaperon einen möglichen Wachstums- bzw. Überlebensvorteil [103].

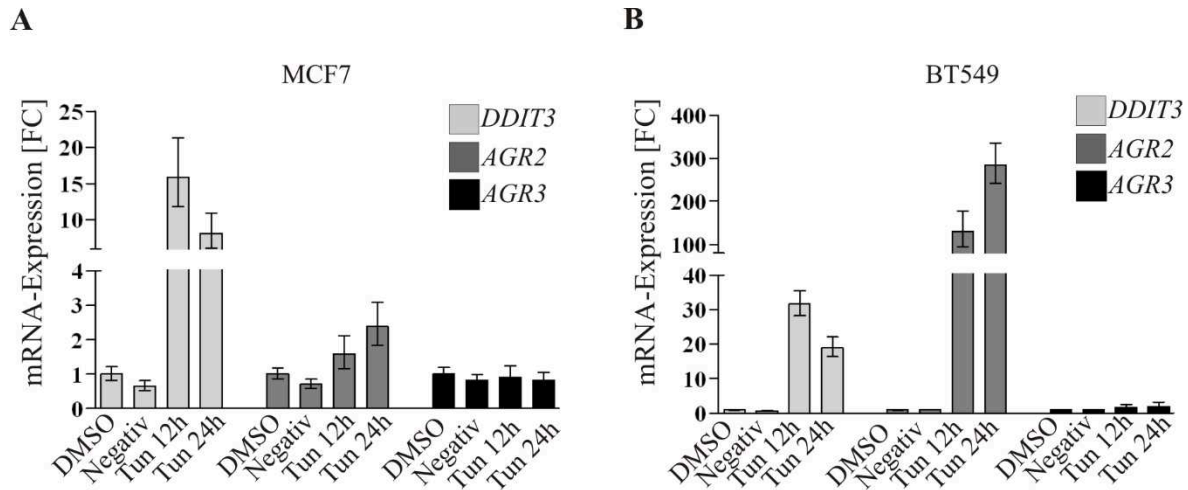


Abbildung 3-13: Genexpressionsänderung von AGR2, AGR3 und DDIT3 nach Tunicamycin-induziertem Stress des endoplasmatischen Retikulums. Expression der Gene AGR2 und AGR3, sowie des ER-Stress-Indikator-Gens *DDIT3* (*CHOP*), in den Mammakarzinom-Zelllinien (A) MCF7 und (B) BT549. Die Zellen wurden für 12 bzw. 24 Stunden mit 5 µg/ml Tunicamycin (Tun, gelöst in DMSO) behandelt. Ein äquivalentes Volumen DMSO bzw. steriles Wasser (Negativ) wurde für 24 Stunden auf die Kontrollansätze gegeben. Die Expression des jeweiligen Gens nach DMSO-Behandlung wurde gleich 1 gesetzt und diente der Normierung. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: ± SEM der Dreifachbestimmung.

Um zu überprüfen, ob dem homologen Protein AGR3 mit bisher unbeschriebener zellulärer Funktion eine ähnliche Tumor-fördernde Rolle, zumindest in gut differenzierten Brustkrebszellen, zukommen kann, wurden Zellen der humanen Mammakarzinom-Zelllinien MCF7 und BT549 mit Tunicamycin (gelöst in DMSO) versetzt. Tunicamycin inhibiert die N-Glykosylierung von Proteinen im ER und führt zur Anhäufung fehlgefalteter Proteine [263]. Als Kontrollgruppen wurden DMSO- und unbehandelte (steriles Wasser) Zellen der jeweiligen Zelllinie mitgeführt. Nach Inkubationszeiten von 12 und 24 Stunden mit Tunicamycin wurde die Expression der Gene AGR3 und AGR2 sowie des ER-Stress-Indikators *DDIT3* (*CHOP*) [264] gemessen.

In beiden Zelllinien, MCF7 (Abbildung 3-13A) und BT549 (Abbildung 3-13B), konnte ER-Stress mittels Tunicamycin-Exposition induziert werden, erkennbar an einer gegenüber den beiden Kontrollgruppen (DMSO, Wasser) deutlichen Aufregulation der *DDIT3*-Expression (mittlerer FC nach 12 Stunden Tunicamycin-Exposition gegenüber der DMSO-Kontrolle: 15,9 (MCF7), 31,6 (BT549)). Die beschriebene Rolle für AGR2 als ER-Stress-induzierbares Protein konnte an beiden Mammakarzinom-Zelllinien bestätigt werden. Es zeigte sich eine deutlich stärkere Induktion der AGR2-Expression in der Östrogenrezeptor- α -negativen Zelllinie BT549 mit fehlender endogener AGR2-Expression im Vergleich zur Östrogenrezeptor- α -positiven Zelllinie MCF7 mit starker basaler AGR2-Expression (mittlerer FC nach 24 Stunden

Tunicamycin-Exposition gegenüber der DMSO-Kontrolle: 2,4 (MCF7), 284,0 (BT549)). In beiden Zelllinien wurde hingegen keine oder nur eine geringfügige Induktion der *AGR3*-Expression infolge der Tunicamycin-Applikation nachgewiesen, was auf eine im Vergleich zu *AGR2* nicht-redundante zelluläre Funktion von *AGR3* hindeutet (mittlerer FC nach 24 Stunden Tunicamycin-Exposition gegenüber der DMSO-Kontrolle: 0,8 (MCF7), 2,0 (BT549)).

3.2.2 Der Kandidat CELSR1

Trotz der zentralen Stellung von CELSR1 innerhalb des Krebs-relevanten WNT/PCP-Signalweges [147] ist seine klinische Bedeutung als möglicher Biomarker sowie die potentielle funktionelle Involvierung in Krebsentstehung und –progression weitgehend ungeklärt. Im hepatozellulären Karzinom wurde *CELSR1* als ein im Vergleich zum Normalgewebe hypermethyliertes Gen beschrieben [181]. Liao und Kollegen identifizierten CELSR1 als Bestandteil einer möglichen prognostischen DNA-Signatur zur Vorhersage einer malignen Progression des niedrig-gradigen DCIS (duktalen Karzinom *in situ*) zum invasiven Mammakarzinom. In dieser Studie wurde eine verstärkte Amplifikation des *CELSR1*-Lokus in Zellen des reinen DCIS ohne invasive Komponente beobachtet, welche beim Übergang zum invasiven Karzinom abnahm [182]. Wohingegen die obigen Arbeiten indirekt auf mögliche Tumor-suppressive Eigenschaften von CELSR1 hindeuten, suggerieren weitere Studien eine Tumor-fördernde Rolle des Proteins in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen [178, 179] sowie im Mundhöhlenkrebs [180]. Im Zuge dieser Dissertation wurden daher eine Untersuchung der möglichen prognostischen Relevanz von CELSR1 sowie eine erstmalige funktionelle Charakterisierung des Proteins im humanen Mammakarzinom angestrebt.

3.2.2.1 Die Analyse der prognostischen Relevanz von CELSR1 für das humane Mammakarzinom

Die in der vorliegenden Dissertation erstmalig durchgeführte Subtyp-spezifische Expressionsanalyse für CELSR1 im humanen Mammakarzinom offenbarte auf mRNA-Ebene eine geringfügige, nicht signifikante Aufregulation von *CELSR1* in Brusttumoren gegenüber der Normalgewebe-Expression (medianer FC: 1,5; Tabelle 3-6). Es konnte jedoch eine hochsignifikante, positive Korrelation zwischen *CELSR1*-mRNA-Expression und niedrigerem Tumorgad sowie positivem Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-Status herausgestellt werden (Tabelle 3-7 und Tabelle 3-8).

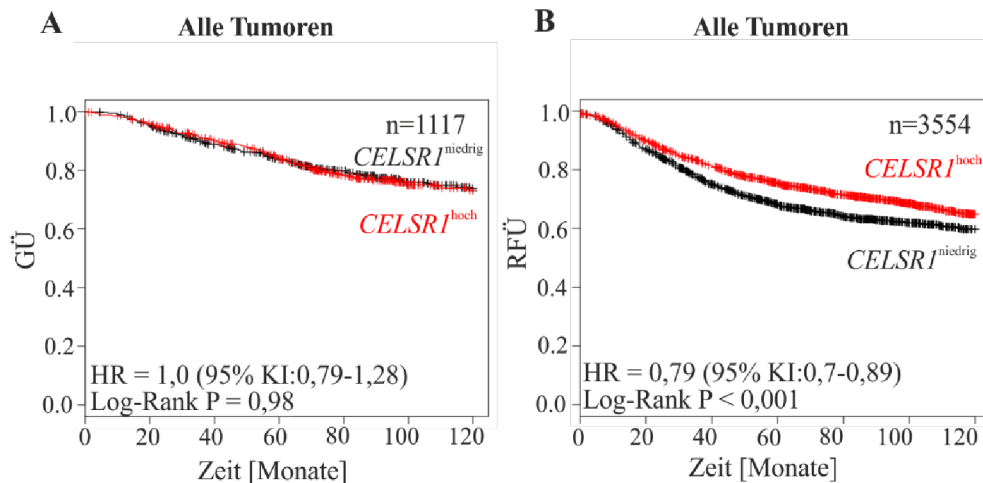


Abbildung 3-14: Eine erhöhte *CELSR1*-mRNA-Expression im humanen Mammakarzinom ist mit einem längeren Rezidiv-freien Überleben assoziiert. Univariate Kaplan-Meier-Überlebenskurven illustrieren (A) das Gesamtüberleben (GÜ) und (B) das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) von Mammakarzinom-Patientinnen mit niedriger (schwarze Kurven) in Relation zu Patientinnen mit hoher *CELSR1*-mRNA-Expression (rote Kurven). Die Dichotomisierung in die Expressions-Gruppen „*CELSR1* niedrig“ und „*CELSR1* hoch“ erfolgte am Median der mRNA-Expressionswerte für *CELSR1*. Vertikale Linien: zensierte Fälle. HR:Hazard-Rate, KI: Konfidenzintervall.

Für eine Analyse der Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen in Abhängigkeit von der *CELSR1*-Expression wurden Daten des Online-Programms *Kaplan-Meier Plotter* [276] herangezogen. Mithilfe des Programmes erfolgte die Generierung univariater Kaplan-Meier-Überlebenskurven, basierend auf *Affymetrix*-Chip-Expressionsdaten für *CELSR1* und den korrespondierenden Überlebensdaten der Brustkrebsfälle über einen Zeitraum von 120 Monaten. Es wurde sowohl das Gesamtüberleben (GÜ) in 1117 sowie das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) in insgesamt 3554 Brustkrebs-Fällen in Abhängigkeit von der *CELSR1*-Expression analysiert. Dabei waren sowohl lokale, regionale und ferne Rezidive in die Analyse eingeschlossen [277].

Obwohl kein Einfluss einer *CELSR1*-mRNA-Expression auf das GÜ von Brustkrebs-Patientinnen feststellbar war (Abbildung 3-14A), zeigte sich, dass eine erhöhte *CELSR1*-mRNA-Expression hochsignifikant ($P < 0,001$) mit einem längeren RFÜ assoziiert ist (Abbildung 3-14B).

3.2.2.2 Generierung eines transienten *CELSR1*-Expressionsverlustes in MCF7-Brustkrebszellen

Die generierten prognostischen Daten lieferten einen ersten Hinweis auf mögliche Tumorsuppressive Eigenschaften von *CELSR1* im humanen Mammakarzinom.

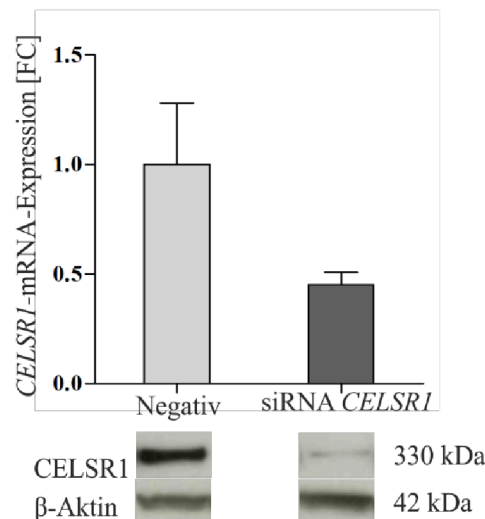


Abbildung 3-15: CELSR1-Expression nach induziertem transienten *Knockdown* in MCF7-Brustkrebszellen. Repräsentative Darstellung der CELSR1-Expression in MCF7-Brustkrebszellen nach 192-stündiger Inkubation mit jeweils 300 ng siRNA. Oberer Graph: *CELSR1*-mRNA-Expression in mittels Negativkontroll-siRNA (hellgrau) sowie mittels *CELSR1*-spezifischer siRNA (dunkelgrau) transfizierten MCF7-Zellen. Normiert wurde auf die Expression der Negativkontrolle. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: +SEM der Dreifachbestimmung. Untere Blots: zugehörige CELSR1-Proteinexpression. Als Ladekontrolle fungierte β-Aktin.

Um erstmalig eine potentielle Beeinflussung fundamentaler Krebszeleigenschaften durch CELSR1 zu untersuchen, sollte im Folgenden ein transientes *loss-of-function*-Zellkultur-Modell erzeugt werden. Dazu wurde die luminalen Brustkrebs-Zelllinie MCF7 ausgewählt, welche eine hohe endogene CELSR1-Expression auf mRNA- und Proteinebene aufwies (Abbildung 3-1B). Die *in vitro*-Versuche wurden zusammen mit Eva Lorsy (M.Sc.) (AG Dahl, Molekulare Onkologie, Pathologie, Uniklinik RWTH Aachen) durchgeführt.

Im optimierten Protokoll, welches für nachfolgende funktionelle Analysen verwendet wurde, kam eine Gesamtmenge von 300 ng siRNA zum Einsatz. Der *Knockdown* von CELSR1 wurde mittels Kombination zweier verschiedener siRNAs (jeweils 150 ng) durchgeführt, wobei die gleiche Menge einer siRNA ohne Homologie zum humanen Genom als Negativkontrolle diente. Nach dreimaliger Transfektion über einen Zeitraum von insgesamt 192 Stunden wurden die MCF7-Zellen in funktionellen *Assays* analysiert (siehe Abschnitt 2.17.6). Abbildung 3-15 zeigt einen repräsentativen transienten *Knockdown* von CELSR1 nach 192-stündiger siRNA-Exposition: die Reduktion der *CELSR1*-mRNA-Expression um 55% im Vergleich zur Negativkontrolle resultierte in einem Proteinverlust von 87%.

3.2.2.3 Der Einfluss von CELSR1 auf das Zellwachstum humaner Mammakarzinomzellen

Um das Zellwachstum in Abhängigkeit von der CELSR1-Expression in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 zu analysieren, wurde der XTT-Test genutzt.

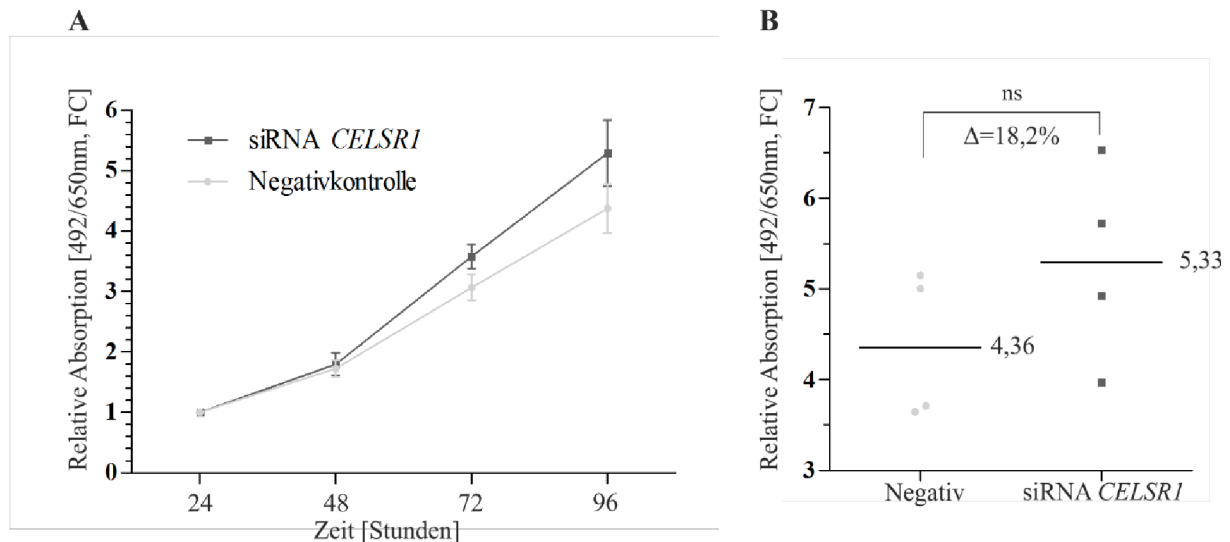


Abbildung 3-16: Der Einfluss von CELSR1 auf das Zellwachstum der luminalen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7. (A) Die kolorimetrische Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen erfolgte mittels Absorptionsmessung (492nm/650nm) über einen Zeitraum von 96 Stunden. Dargestellt ist das gemittelte Ergebnis aus vier unabhängigen Versuchen für mittels *CELSR1*-spezifischer siRNA (dunkelgraue Kurve) sowie Negativkontroll-siRNA transfizierter MCF7-Zellen (hellgraue Kurve). Vertikale Linien: $\pm$ SEM der Vierfachbestimmung. Die Absorptionswerte jeder Versuchsreihe wurden auf den 24-Stunden-Wert normiert. (B) Scatter-Plot-Darstellung des Änderungsfaktors der Menge vitaler Zellen nach 96 Stunden Kultivierung in Test-(siRNA *CELSR1*) und Kontrollgruppe (Negativkontroll-siRNA). Dargestellt ist der Median der Vierfachbestimmung der jeweiligen Gruppe. ns: nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig). Δ : Differenz der Mediane.

Nach Aussaat der gleichen Zellzahl für beide Versuchsansätze erfolgte die Messung der Absorption alle 24 Stunden über einen Zeitraum von insgesamt vier Tagen. Die gemessenen Absorptionswerte jedes Ansatzes wurden auf den jeweiligen Messwert zum Zeitpunkt 24 Stunden normiert, um mögliche Abweichungen bei der Zellaussaat zu korrigieren.

Insgesamt wurden vier unabhängige Versuche mit MCF7-Zellen aus vier unabhängigen transienten Transfektionen durchgeführt. In Abbildung 3-16A sind die gemittelten, viertägigen Verlaufskurven für beide Versuchsansätze dargestellt. Der *CELSR1-Knockdown* in luminalen MCF7-Zellen resultierte in einer im Median um 18,2% erhöhten Anzahl vitaler Zellen nach 96-stündiger Kultivierung im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3-16B).

3.2.2.4 Der Einfluss von CELSR1 auf die Koloniebildung humaner Mammakarzinomzellen

Neben dem XTT-Assay wurde der Koloniebildungs-Test als weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Zellwachstums herangezogen.

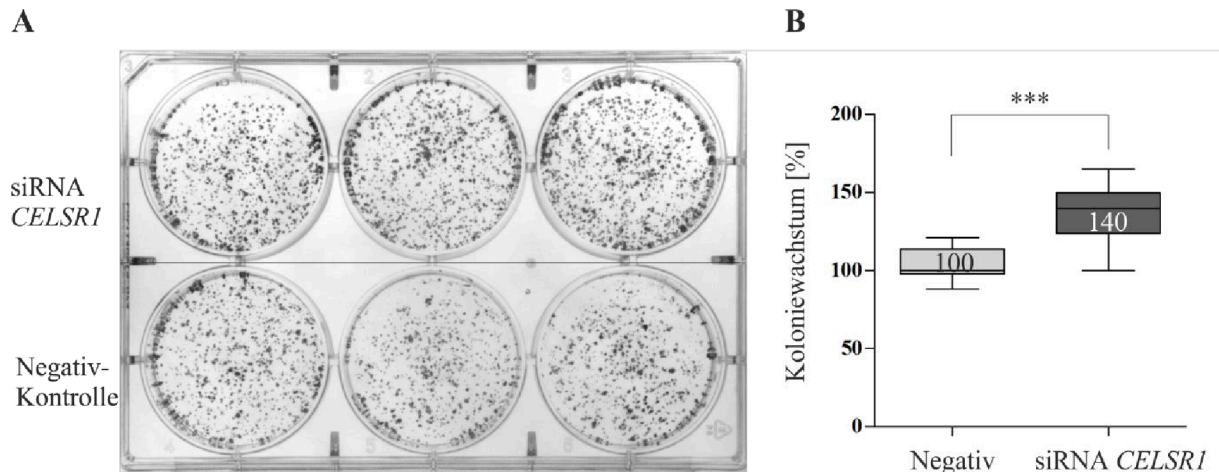


Abbildung 3-17: Einfluss von CELSR1 auf das Koloniewachstum der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7.(A) Repräsentative Aufnahme fixierter, angefärbter Kolonien in einer 6-Well-Zellkulturschale nach 10-tägiger Kultivierung. Gezeigt ist die Koloniebildung (in Dreifachbestimmung) von mittels *CELSR1*-spezifischer siRNA sowie mittels Negativkontroll-siRNA transfizierter MCF7-Brustkrebszellen. (B) Die *Box-Plot*-Analyse nach densitometrischer Auswertung des Koloniewachstums in vier unabhängigen Experimenten zeigt ein hochsignifikant gesteigertes Koloniebildungsvermögen nach siRNA-induziertem *CELSR1-Knockdown* im MCF7-Modell. Die Normierung erfolgte auf das mediane Koloniewachstum der Negativkontrolle. Horizontale Linien der *Box-Plots*: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der beiden Gruppen, sind in der *Box-Plot*-Darstellung abgebildet ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

Dazu wurden je Versuchsgruppe (siRNA *CELSR1* und Negativkontrolle) in Dreifachbestimmung 2000 Zellen pro Kavität einer 6-Well-Kulturschale ausgesät und das Koloniewachstum nach 10 Tagen Kultivierung analysiert. Insgesamt wurden vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Nach 10-tägiger Kultivierungszeit wurde ein makroskopisch sichtbar gesteigertes Koloniewachstum infolge siRNA-induziertem *CELSR1-Knockdown* im MCF7-Modell beobachtet (Abbildung 3-17A). Die semiquantitative, densitometrische Auswertung des Koloniewachstums bestätigte die qualitativen Beobachtungen. Die reduzierte *CELSR1*-Expression im luminalen MCF7-Modell resultierte in einer hochsignifikant ($P < 0,001$) erhöhten Koloniebildungsfähigkeit (Abbildung 3-17B). Im Vergleich zur Negativkontrolle, deren medianes Koloniewachstum zwecks Normierung gleich 100% gesetzt wurde, war die

Koloniebildung der mittels *CELSR1*-spezifischer siRNA behandelten MCF7-Zellen um 40% auf 140% gesteigert. Die Daten stehen folglich im Einklang mit der bereits im XTT-Assay beobachteten Erhöhung des Zellwachstums infolge des CELSR1-Expressionsverlustes. Ob das gesteigerte Zellwachstum aus einer erhöhten Zellproliferations- oder einer reduzierten Apoptoserate beziehungsweise einer Modulation beider Prozesse resultiert, ist in weiterführenden Arbeiten noch zu klären.

3.2.2.5 Der Einfluss von CELSR1 auf die Migrationsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen

Da CELSR1 eine Haupt-Komponente des WNT/PCP-Signalweges und zudem ein Mitglied der Cadherin-Superfamilie darstellt, war die Untersuchung der potentiellen Änderung von progressions-assoziierten Eigenschaften in Mammakarzinomzellen wie Migration und Adhäsion von besonderem Interesse [148, 278].

Zunächst wurde ein 2D-Wundheilungstest durchgeführt, welcher die Fähigkeit der Zellen untersucht eine zellfreie Fläche zu besiedeln. Zur Erzeugung der zellfreien Fläche definierter Breite wurden sterile Silikonrahmen verwendet, welche jeweils zwei Teilkammern umgeben, die in der Mitte durch einen Steg voneinander getrennt sind. Je Teilkammer wurde eine entsprechende Zellzahl ausgesät, so dass nach ca. 24-stündiger Inkubation ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen in beiden Teilkammern, und nach Entfernung des Rahmens, eine die beiden Zell-Monolayer trennende, zellfreie Fläche entstand.

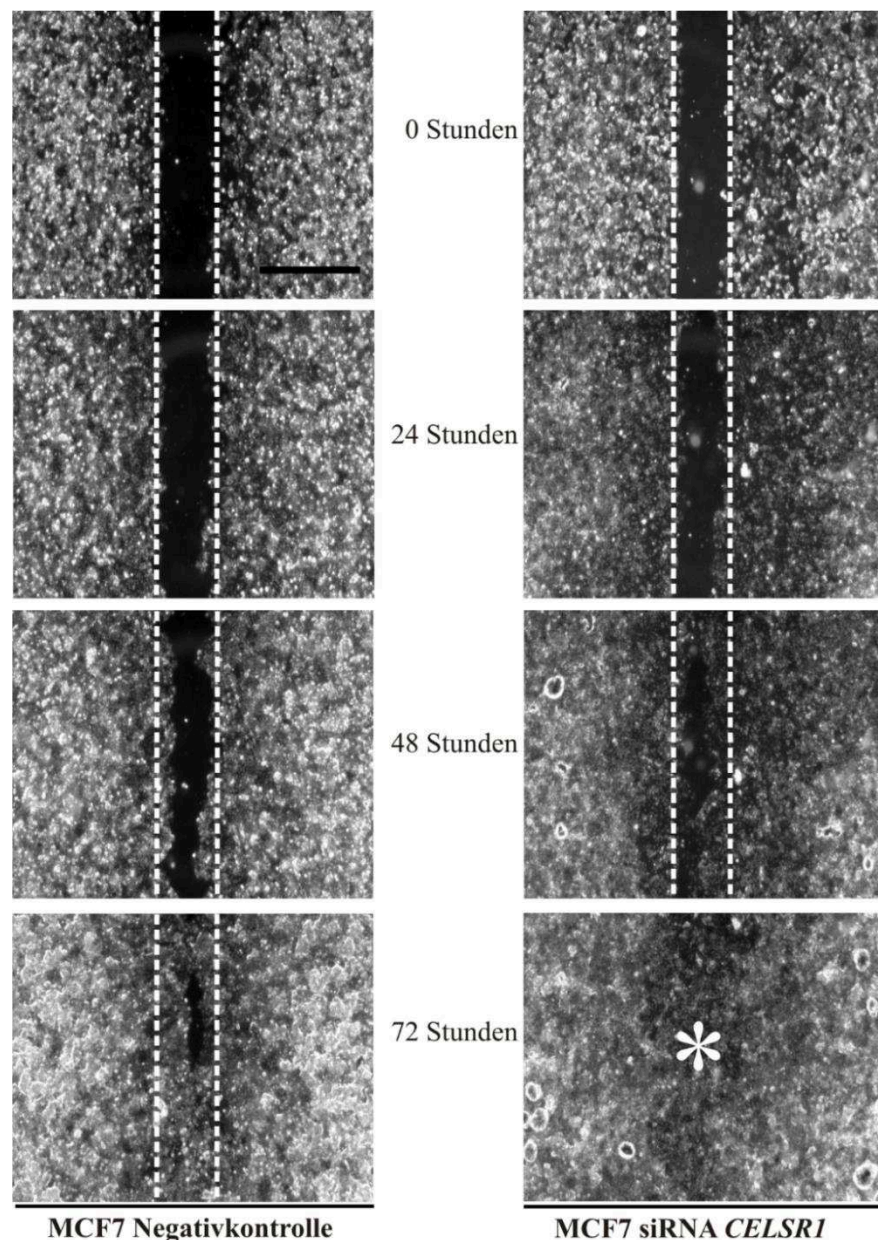


Abbildung 3-18: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests nach siRNA-induziertem CELSR1-Knockdown in MCF7-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Vergleichende, repräsentative Foto-Dokumentation der Besiedlung der zellfreien Fläche über einen Zeitraum von 72 Stunden, dargestellt für MCF7-Zellen, die mittels *CELSR1*-spezifischer sowie Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden. 25-fache Originalvergrößerung. Vertikale, gestrichelte Linien markieren den Rand der zellfreien Ausgangsfläche zum Zeitpunkt 0 Stunden. Stern: vollständige Besiedlung der Fläche. Messbalken: entspricht 1000 μm .

Zur Erfassung eines möglichst großen Bildbereiches wurden die Aufnahmen des für jede Probe immer gleich gewählten Ausschnitts bei 25-facher Vergrößerung in definierten Zeitabständen durchgeführt. Der Wert für die zellfreie Fläche für jeden Messzeitpunkt wurde für jede Probe auf die jeweilige zellfreie Ausgangsfläche zum Zeitpunkt $T = 0$ Stunden normiert. Insgesamt wurden vier unabhängige Versuche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Es konnte eine beschleunigte Besiedlung der zellfreien Fläche durch MCF7-Zellen infolge induzierter CELSR1-Expressionsreduktion im Vergleich zur Negativkontrolle beobachtet werden. Die Dokumentation des Wundschlusses erfolgte über einen Zeitraum von 72 Stunden und ist exemplarisch für Test- und Kontrollgruppe in Abbildung 3-18 dargestellt.

Die statistische Auswertung bestätigte die qualitativen Beobachtungen: nach 24 Stunden zeigte sich eine geringe Differenz im Wundschluss von im Mittel 5,1% ($P = 0,08$), die nach 48 Stunden mit 14,4% ihr Maximum erreichte ($P < 0,05$) und sich nach 72 Stunden auf 7,4% ($P = 0,08$) reduzierte (Abbildung 3-19). Es ist anzumerken, dass aufgrund des beobachteten erhöhten Zellwachstums der MCF7-Zellen infolge des induzierten CELSR1-Expressionsverlustes im 2D-Wundheilungstest nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob der dokumentierte beschleunigte Wundschluss auf ein erhöhtes Zellwachstum (siehe Abbildung 3-16 und Abbildung 3-17), eine Steigerung der Migration beziehungsweise auf eine Modulation beider Eigenschaften zurückzuführen ist.

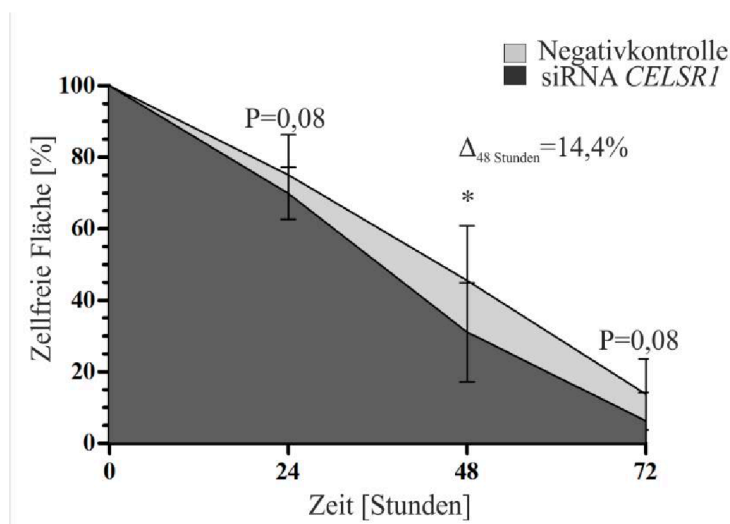


Abbildung 3-19: Der Einfluss von CELSR1 auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7. Vergleich des Wundschlusses von mittels *CELSR1*-spezifischer siRNA (dunkelgraue Fläche) sowie mittels Negativkontroll-siRNA (hellgraue Fläche) transfizierter MCF7-Brustkrebszellen über einen Zeitraum von 72 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus vier unabhängigen Versuchen, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden (für jede Gruppe $n=12$). Alle Werte wurden auf die zellfreie Ausgangsfläche zum Zeitpunkt $T=0$ Stunden normiert (100%). Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung. $\Delta_{48 \text{ Stunden}}$: Differenz der zellfreien Flächen nach 48 Stunden. *: $P < 0,05$ (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig).

3.2.2.6 Der Einfluss von CELSR1 auf die Zell-Matrix-Adhäsion humaner Mammakarzinomzellen

Neben der Veränderung migratorischer Eigenschaften, stellt eine deregulierte Zell-Matrix-Adhäsion in Tumorzellen ein weiteres progressions-assoziiertes Charakteristikum dar [279]. Um die Basalmembran (die physiologische Barriere zwischen Epithel und Stroma) *in vitro* zu simulieren, wurden 6-Well-Platten mit *MatrigelTM Basement Membrane Matrix* beschichtet. Eine definierte Zellzahl mittels *CELSR1*-spezifischer und Negativkontroll-siRNA behandelter MCF7-Zellen wurde für einen Zeitraum von einer Stunde auf die mit Matrigel beschichteten Platten ausgesät. Durch anschließendes Waschen wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt, adhärenente Zellen schließlich fixiert und mit Kristallviolett-Lösung angefärbt. Die Menge des herausgelösten Zell-gebundenen Farbstoffs ist proportional zur Anzahl adhärenenter Zellen und wurde an einem ELISA-Reader quantifiziert. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die MCF7-Zellen für jeden unabhängigen Versuch stammten jeweils aus unabhängigen transienten Transfektionen.

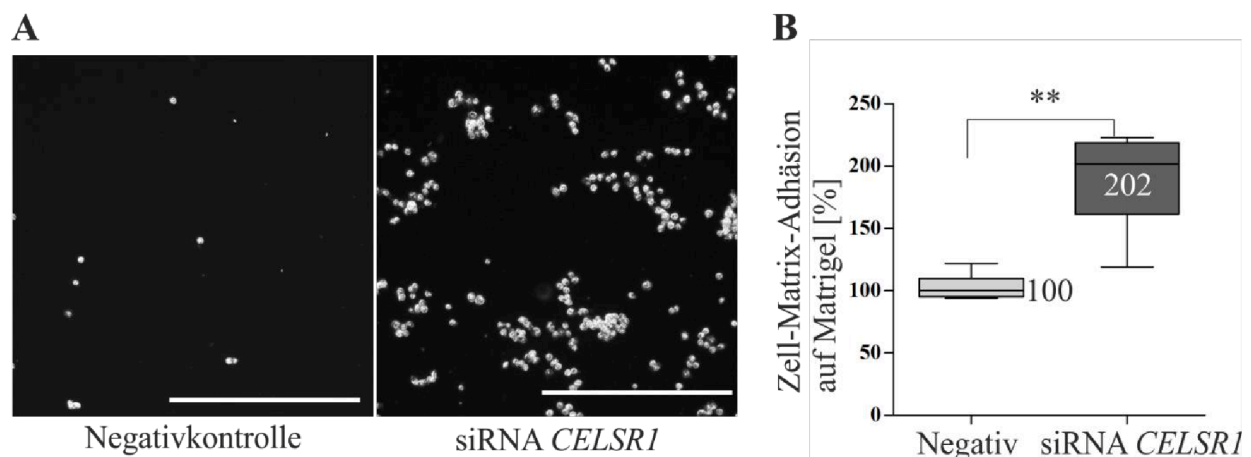


Abbildung 3-20: Der Einfluss von CELSR1 auf die Matrigel-basierte Zell-Matrix-Adhäsion der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7. (A) Repräsentative Aufnahmen fixierter, adhärenenter MCF7-Zellen (siRNA *CELSR1* und Negativkontrolle) nach einstündiger Adhäsion auf Matrigel-beschichteten 6-Well-Zellkulturschalen. 50-fache Originalvergrößerung. Messbalken: 500 µm. (B) *Box-Plot*-Darstellung der kolorimetrischen Bestimmung der Matrigel-basierten Zell-Matrix-Adhäsion von MCF7-Zellen, die mittels *CELSR1*-spezifischer sowie Negativkontroll-siRNA behandelt wurden. Es wurden drei unabhängige Versuche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Normierung aller Werte erfolgte auf die mediane Zell-Matrix-Adhäsion der Negativkontrolle (100%). Horizontale Linien der *Box-Plots*: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der beiden Versuchsgruppen sind in der *Box-Plot*-Darstellung abgebildet. **: $P < 0,01$ (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

Es wurde beobachtet, dass der *Knockdown* von CELSR1 in MCF7-Brustkrebszellen zu einer gesteigerten Adhäsionsfähigkeit der Zellen auf Matrigel führte. Abbildung 3-20A zeigt

repräsentative Aufnahmen fixierter, adhärenter Zellen von Test- und Kontrollgruppe nach einstündiger Inkubation auf Matrigel-beschichteten 6-Well-Kulturschalen. Die kolorimetrische, quantitative Auswertung bestätigte eine hochsignifikante ($P < 0,01$) gesteigerte Fähigkeit der Zell-Matrix-Adhäsion infolge einer siRNA-vermittelten Reduktion der CELSR1-Expression in MCF7-Zellen (Abbildung 3-20B). Zwecks Normierung wurde die mediane Zell-Matrix-Adhäsion der Negativkontrolle mit 100% definiert. In den mittels *CELSR1*-spezifischer siRNA behandelten MCF7-Zellen ergab sich somit eine relative Steigerung der Zell-Matrix-Adhäsion von im Median 102% im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.2.3 Der Kandidat CTHRC1

CTHRC1 wurde erstmalig als ein bei Gefäßverletzungen transient exprimiertes Protein beschrieben, welches in der remodellierenden Gefäßwand durch Fibroblasten sowie glatte Muskelzellen gebildet wird und sowohl ihre Migration steigert als auch die Bildung von Kollagen I inhibiert [186]. CTHRC1 ist in der Mehrzahl der humanen soliden Tumoren als überexprimiert beschrieben, darunter Tumoren der Brustdrüse [193, 194, 196, 197, 200, 280]. Zudem deuten Überlebensanalysen sowie funktionelle *in vitro*-Versuche und *in vivo*-Mausmodelle in mehreren Entitäten auf eine Involvierung von CTHRC1 in die Tumورprogression hin, vermutlich durch Förderung der Migration und Invasivität der Krebszellen [194, 197, 280]. Ebenso suggerieren zwei neuere Studien im humanen Mammakarzinom eine mögliche prognostische Relevanz von CTHRC1 für diese Entität [201, 202]. Trotz dargelegter Assoziation der CTHRC1-Expression mit fortgeschrittenen Brusttumoren und einem verringerten Rezidiv-freien Überleben [202], wurden bisher keine funktionellen Analysen von CTHRC1 im Mammakarzinom durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit lag daher der Fokus auf der erstmaligen Analyse des möglichen Einflusses von CTHRC1 auf migratorische Eigenschaften humaner Brustkrebszellen.

3.2.3.1 Die Analyse der prognostischen Relevanz von CTHRC1 für das humane Mammakarzinom

Bisher vorliegende prognostische Studien zu CTHRC1 im humanen Mammakarzinom zeigten eine signifikante Assoziation zwischen erhöhter CTHRC1-Proteinexpression und verkürztem Rezidiv-freien Überleben (RFÜ) [201, 202]. Kharashvili *et al.* beobachteten, dass der prognostische Effekt stromal exprimierten CTHRC1-Proteins abhängig von einer ebenfalls hohen stromalen Expression des Proteins Periostin war [201]. Kim und Kollegen analysierten

hingegen den prognostischen Effekt von überwiegend in epithelialen Krebszellen exprimierten CTHRC1-Proteins (unabhängig von Periostin) [202]. Aufgrund dieser Diskrepanz beider Studien sollte zwecks Validierung der potentiellen prognostischen Relevanz zunächst der Einfluss der CTHRC1-Expression auf das Gesamt- (GÜ) sowie das Rezidiv-freie Überleben in einem unabhängigen Kollektiv untersucht werden. Dazu wurden RNA-*HiSeq*-Expressionsdaten für *CTHRC1* sowie die zugehörigen Überlebensdaten aus dem Datenportal TCGA verwendet [237, 238] (siehe Abschnitt 2.1.4). Daten für das Gesamtüberleben lagen in 919, für das Rezidiv-freie Überleben in 476 Brustkrebsfällen vor. Die Dichotomisierung in die Gruppen „*CTHRC1* niedrig“ und „*CTHRC1* hoch“ erfolgte am Median der mRNA-Expression aller Brustkrebsfälle.

Die univariate Überlebensanalyse ergab, dass die *CTHRC1*-mRNA-Expression weder einen signifikanten prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben (Abbildung 3-21A) noch das Rezidiv-freie Überleben (Abbildung 3-21B) im humanen Mammakarzinom darstellt.

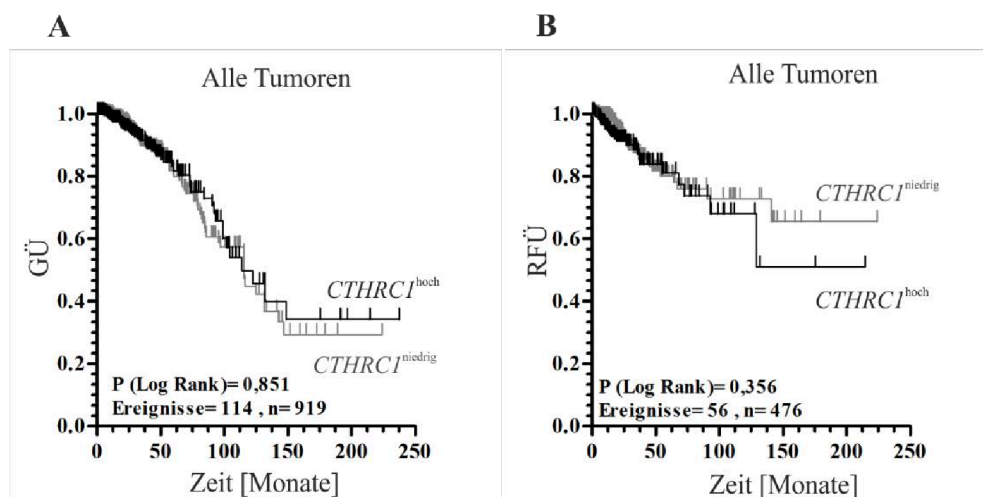


Abbildung 3-21: Der Einfluss der *CTHRC1*-Expression auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben von Brustkrebspatientinnen. Univariate Kaplan-Meier-Überlebenskurven illustrieren (A) das Gesamtüberleben (GÜ) sowie (B) das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) von Brustkrebspatientinnen mit niedriger (graue Kurven) in Relation zum Überleben von Patientinnen mit hoher *CTHRC1*-mRNA-Expression (schwarze Kurven). Die Dichotomisierung in die Expressions-Gruppen „*CTHRC1* niedrig“ und „*CTHRC1* hoch“ erfolgte am Median der mRNA-Expressionswerte für *CTHRC1*. Vertikale Linien: zensierte Fälle.

3.2.3.2 Generierung eines transienten CTHRC1-Expressionsverlustes in BT549-Brustkrebszellen

Um erstmalig den möglichen Einfluss von CTHRC1 auf die Migrationsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen zu untersuchen, sollte ein *loss-of-function*-Zellkultur-Modell erzeugt werden. Die Analyse der CTHRC1-Expression in 14 malignen Brustkrebszelllinien sowie zwei benignen Brustzelllinien verdeutlichte eine Assoziation der CTHRC1-Expression mit Zellen des molekularen Subtyps Basal B (Abbildung 3-1C). Kennzeichnend für Zellen dieses Subtyps ist vor allem ihre mesenchymale Morphologie und ein damit einhergehendes höheres migratorisches und invasives Potential im Vergleich zu Zellen der beiden anderen Subtypen [239]. Aufgrund einer hohen endogenen *CTHRC1*-mRNA-Expression sowie nachweisbaren endogenen CTHRC1-Proteins, wurde die Zelllinie BT549 für den siRNA-vermittelten Expressionsverlust von CTHRC1 ausgewählt.

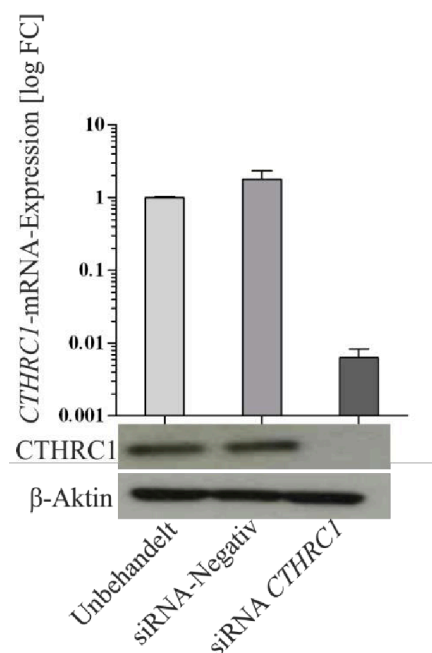


Abbildung 3-22: siRNA-induzierter Expressionsverlust von CTHRC1 in BT549-Brustkrebszellen. Repräsentative Darstellung der CTHRC1-Expression in BT549-Brustkrebszellen nach 120-stündiger Inkubation mit jeweils 600 ng siRNA sowie in unbehandelten Wildtypzellen. Oberer Graph: *CTHRC1*-mRNA-Expression in unbehandelten Wildtyp-, mittels Negativkontroll-siRNA sowie *CTHRC1*-spezifischer siRNA transfizierten BT549-Zellen. Normiert wurde auf die Expression der unbehandelten Wildtyp-Zellen. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: + SEM der Dreifachbestimmung. Untere Western Blots: zugehörige CTHRC1-Proteinexpression. Als Ladekontrolle fungierte β -Aktin.

Die nachfolgenden funktionellen Analysen erfolgten unter Verwendung einer Gesamtmenge von 600 ng siRNA. Der *Knockdown* von CTHRC1 wurde mittels Kombination zweier

CTHRC1-spezifischer siRNAs (jeweils 300 ng) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente die gleiche Menge einer siRNA ohne Homologie zum humanen Genom. Die BT549-Zellen wurden über einen Zeitraum von insgesamt 120 Stunden mittels siRNA behandelt (siehe Abschnitt 2.17.6).

Abbildung 3-22 zeigt einen repräsentativen siRNA-induzierten *CTHRC1*-Expressionsverlust nach 120-stündiger siRNA-Exposition. Mittels *CTHRC1*-spezifischer siRNA konnte eine 156-fache Reduktion der *CTHRC1*-mRNA-Expression gegenüber der wildtypischen Expression, hingegen eine 280-fache Reduzierung relativ zur Expression Negativkontroll-siRNA behandelter BT549-Zellen erzielt werden. Der *CTHRC1-Knockdown* resultierte in einer nicht mehr nachweisbaren *CTHRC1*-Proteinexpression.

3.2.3.3 Der Einfluss von *CTHRC1* auf die Migrationsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen

Zunächst wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht in einem 2D-Wundheilungstest durch Migration eine zellfreie Fläche zu besiedeln. Die fotografische Dokumentation des für jede Probe immer gleich gewählten Ausschnitts wurde bei einer 25-fachen Vergrößerung in definierten Zeitabständen durchgeführt. Der Wert für die zellfreie Fläche für jeden Messzeitpunkt wurde für jede Probe auf die jeweilige zellfreie Ausgangsfläche zum Zeitpunkt $T = 0$ Stunden normiert. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt.

Es konnte eine verlangsamte Besiedlung der zellfreien Fläche durch mittels *CTHRC1*-spezifischer siRNA behandelte BT549-Brustkrebszellen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen (unbehandelte BT549-Wildtyp, siRNA-Negativkontrolle) beobachtet werden. Die Dokumentation des Wundschlusses erfolgte über einen Zeitraum von insgesamt 27 Stunden und ist exemplarisch für die Testgruppe (siRNA *CTHRC1*) sowie die siRNA-Negativkontrolle in Abbildung 3-23 dargestellt.

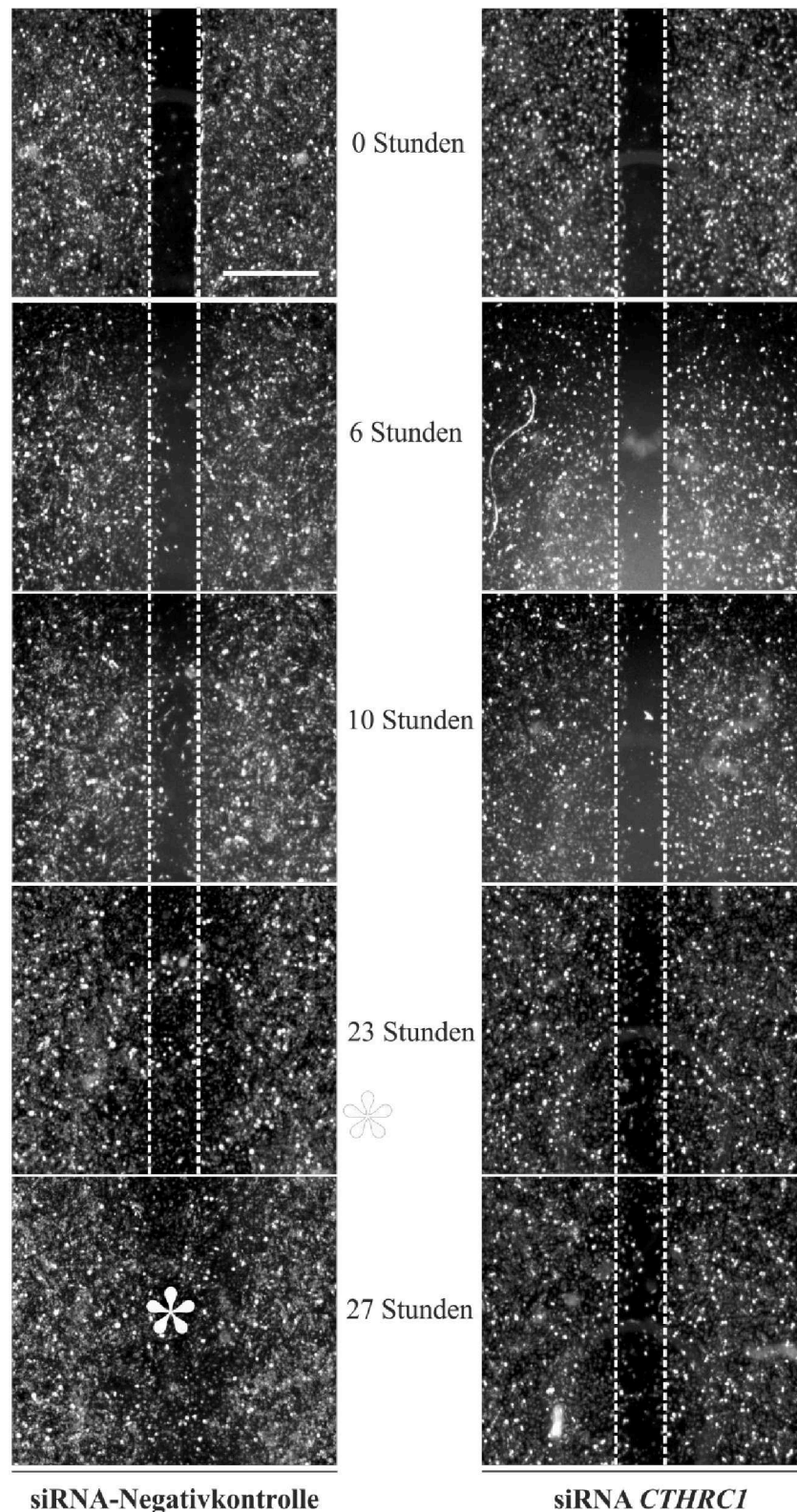


Abbildung 3-23: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests mit BT549-Zellen nach transientem *CTHRC1*-Expressionsverlust im Vergleich zur Negativkontrolle. Repräsentative Foto-Dokumentation der Besiedlung der zellfreien Fläche über einen Zeitraum von 27 Stunden, dargestellt für BT549-Zellen, die mittels *CTHRC1*-spezifischer sowie Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden. 25-fache Originalvergrößerung. Vertikale, gestrichelte Linien markieren den Rand der zellfreien Ausgangsfläche zum Zeitpunkt 0 Stunden. Stern: vollständige Besiedlung der Fläche. Messbalken: 1000 µm.

Die statistische Auswertung bestätigte die qualitativen Beobachtungen: ab dem Messzeitpunkt 10 Stunden konnte eine signifikante Differenz ($P < 0,05$) im mittleren Wundschluss zwischen Testgruppe und beiden Kontrollgruppen für die folgenden Messzeitpunkte verzeichnet werden. Die Differenz des Wundschlusses zwischen beiden Kontrollgruppen war hingegen zu keinem der Messzeitpunkte signifikant differentiell (Abbildung 3-24A). Nach 27 Stunden wurde die maximale mittlere Differenz in der zellfreien Fläche zwischen Testgruppe und beiden Kontrollgruppen beobachtet. Diese betrug 39,5% zwischen Testgruppe und unbehandelten BT549-Wildtypzellen ($P < 0,01$) und 43,3% zwischen Testgruppe und der siRNA-Negativkontrolle ($P < 0,01$) (Abbildung 3-24B).

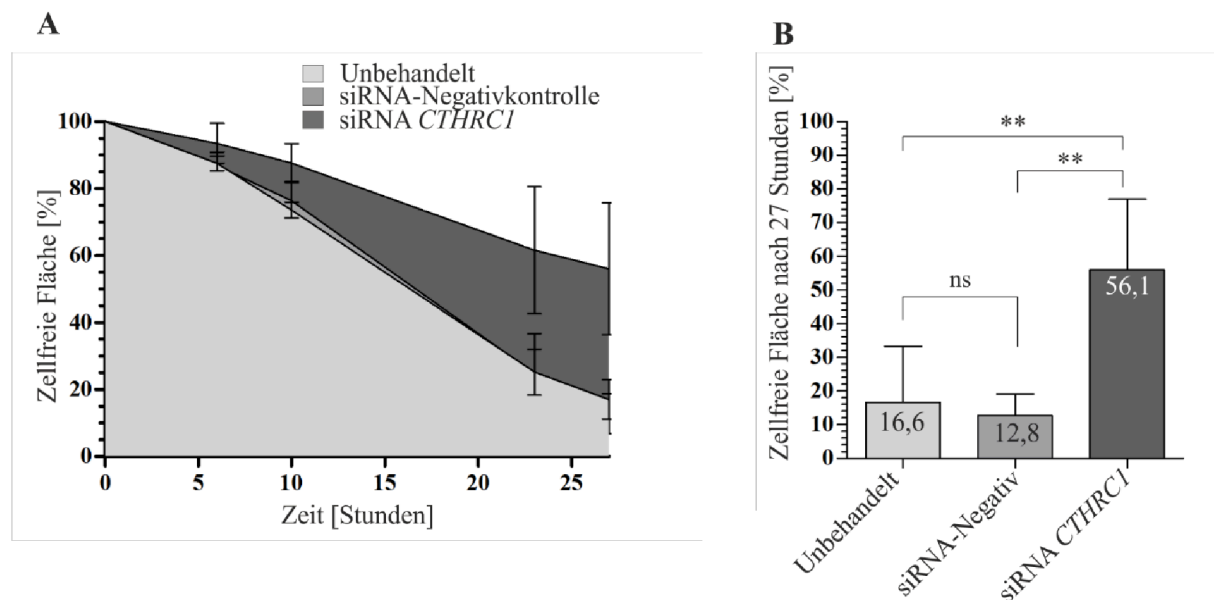


Abbildung 3-24: Der Einfluss von CTHRC1 auf den Wundschluss von BT549-Brustkrebszellen. (A) Vergleich des Wundschlusses von mittels *CTHRC1*-spezifischer siRNA, Negativkontroll-siRNA transfizierter sowie unbehandelter BT549-Zellen (Wildtyp) über einen Zeitraum von 27 Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen, die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden (für jede Gruppe $n=9$). Alle Werte wurden auf die zellfreie Ausgangsfläche zum Zeitpunkt $T=0$ Stunden normiert (100%). Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung. (B) Vergleich der zellfreien Fläche nach 27 Stunden für die drei Versuchsgruppen. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung (jeweils $n=9$). Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung. Der Mittelwert der jeweiligen Gruppe ist im Diagramm abgebildet. **: $P < 0,01$; ns = nicht signifikant (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

Um eine isolierte Betrachtung der Migration ohne einen möglichen Einfluss der Zellproliferation zu gewährleisten, wurde zusätzlich ein *Boyden-Chamber*-Migrationstest durchgeführt (siehe Abschnitt 2.18.6). Dieser basierte auf Nutzung von Transwell-Einsätzen, deren Böden aus Polycarbonat-Filtern mit einer Porengröße von $8 \mu\text{m}$ bestanden.

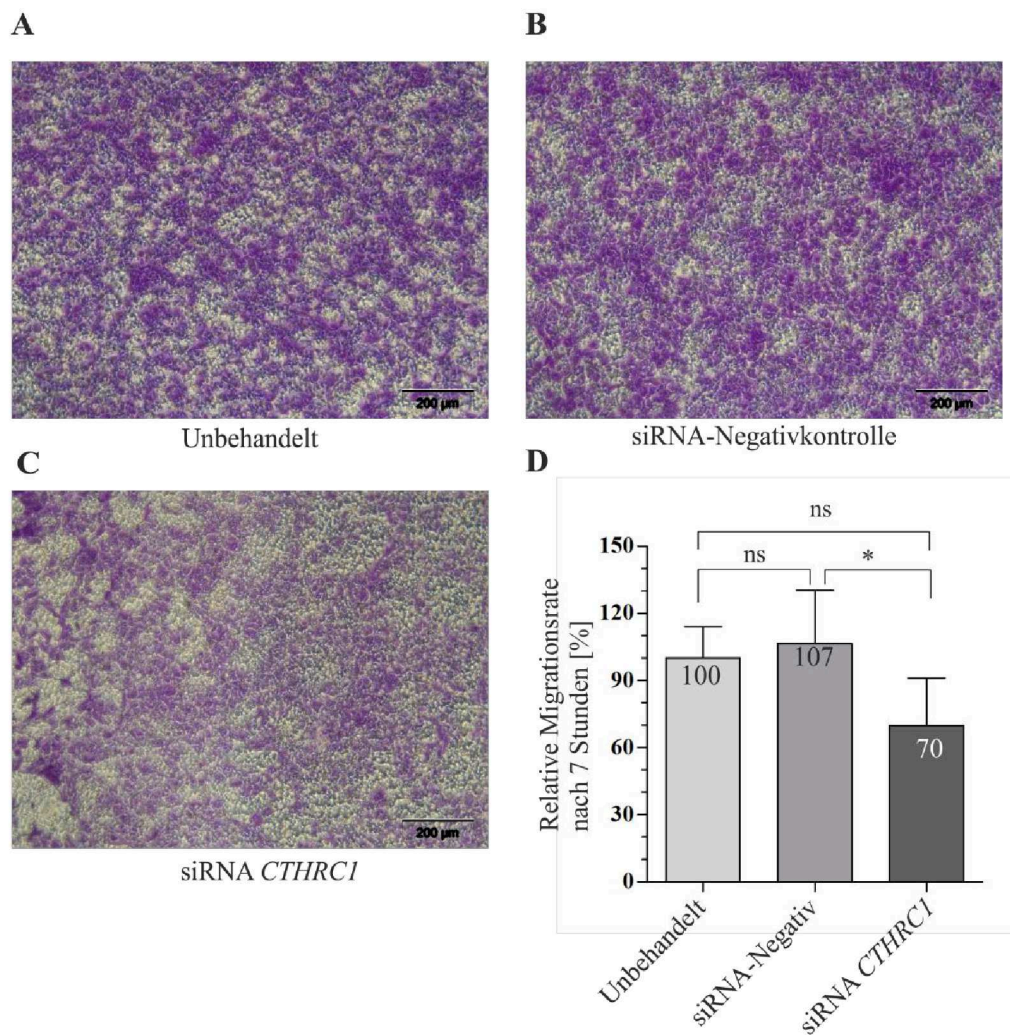


Abbildung 3-25: Der Einfluss von CTHRC1 auf das Migrationsverhalten humaner BT549-Brustkrebszellen. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen migrierter BT549-Zellen auf der Unterseite der Polycarbonat-Membran des (A) unbehandelten, (B) mittels Negativkontroll-siRNA und (C) *CTHRC1*-spezifischer siRNA behandelten Ansatzes nach Fixierung und Anfärbung. (D) Vergleichende Darstellung der relativen Migrationsraten der drei Versuchsgruppen nach 7-stündiger Migration. Abgebildet ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen (zweimal in Zweifach-, einmal in Dreifachbestimmung; jeweils n=7). Normiert wurde auf den Mittelwert der Migrationsrate der unbehandelten Wildtypzellen (100%). *: P < 0,05; ns = nicht signifikant (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

Für die Analyse des Migrationsverhaltens wurden Zellen der Testgruppe sowie beider Kontrollgruppen zunächst durch FKS-Entzug im Medium ausgehungert und anschließend in FKS-freiem Medium in die obere Kammer der Transwell-Einsätze ausgesät. Das in der unteren Kammer befindliche 10% FKS-haltige Medium führte zur anschließenden Migration in Richtung des chemotaktischen Reizes durch die Membran. Die auf der Unterseite der Membran haftenden Zellen wurden, nach gründlicher Entfernung aller nicht-migrierten Zellen in der oberen Kammer, fixiert und angefärbt. Die schließlich herausgelöste Menge an Farbstoff ist proportional zur Anzahl migrierter Zellen und wurde durch Vermessung der Absorption

quantifiziert. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche (zweimal in Zweifach-, einmal in Dreifachbestimmung) durchgeführt.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des 2D-Wundheilungstests (siehe Abbildung 3-24) wurde eine reduzierte Migrationsrate der Testgruppe (siRNA *CTHRC1*) im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen beobachtet. Die Abbildung 3-25A bis C zeigen exemplarische mikroskopische Aufnahmen fixierter, angefärbter Zellen auf der Unterseite der Transwell-Einsätze aller drei Versuchsgruppen nach 7-stündiger Migration. Die Normierung erfolgte schließlich auf die mittlere Migrationsrate der unbehandelten Kontrollgruppe (100%). So ergab sich eine Reduktion der mittleren Migrationsrate der Testgruppe um 30% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe sowie eine im Mittel um 37% signifikant ($P < 0,05$) verminderte Migrationsrate der Testgruppe relativ zur siRNA-Negativkontrolle (Abbildung 3-25D).

3.2.4 Der Kandidat NMU

Erst kürzlich, während der Entstehung der vorliegenden Arbeit, wurde NMU erstmalig als möglicher prädiktiver und prognostischer Biomarker für einen ungünstigen Verlauf der HER2-positiven Brustkrebserkrankung beschrieben [235]. Erste funktionelle Daten von Rani *et al.* im humanen Mammakarzinom sowie die existierender Studien zu NMU in anderen Krebsentitäten, deuten auf eine mögliche progressionsfördernde Rolle des Proteins in der Krebserkrankung hin [231–234]. In der vorliegenden Dissertation wurde ursprünglich eine erstmalige Untersuchung der möglichen prognostischen Relevanz von NMU für das humane Mammakarzinom sowie des Einflusses auf fundamentale Eigenschaften humaner Brustkrebszellen angestrebt. Darüber hinaus sollten erstmals mögliche über NMU im Mammakarzinom modulierte Signalwege im *in vitro*-Tumormodell mittels *Microarray*-Technologie identifiziert werden.

3.2.4.1 Analyse der NMU-Expression in humanen Brusttumoren

Eine Subtyp-spezifische mRNA-Expressionsanalyse für *NMU* wurde bereits im Zuge dieser Arbeit erstmalig durchgeführt (siehe Tabelle 3-6). Es konnte eine deutliche Aufregulation der *NMU*-Expression in den IHC- und/oder FISH-klassifizierten HER2-positiven bzw. triple-negativen Brustkrebs-Fällen gegenüber der Normalgewebe-Expression herausgestellt werden. Für eine detaillierte Analyse der *NMU*-Expression in den molekularen Brustkrebs-Subtypen wurden RNA-*HiSeq*-Expressionsdaten des Datenportals TCGA [237, 238] herangezogen (siehe Abschnitt 2.1.4.). Der *in silico*-Datensatz umfasste 516 PAM50-klassifizierte Brustkrebs-Fälle und 113 Normalgewebe der Brust (Abbildung 3-26).

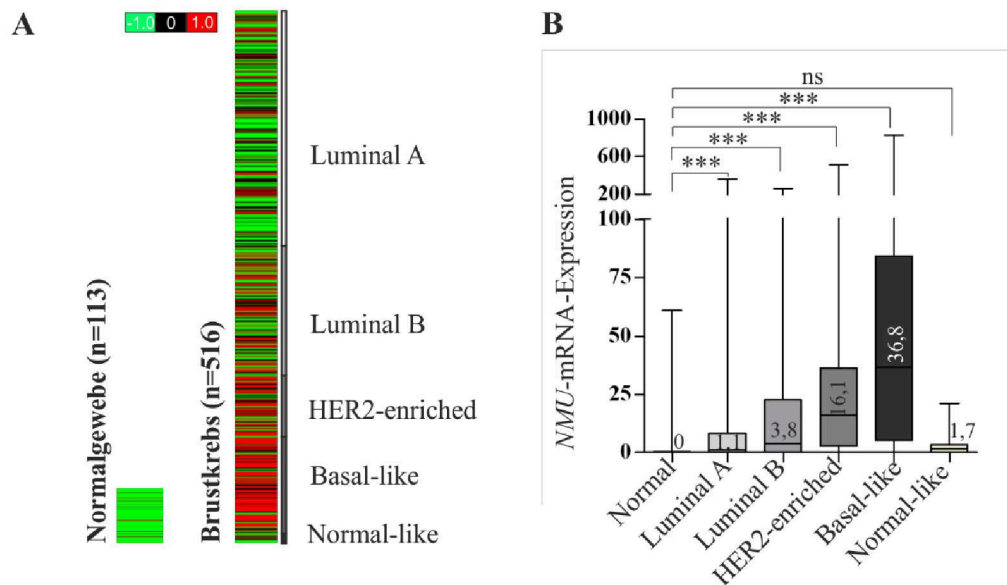


Abbildung 3-26: NMU-mRNA-Expression im Brust-Normalgewebe und PAM50-klassifizierten Brustkrebs-Fällen. *In silico*-NMU-mRNA-Expressionsanalyse in 516 PAM50-klassifizierten Brusttumoren und 113 Normalgeweben der Brust des TCGA-Datenportals. Die Expressionsdaten sind als (A) *Heat-Map* und (B) *Box-Plot* dargestellt. Rot: hohe, schwarz: intermediäre, grün: niedrige NMU-mRNA-Expression. Horizontale Linien der *Box-Plots*: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der einzelnen Gruppen sind in der *Box-Plot*-Darstellung abgebildet. ***: $P < 0,001$; ns: nicht signifikant (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

Mit Ausnahme der *normal-like* Fälle, wurde eine in allen weiteren Subtypen hochsignifikant (für alle $P < 0,001$) gesteigerte NMU-Expression gegenüber der in den Normalgeweben detektierten (mediane Expression: 0,0), beobachtet. In Übereinstimmung mit den eigenständig generierten mRNA-Expressionsdaten zeigte sich die stärkste, signifikante NMU-Expression in den Subtypen *HER2-enriched* und *Basal-like* (mittlerer FC gegenüber der Normalgewebe-Expression: 28,3 und 58,1). Zusätzlich konnte eine hochsignifikante Expressionssteigerung in den PAM50-klassifizierten luminalen Subtypen Luminal A und B des Mammakarzinoms herausgestellt werden (mittlerer FC gegenüber der Normalgewebe-Expression: 6,5 und 14,6).

Im Hinblick auf eine mögliche progressions-fördernde Rolle wurde zudem die NMU-Expression in Abhängigkeit von der Tumorgöße untersucht. Bemerkenswerterweise konnte eine verstärkte NMU-mRNA-Expression in größeren Brusttumoren beobachtet werden (Abbildung 3-27), was eine NMU-vermittelte Förderung von Eigenschaften suggeriert, die sich erst in späteren Tumorstadien als vorteilhaft erweisen. Im eigenständig generierten Mamma-Kryogewebe-Kollektiv (siehe Abschnitt 2.1.1) wurde eine signifikant ($P < 0,05$) erhöhte NMU-Expression in größeren Brusttumoren festgestellt (medianer FC: 3,3; Abbildung 3-27A), die

tendenziell ($P = 0,07$) im unabhängigen TCGA-*in silico*-Kollektiv (siehe Abschnitt 2.1.4) bestätigt werden konnte (medianer FC: 1,8; Abbildung 3-27B).

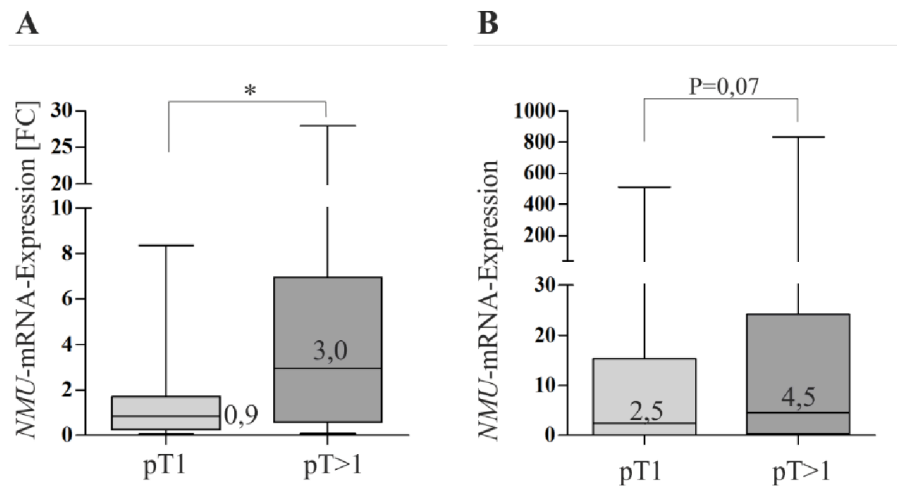


Abbildung 3-27: NMU-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Brusttumor-Größe. Die *Box-Plot*-Darstellung zeigt die NMU-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Größe der Brusttumoren (pT). (A) NMU-Expression in 62 Brusttumoren des Kryogewebe-Kollektivs. Die Normierung erfolgte auf die mediane Expression der Brust-Normalgewebe. *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. (B) NMU-Expression in 956 Brusttumoren des TCGA-Kollektivs. Horizontale Linien und Werte: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. *: $P < 0,05$ (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

3.2.4.2 Die Analyse der prognostischen Relevanz von NMU für das humane Mammakarzinom

Die anschließende Analyse der Prognose von Mammakarzinom-Patientinnen in Abhängigkeit von der NMU-Expression erfolgte unter Verwendung des Online-Programms *Kaplan-Meier Plotter* [276]. Das Programm diente der Berechnung univariater Kaplan-Meier-Überlebenskurven, basierend auf *Affymetrix*-Chip-Expressionsdaten für das analysierte Gen und den korrespondierenden Überlebensdaten der Brustkrebsfälle über einen Zeitraum von 120 Monaten. Der Subtypisierung der Brustkrebs-Fälle (Luminal A, Luminal B, HER2-positiv, Basal) liegt die Bestimmung der Proteinexpression von ESR1, HER2 und MKI67 gemäß Konsens der St. Gallen-Konferenz 2013 zugrunde [31].

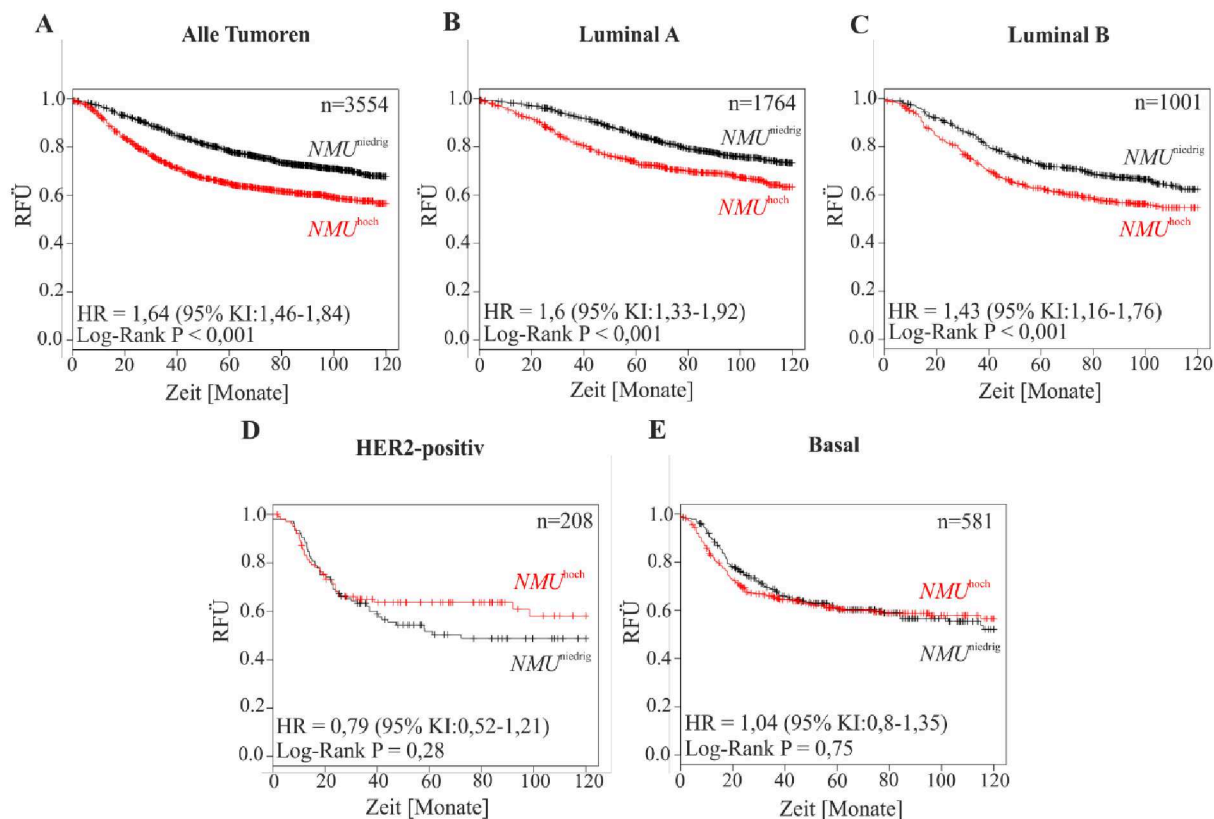


Abbildung 3-28: Eine erhöhte NMU-mRNA-Expression in Brusttumoren des luminalen Subtyps ist mit einem verringerten Rezidiv-freien Überleben (RFÜ) assoziiert. Univariate Kaplan-Meier-Überlebenskurven illustrieren das Rezidiv-freie Überleben von Patientinnen mit niedriger (schwarze Kurven) in Relation zu Patientinnen mit hoher NMU-mRNA-Expression (rote Kurven) in (A) allen Brustkrebs-Fällen, Tumoren des Subtyps (B) Luminal A, (C) Luminal B, (D) HER2-positiv und (E) Basal. Die Dichotomisierung in die Expressions-Gruppen „NMU niedrig“ und „NMU hoch“, erfolgte am Median der mRNA-Expressionswerte für NMU. Vertikale Linien: zensierte Fälle. HR: Hazard-Rate, KI: Konfidenzintervall.

Zunächst wurde das Rezidiv-freie Überleben (RFÜ) in insgesamt 3554 Brustkrebs-Fällen in Abhängigkeit von der NMU-Expression analysiert. Dabei waren sowohl lokale, regionale und ferne Rezidive in die Analyse eingeschlossen. [277]. Unter Berücksichtigung aller Brustkrebs-Fälle stellte sich heraus, dass eine erhöhte NMU-mRNA-Expression hochsignifikant ($P < 0,001$) mit einem verringerten RFÜ assoziiert war (Abbildung 3-28A). Die Stratifizierung der Brustkrebs-Kohorte nach Brustkrebs-Subtyp offenbarte, dass eine erhöhte NMU-Expression einen prognostischen Faktor für einen ungünstigen Verlauf von Mammakarzinomen des luminalen Subtyps darstellt (Abbildung 3-28B und C; für beide $P < 0,001$), jedoch nicht signifikant mit dem RFÜ der nicht-luminalen (HER2-positive, basale) Fälle assoziiert ist (Abbildung 3-28D und E).

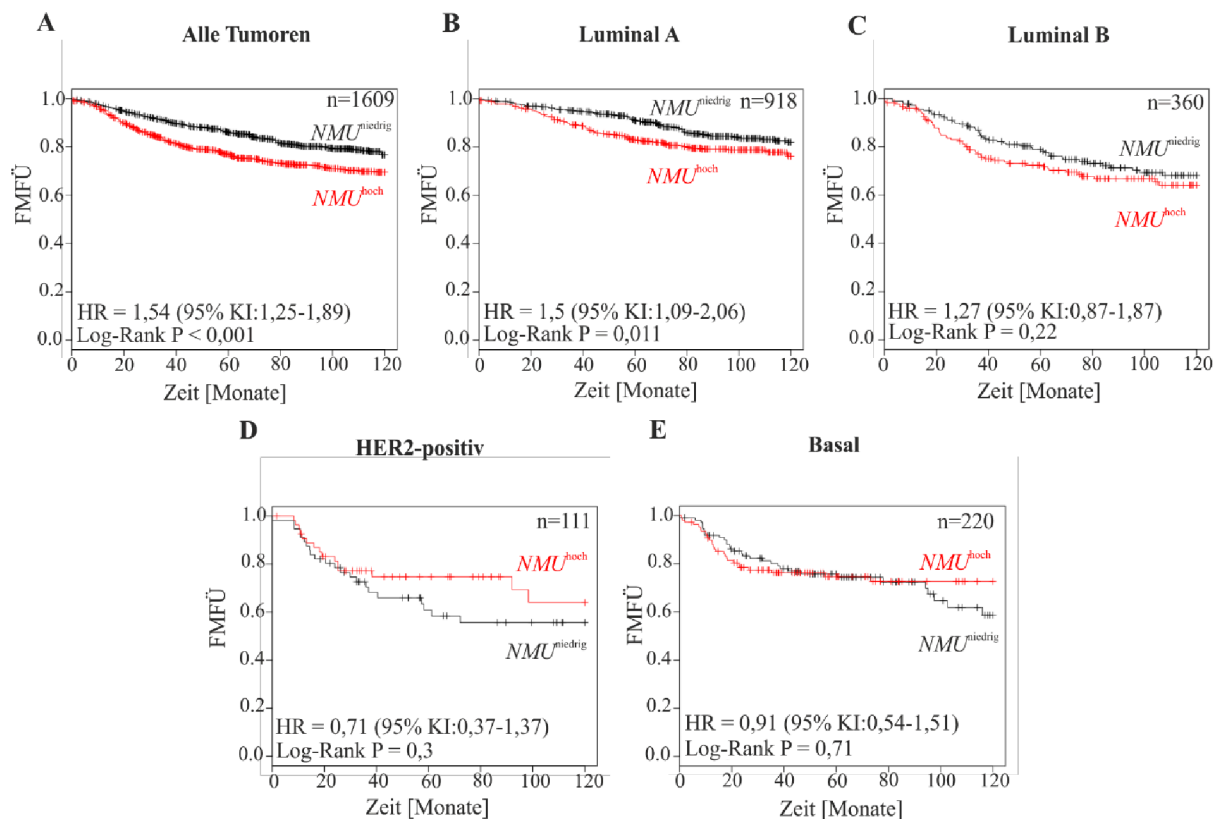


Abbildung 3-29: Eine erhöhte *NMU*-mRNA-Expression in Brusttumoren des luminalen Subtyps ist mit einem verringerten Fernmetastasen-freies Überleben (FMFÜ) assoziiert. Univariate Kaplan-Meier-Überlebenskurven illustrieren das Fernmetastasen-freies Überleben von Patientinnen mit niedriger (schwarze Kurven) in Relation zu Patientinnen mit hoher *NMU*-mRNA-Expression (rote Kurven) in (A) allen Brusttumoren, Tumoren des Subtyps (B) Luminal A, (C) Luminal B, (D) HER2-positiv und (E) Basal. Die Dichotomisierung in die Expressions-Gruppen „*NMU* niedrig“ und „*NMU* hoch“ erfolgte am Median der mRNA-Expressionswerte für *NMU*. Vertikale Linien: zensierte Fälle. HR: Hazard-Rate, KI: Konfidenzintervall.

Um ein genaueres Maß für eine mögliche Involvierung von *NMU* in die Progression (Metastasierung) des humanen Mammakarzinoms zu erhalten, wurde zusätzlich der Einfluss von *NMU* auf das Fernmetastasen-freies Überleben (FMFÜ) in insgesamt 1609 Brustkrebs-Fällen über einen Zeitraum von 120 Monaten untersucht. Lokale und regionale Rezidive wurden in dieser Analyse folglich nicht berücksichtigt [277]. Unter Einschluss aller Brusttumoren zeigte sich auch für das FMFÜ eine hochsignifikante ($P < 0,001$) Assoziation einer erhöhten *NMU*-Expression mit einer schlechteren Prognose (Abbildung 3-29A). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Daten für das RFÜ konnte eine erhöhte *NMU*-Expression in luminalen Brustkrebs-Fällen als prognostischer Faktor für einen ungünstigen Verlauf identifiziert werden (Abbildung 3-29B und C). Ein signifikanter Einfluss der *NMU*-Expression auf die Prognose wurde hier allerdings nur im Subtypen Luminal A beobachtet ($P = 0,011$). Wie für das RFÜ gezeigt, konnte kein signifikanter Einfluss der *NMU*-Expression auf das

FMFÜ der nicht-luminalen Fälle (HER2-positiv, basal) beobachtet werden (Abbildung 3-29D und E).

3.2.4.3 Generierung stabiler *in vitro*-Mammakarzinom-Modelle

Die prognostischen Daten der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse sowie eine verstärkte NMU-Expression in größeren Brusttumoren, lieferten erste Hinweise auf potentielle progressionsfördernde Eigenschaften von NMU im luminalen Mammakarzinom.

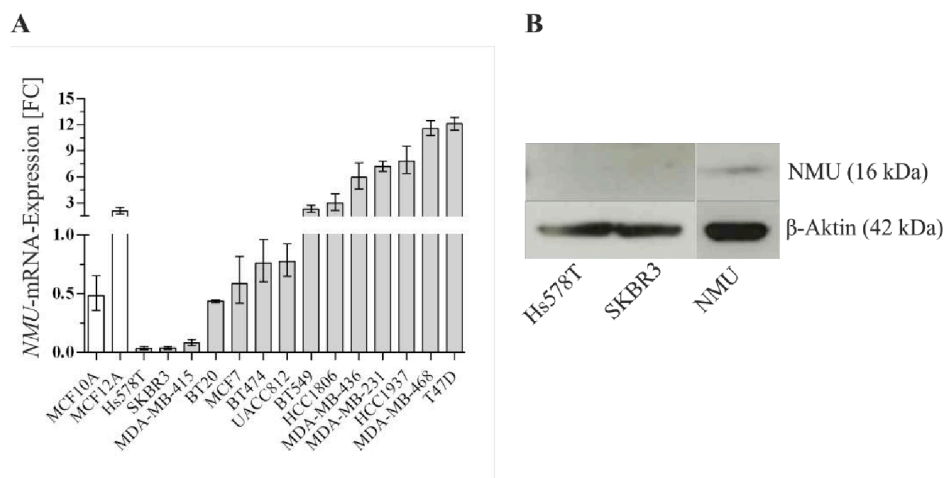


Abbildung 3-30: NMU-Expression auf mRNA- und Proteinebene in humanen Mammakarzinom-Zelllinien. (A) *NMU*-mRNA-Expression in 14 malignen Mammakarzinom- (graue Balken) und 2 benignen Brust-Zelllinien (weiße Balken). Die *NMU*-Expression aller Zelllinien wurde auf die mittlere Expression des Gens in den beiden benignen Zelllinien MCF10A und MCF12A normiert. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Balken: $\pm$ SEM der Dreifachbestimmung. FC: *Fold-Change* (B) Darstellung der NMU-Proteinexpression in den wildtypischen Zelllinien Hs578T und SKBR3 sowie nach forcierter NMU-Expression in der Zelllinie Hs578T (NMU). Als Ladekontrolle fungierte β -Aktin.

Um nachfolgend zu überprüfen, ob die prognostischen Daten eine onkogene Wirkung des NMU-Proteins auf Mammakarzinom-Zellen widerspiegeln, sollten stabil genetisch-veränderte *in vitro*-Tumormodelle generiert werden. Neben einem luminalen Modell sollte ein basales *gain-of-function*-Modell erzeugt werden. Als geeignete Zellkultur-Modelle wurden die luminalen Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3 sowie die basale Zelllinie Hs578T ausgewählt. Beide Zelllinien wiesen eine niedrige endogene *NMU*-mRNA-Expression auf (Abbildung 3-30A) und bildeten zudem kein nachweisbares endogenes NMU-Protein (Abbildung 3-30B).

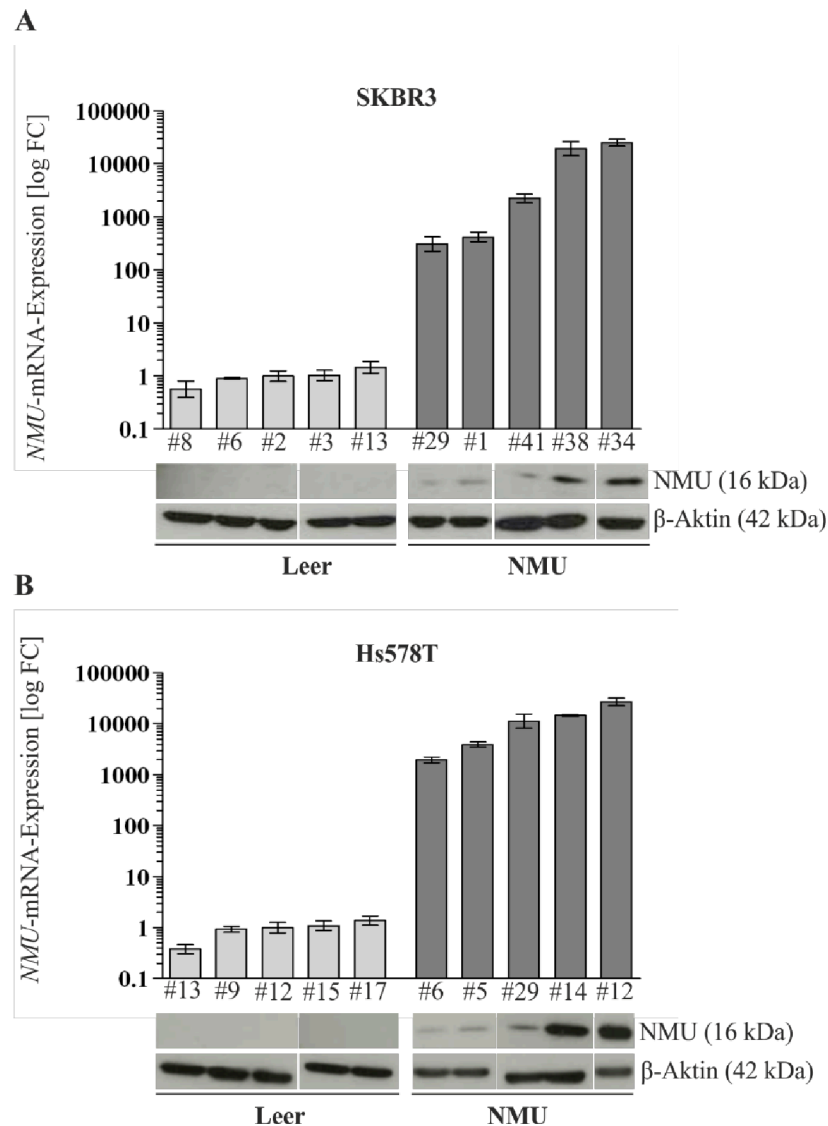


Abbildung 3-31: NMU-mRNA und Protein-Expression in den stabil transfizierten humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. (A und B) Oberer Graph: Darstellung der NMU-mRNA-Expression in jeweils fünf mittels Leervektor (hellgraue Balken) bzw. NMU-Überexpressionsvektor (dunkelgraue Balken) transfizierten Einzelklonen der Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. Die NMU-mRNA-Expression aller Klone der jeweiligen Zelllinie wurde auf die mediane Expression der Leervektor-Kontrollen normiert. *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Vertikale Linien: $\pm$ SEM der Dreifachbestimmung. FC: *Fold Change*. Unten: Western Blot zeigt die korrespondierende NMU-Proteinexpression in den Leervektor (Leer)- und den NMU-Vektor (NMU)-Einzelklonen. Als Ladekontrolle fungierte β -Aktin. Ausschließlich in den mittels NMU-Überexpressionsvektor transfizierten Einzelklonen beider Zelllinien konnte NMU-Protein nachgewiesen werden.

Für die ektopische NMU-Expression in beiden Zelllinien wurde der Vektor pT-REx-DEST30-NMU genutzt, in welchem die Vollängen-NMU-cDNA unter transkriptioneller Kontrolle eines *CMV*-Promotors stand. Als Negativkontrolle erfolgte eine Transfektion mithilfe des gleichen Vektorkonstruktes ohne inserierte cDNA (Leervektor) (siehe Abschnitt 2.17.5). Die Generierung stabiler Klone sowie Durchführung der *in vitro*-Experimente erfolgte unter

Mitwirkung der Master-Studentinnen Natalie Klotz und Sabrina Szczepanski unter meiner Betreuung.

Nach erfolgreicher Isolation stabil genomisch-veränderter Leervektor- und NMU-Einzelklone, wurde ihre NMU-Expression auf mRNA- und Proteinebene analysiert (Abbildung 3-31). Lediglich in den NMU-Einzelklonen beider Zelllinien konnte NMU-Protein erfolgreich nachgewiesen werden. Als interne Spezifitäts-Kontrolle für mögliche phänotypische Effekte wurden bewusst NMU-Einzelklone mit variierender Proteinexpressions-Stärke ausgewählt. Im Folgenden wurden die generierten NMU-Tumormodelle der Zelllinien SKBR3 und Hs578T genutzt, um den Einfluss von NMU auf fundamentale Eigenschaften der Krebszellen zu untersuchen [37, 38].

3.2.4.4 Der Einfluss von NMU auf das Zellwachstum humaner Mammakarzinomzellen

Der Verlust der Zellzykluskontrolle ist ein frühes Ereignis während der Tumorgenese und resultiert in einer gesteigerten Zellproliferation [37]. Der verwendete XTT-Test basiert auf Reduktion des Tetrazolium-Salzes XTT zu einem wasserlöslichen, organgefarbenen Formazan-Salz mittels des mitochondrialen Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems in metabolisch-aktiven (vitalen) Zellen. Die Menge gebildeten Formazans korreliert direkt mit der Anzahl vitaler Zellen im analysierten Ansatz und lässt sich mittels Absorptionsmessung quantifizieren. Es ist zu berücksichtigen, dass somit keine direkte Messung der Proliferation erfolgte, sondern die Anzahl vorhandener lebender Zellen (Zellviabilität) im Ansatz bestimmt wurde. Nach Aussaat der gleichen Zellzahl für jeden Versuchsansatz erfolgte die Messung der Absorption alle 24 Stunden über einen Zeitraum von insgesamt 4 Tagen. Die gemessenen Absorptionswerte jedes Ansatzes wurden auf den jeweiligen Messwert zum Zeitpunkt 24 Stunden normiert, um mögliche Abweichungen bei der Zellaussaat zu korrigieren. Für beide *in vitro*-Tumormodelle (SKBR3 und Hs578T) wurden drei unabhängige Versuche mit jeweils fünf unabhängigen Leervektor- und NMU-Klonen durchgeführt.

In Abbildung 3-32A und C sind die gemittelten, viertägigen Verlaufskurven für jeden Einzelklon des SKBR3- und Hs578T-Tumormodells dargestellt. Für beide Tumormodelle wurde eine nach 96 Stunden im Median reduzierte Zellviabilität der NMU-Klone gegenüber den Leervektor-Kontrollen beobachtet. Die Reduktion für das SKBR3-Modell betrug im Median 11% und war grenzwertig signifikant (Abbildung 3-32B; $P = 0,06$), hingegen wurde eine im Median nicht signifikante, um 18% verminderte Anzahl vitaler Zellen im Hs578T-Modell festgestellt (Abbildung 3-32D).

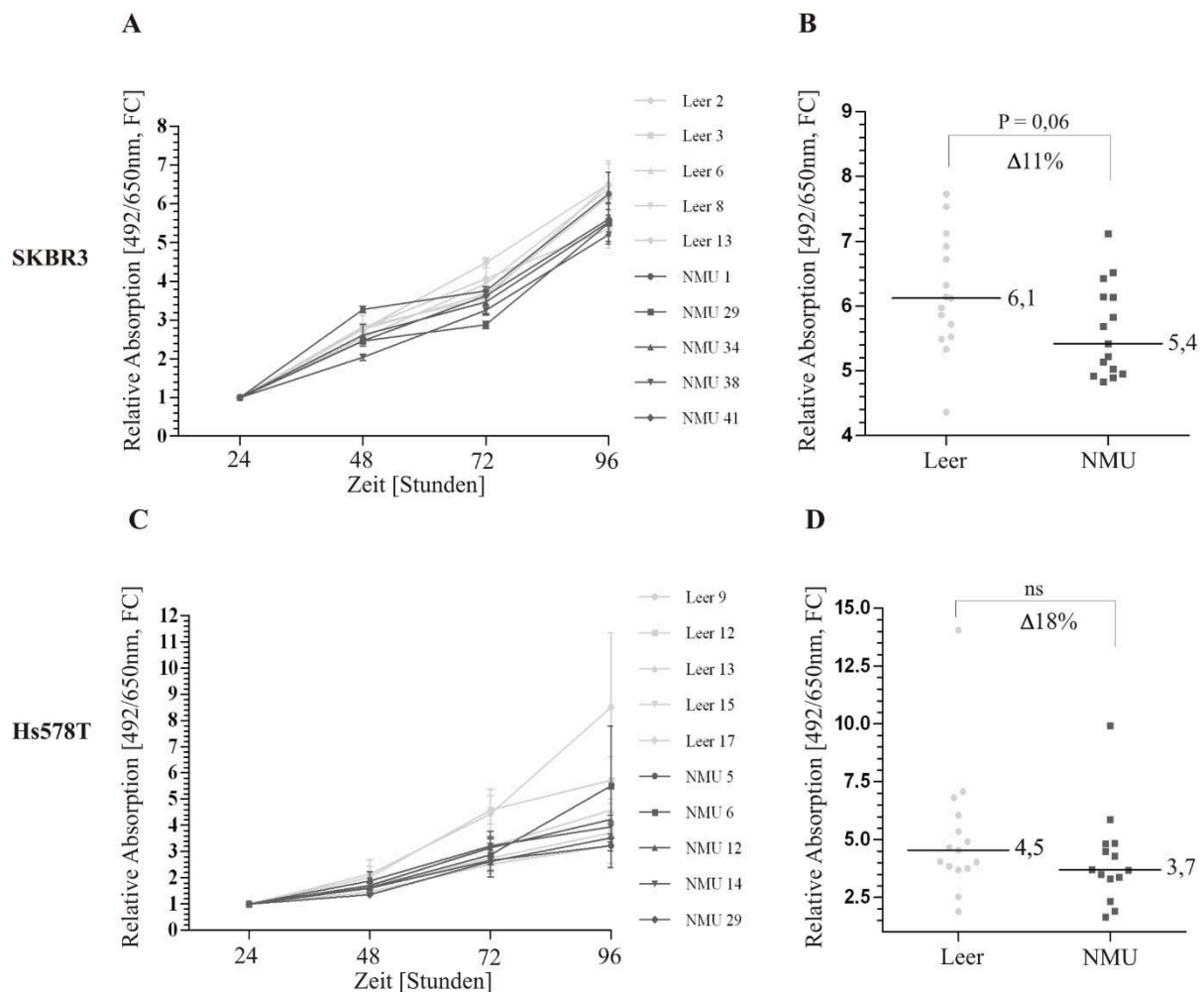


Abbildung 3-32: Der Einfluss von NMU auf das Zellwachstum der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. Die kolorimetrische Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen erfolgte mittels Absorptionsmessung (492 nm/650nm) über einen Zeitraum von 96 Stunden und wurde für jeweils fünf unabhängige Leervektor (hellgraue Kurven)- und NMU-Einzelklone (dunkelgraue Kurven) der Zelllinien (A) SKBR3 und (C) Hs578T in jeweils drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Vertikale Linien: $\pm$ SEM der Dreifachbestimmung. Die Absorptionswerte jeder Versuchsreihe wurden auf den 24-Stunden-Wert normiert. Scatter-Plot-Darstellung der Änderung der Anzahl vitaler Zellen nach 96 Stunden für jeweils fünf unabhängige Leervektor- und NMU-Einzelklone der Zelllinien (B) SKBR3 und (D) Hs578T in Dreifachbestimmung. ns: nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig).

3.2.4.5 Der Einfluss von NMU auf die Koloniebildung humaner Mammakarzinomzellen

Neben dem XTT-Assay wurde der Koloniebildungs-Test (engl. *Colony Formation Assay*, CFA) als weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Zellwachstums herangezogen. Um das Koloniebildungsvermögen der beiden NMU-*gain-of-function*-Modelle (SKBR3 und Hs578T) zu charakterisieren, wurden je Einzelklon in Dreifachbestimmung 1000 Zellen pro Kavität einer 6-Well-Kulturschale ausgesät und das Koloniewachstum nach 14-tägiger Kultivierung analysiert. Für beide Modelle wurden jeweils drei unabhängige Versuche mit je fünf unabhängigen Leervektor- und NMU-Klonen durchgeführt.

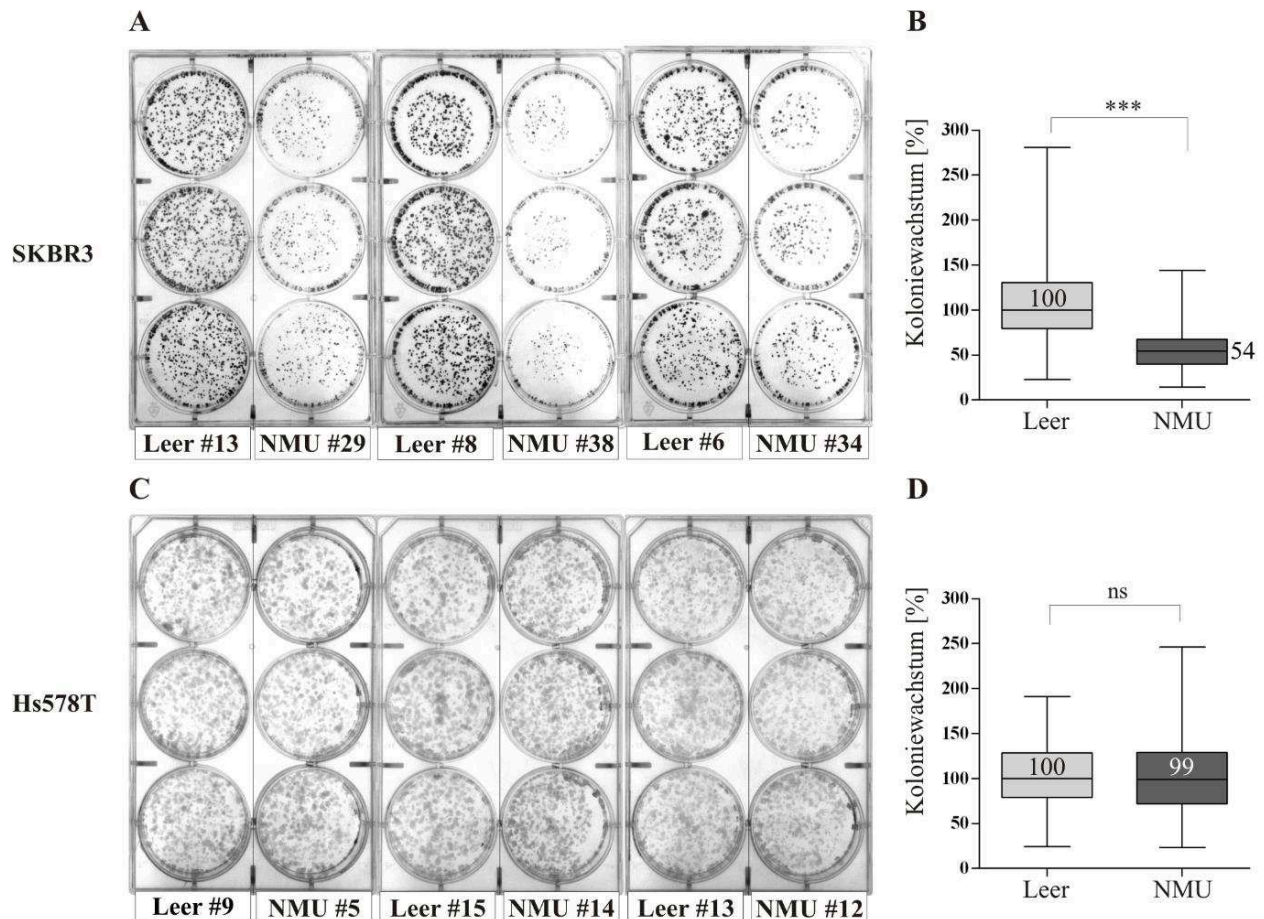


Abbildung 3-33: Der Einfluss von NMU auf das Koloniewachstum der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. Repräsentative Aufnahmen fixierter, angefärbter Kolonien in 6-Well-Zellkulturschalen nach 14-tägiger Kultivierung. Gezeigt ist die Koloniebildung (in Dreifachbestimmung) für jeweils drei Leervektor (Leer)- und NMU-Klone (NMU) des (A) SKBR3- und (C) Hs578T-Modells. Die Box Plot-Analyse (drei unabhängige Versuche mit jeweils fünf unabhängigen Leervektor- und NMU-Einzelklonen) nach densitometrischer Auswertung des Koloniewachstums zeigt ein hochsignifikant reduziertes Koloniebildungsvermögen infolge forcierter NMU-Expression im (B) SKBR3-Modell, hingegen keinen signifikanten Unterschied im Koloniewachstum zwischen beiden Versuchsgruppen im (D) Hs578T-Modell. Die Normierung erfolgte jeweils auf das mediane Koloniewachstum der Leervektor-Kontrollen. Horizontale Linien der Box Plots: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der einzelnen Gruppen sind in der Box Plot-Darstellung abgebildet ***: $P < 0,001$; ns: nicht signifikant (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

Wohingegen nach zweiwöchiger Kultivierungszeit ein makroskopisch deutlich reduziertes Koloniewachstum infolge forcierter NMU-Expression im SKBR3-Modell beobachtet werden konnte (Abbildung 3-33A), war kein sichtbarer Unterschied in der Koloniebildung zwischen Test- und Kontrollgruppe des Hs578T-Modells festzustellen (Abbildung 3-33C). Die semiquantitative, densitometrische Auswertung des Koloniewachstums bestätigte die makroskopisch sichtbaren, qualitativen Beobachtungen. Die ektopische NMU-Expression resultierte im SKBR3-Modell in einer hochsignifikant ($P < 0,001$) verminderten Koloniebildungsfähigkeit (Abbildung 3-33B). Im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen,

deren medianes Koloniewachstum zwecks Normierung gleich 100% gesetzt wurde, war die Koloniebildung der NMU-Klone im Median um 46% auf 54% reduziert. Für das Hs578T-Modell konnte nach densitometrischer Auswertung hingegen kein signifikant verändertes Koloniewachstum zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 3-33D). Bei Festlegung des medianen Koloniewachstums der Leervektor-Kontrollen auf 100%, ergab sich für die NMU-Klone im Vergleich eine mediane Koloniebildung von 99%.

3.2.4.6 Der Einfluss von NMU auf die Apoptose humaner Mammakarzinomzellen

Im XTT-Test (Abbildung 3-32) zeigte sich bereits eine grenzwertig signifikante ($P = 0,06$) Reduktion des Zellwachstums infolge forcierter NMU-Expression im SKBR3-Modell. Eine Bestätigung dieser Beobachtung konnte schließlich im Koloniebildungstest über einen längeren Kultivierungszeitraum von 14 Tagen erbracht werden. Hier resultierte die ektopische NMU-Expression im luminalen SKBR3-Modell in einer hochsignifikant ($P < 0,001$) verminderten Koloniebildungsfähigkeit (Abbildung 3-33). Im Folgenden galt es zu klären, ob die NMU-vermittelte Wachstumsreduktion das Resultat einer gehemmten Zellproliferations- oder einer erhöhten Apoptoserate beziehungsweise einer Modulation beider Prozesse darstellt. Als Maß für die Apoptoserate in den stabilen SKBR3 NMU-Klonen und Kontrollen wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 [281] mithilfe des *ApoOne® Homogeneous Caspase-3/7 Assay* (Promega) entsprechend den Herstellerangaben ermittelt. Die Detektion aktiver Caspase 3/7 beruht auf Umwandlung eines nicht-fluoreszierenden Rhodamin-Derivats in den Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin110. Die an einem ELISA-Reader quantifizierbare Fluoreszenz korreliert mit der als Apoptose-Maß geltenden Caspase 3/7-Aktivität. Die Apoptose wurde mittels Staurosporin-Applikation induziert [282]. Ansätze ohne Staurosporin fungierten als Negativkontrollen.

Das Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils fünf unabhängigen Leervektor- und NMU-Einzelklonen ist in Abbildung 3-34 dargestellt. Es zeigte sich keine signifikant differentielle Caspase 3/7-Aktivität (Apoptoserate) zwischen Test- und Kontrollgruppe des SKBR3-Modells. Die mediane Aktivität der Caspasen 3 und 7 in den Leervektor-Kontrollen wurde gleich 100% gesetzt, so dass sich in den NMU-Klonen im Vergleich eine mediane Aktivität von 96% ergab. Es wurde folglich angenommen, dass die beobachtete NMU-vermittelte Wachstumsreduktion im luminalen SKBR3-Modell, auf eine verminderte Zellproliferation zurückzuführen ist.

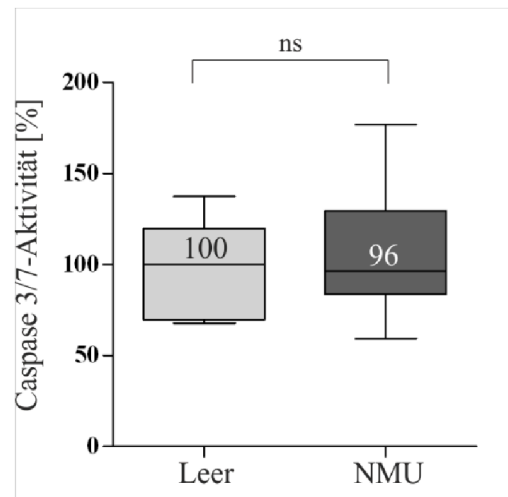


Abbildung 3-34: Der Einfluss von NMU auf die Apoptose in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3. Als Maß für die Apoptoserate wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 nach 24-stündiger Apoptose-Induktion mittels Staurosporin (1 μ M) bestimmt. Dazu wurde die Fluoreszenzzunahme in einem Rhodamin-basierten Caspase-Assay (Anregung: 485 nm; Emission: 577 nm) ermittelt. Die *Box-Plot*-Analyse zeigte eine nicht-differentielle Caspase 3/7-Aktivität zwischen Test- und Kontrollgruppe des SKBR3-Modells. Gezeigt ist das Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils fünf unabhängigen Leervektor- und NMU-Einzelklonen. Die Normierung erfolgte auf die mediane Caspase 3/7-Aktivität der Leervektor-Kontrollen. Horizontale Linien: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der beiden Gruppen sind in der *Box-Plot*-Darstellung abgebildet. Ns: nicht signifikant (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

3.2.4.7 Der Einfluss von NMU auf die Migrationsfähigkeit humaner Mammakarzinomzellen

In einigen Krebsentitäten wie dem Pankreas-, Nieren- und kürzlich dem Mammakarzinom konnte eine NMU-vermittelte Steigerung progressionsfördernder Eigenschaften wie ein erhöhtes Migrations- und Invasionspotential der Krebszellen demonstriert werden [233–235]. Im Folgenden sollte untersucht werden, welchen Einfluss Neuromedin U auf das Migrationspotential luminaler (SKBR3) und basaler (Hs578T) Mammakarzinom-Zellen ausübt.

Dazu wurde ein 2D-Wundheilungstest (engl. *Wound Healing* bzw. *Scratch Assay*) durchgeführt, welcher die Fähigkeit der Zellen untersucht eine zellfreie Fläche (*Scratch*) zu besiedeln. Zur Erzeugung der zellfreien Fläche definierter Breite wurden sterile Silikonrahmen verwendet, welche jeweils zwei Teilkammern umgeben, die in der Mitte durch einen Steg voneinander getrennt sind.

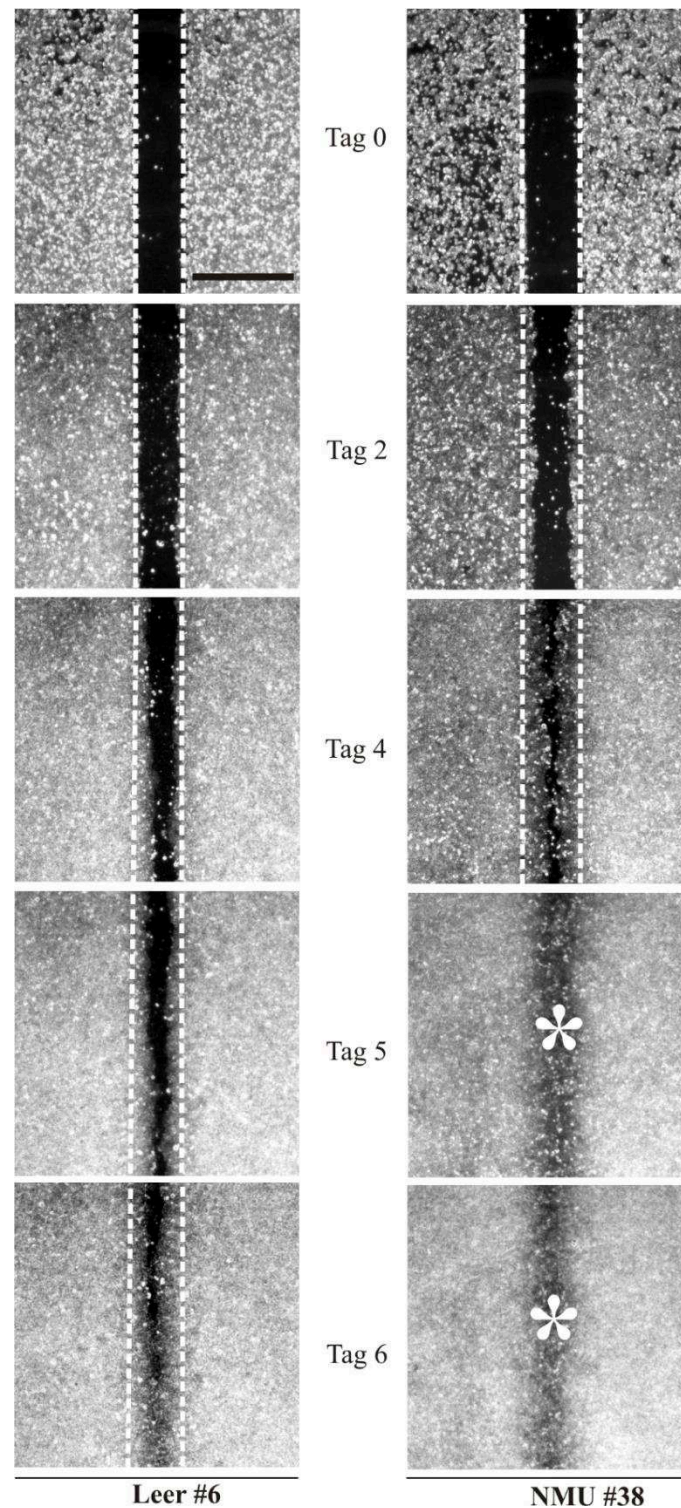


Abbildung 3-35: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests für den Leervektor-Klon #6 und den NMU-Klon #38 des SKBR3-Modells. Vergleichende, repräsentative Foto-Dokumentation der Besiedlung der zellfreien Fläche, dargestellt für den Leervektor-Klon #6 und den NMU-Klon #38 des SKBR3-Modells über einen Zeitraum von sechs Tagen. 25-fache Originalvergrößerung. Vertikale, gestrichelte Linien markieren den Rand der zellfreien Ausgangsfläche am Tag 0. Stern: vollständige Besiedlung der Fläche. Messbalken: 1000 μm .

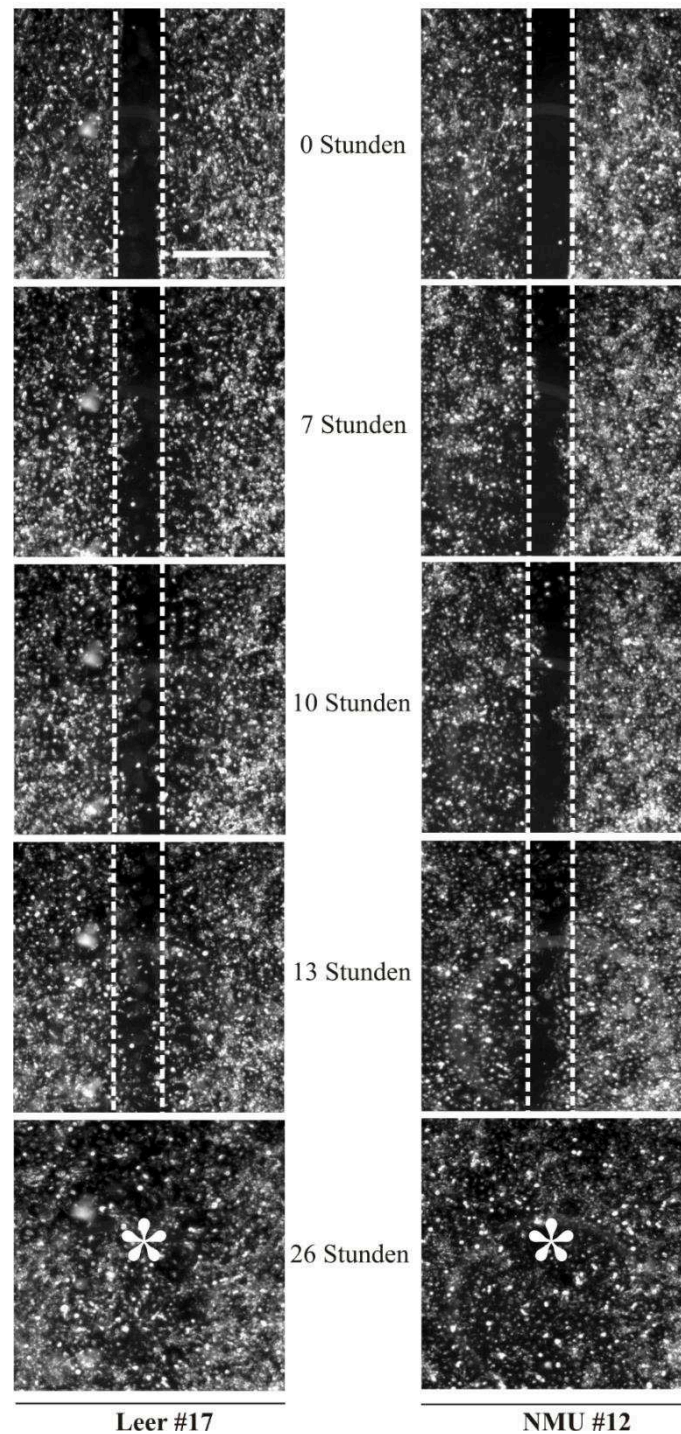


Abbildung 3-36: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests für den Leervektor-Klon #17 und den NMU-Klon #12 des Hs578T-Modells. Vergleichende, repräsentative Foto-Dokumentation der Besiedlung der zellfreien Fläche, dargestellt für den Leervektor-Klon #17 und den NMU-Klon #12 des Hs578T-Modells über einen Zeitraum von 26 Stunden. 25-fache Originalvergrößerung. Vertikale, gestrichelte Linien markieren den Rand der zellfreien Ausgangsfläche zum Zeitpunkt 0 Stunden. Stern: vollständige Besiedlung der Fläche. Messbalken: 1000 µm.

Je Teilkammer wurde eine entsprechende Zellzahl ausgesät, so dass nach ca. 24-stündiger Inkubation ein konfluenter, einschichtiger Zellrasen in beiden Teilkammern, und nach

Entfernung des Rahmens, eine die beiden Zell-Monolayer trennende, zellfreie Fläche entstand. Zur Erfassung eines möglichst großen Ausschnitts wurden die Aufnahmen des für jede Probe immer gleich gewählten Ausschnitts bei 25-facher Vergrößerung in definierten Zeitabständen durchgeführt. Die Werte für die zellfreie Fläche für jeden Messzeitpunkt wurden für jede Probe auf die jeweilige zellfreie Ausgangsfläche zum Messzeitpunkt $T = 0$ Tage/Stunden normiert. Für beide Modelle (SKBR3 und Hs578T) wurden drei unabhängige Versuche mit jeweils fünf unabhängigen Leervektor- und NMU-Einzelklonen durchgeführt.

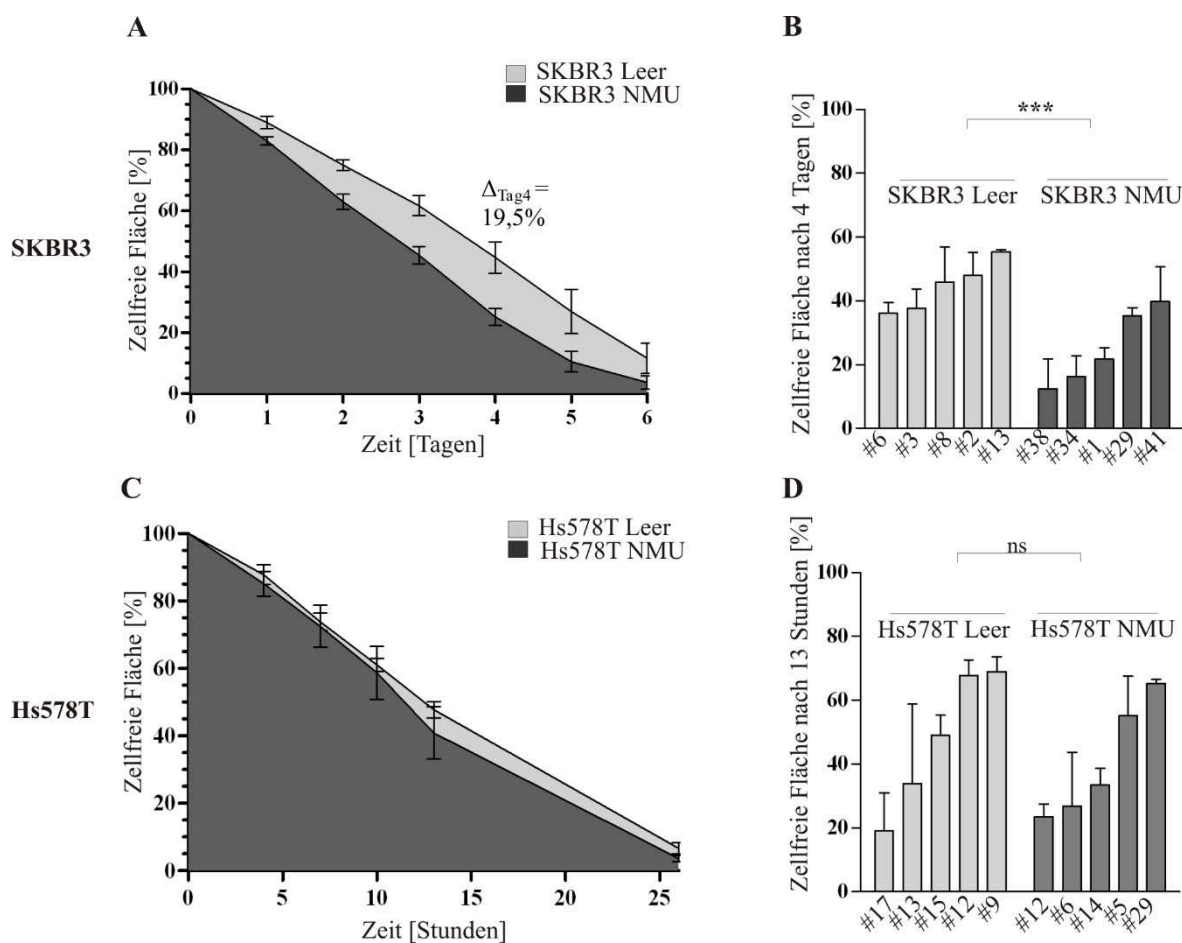


Abbildung 3-37: Der Einfluss von NMU auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. Vergleich des Wundschlusses von Leervektor (n=5; hellgraue Fläche)- und NMU-Einzelklonen (n=5; dunkelgraue Fläche) des (A) SKBR3- und (C) Hs578T-Modells über einen Zeitraum von sechs Tagen (SKBR3) bzw. 26 Stunden (Hs578T). Alle Werte wurden auf die zellfreie Ausgangsfläche zum Zeitpunkt $T=0$ normiert (100%). Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung der Dreifachbestimmung. Δ_{Tag4} : Differenz der zellfreien Flächen am Tag 4. Vergleich des Wundschlusses der Einzelklone des (B) SKBR3-Modells zum Zeitpunkt 4 Tage und (D) des Hs578T-Modells zum Zeitpunkt 13 Stunden. Vertikale Linien: $\pm$ Standardabweichung der Dreifachbestimmung. *** $P < 0,001$; ns: nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig).

Im luminalen SKBR3-Modell wurde eine beschleunigte Besiedlung der zellfreien Fläche in den NMU-Klonen im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen beobachtet. Die Dokumentation des

Wundschlusses erfolgte über einen Zeitraum von sechs Tagen und ist exemplarisch für den Leervektor-Klon #6 und den NMU-Klon #38 in Abbildung 3-35 dargestellt. Es ist anzumerken, dass trotz eines hochsignifikant reduzierten Zellwachstums der SKBR3 NMU-Klone (siehe Abbildung 3-33), ein beschleunigter Wundschluss im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen festgestellt wurde. Der beobachtete Phänotyp stellt folglich das Resultat einer erhöhten, NMU-vermittelten Migrationsfähigkeit der luminalen SKBR3-Zellen dar. Im Gegensatz dazu konnte kein sichtbarer Unterschied im Wundheilungs-Test zwischen Test- und Kontrollgruppe des basalen Hs578T-Modells verzeichnet werden. Die Dokumentation des Wundschlusses erfolgte hier über einen Zeitraum von 26 Stunden und ist repräsentativ für den Leervektor-Klon #17 und den NMU-Klon #12 in Abbildung 3-36 dargestellt.

Die statistische Auswertung bestätigte die qualitativen Beobachtungen. Für das SKBR3-Modell ergab sich zu jedem einzelnen Zeitpunkt über den gesamten Dokumentations-Zeitraum von sechs Tagen eine im Mittel signifikante Differenz im Wundschluss zwischen NMU-Klonen und Leervektor-Kontrollen, die auf eine NMU-vermittelte Migrationssteigerung hindeutet. Die größte, signifikante ($P < 0,001$) Differenz in der zellfreien Fläche zwischen den beiden Versuchsgruppen betrug im Mittel 19,5% und wurde an Tag vier der Messreihe verzeichnet (Abbildung 3-37A und B). Für das Hs578T-Modell konnte hingegen zu keinem Messpunkt der Dokumentationsreihe über 26 Stunden eine signifikante Differenz in der zellfreien Fläche zwischen Leervektor- und NMU-Klonen festgestellt werden (Abbildung 3-37C und D).

3.2.4.8 Der Einfluss von NMU auf die Zell-Matrix-Adhäsion humaner Mammakarzinomzellen

Nachdem ein migrationsfördernder Effekt von Neuormedin U auf Zellen der luminalen Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3 im Wundheilungstest herausgestellt werden konnte (siehe Abbildung 3-37), galt es im Folgenden eine mögliche zusätzliche Modulation der adhäsiven Eigenschaften beider Tumormodelle (SKBR3 und Hs578T) zu untersuchen. Eine deregulierte Zell-Matrix-Adhäsion stellt, neben der Veränderung migratorischer Eigenschaften, ein weiteres progressions-assoziiertes Charakteristikum invasiver Tumorzellen dar [279]. Epithelzellen sind in ihrer physiologischen Umgebung an einer Basalmembran verankert, die sie vom Stroma abtrennt. Zur Simulation der *in vivo*-Situation wurden 6-Well-Platten mit *MatrigelTM Basement Membrane Matrix* beschichtet, welches reich an extrazellulären Komponenten wie Laminin und Kollagen IV (zwei Hauptbestandteilen der natürlichen Basalmembran) ist. Die mögliche NMU-modulierte Zell-Matrix-Adhäsion der Mammakarzinomzellen wurde untersucht, indem eine definierte Zellzahl für einen Zeitraum von einer Stunde auf die mit Matrigel beschichteten

Platten ausgesät wurde. Durch anschließendes Waschen wurden nicht-adhärenente Zellen entfernt, darauffolgend adhärenente Zellen fixiert und mit Kristallviolett-Lösung angefärbt. Die Menge des darauf herausgelösten Zell-gebundenen Farbstoffs ist proportional zur Anzahl adhärenenter Zellen und konnte an einem ELISA-Reader quantifiziert werden. Für beide Zellmodelle wurden drei unabhängige Versuche mit jeweils fünf unabhängigen Leervektor- und NMU-Einzelklonen durchgeführt.

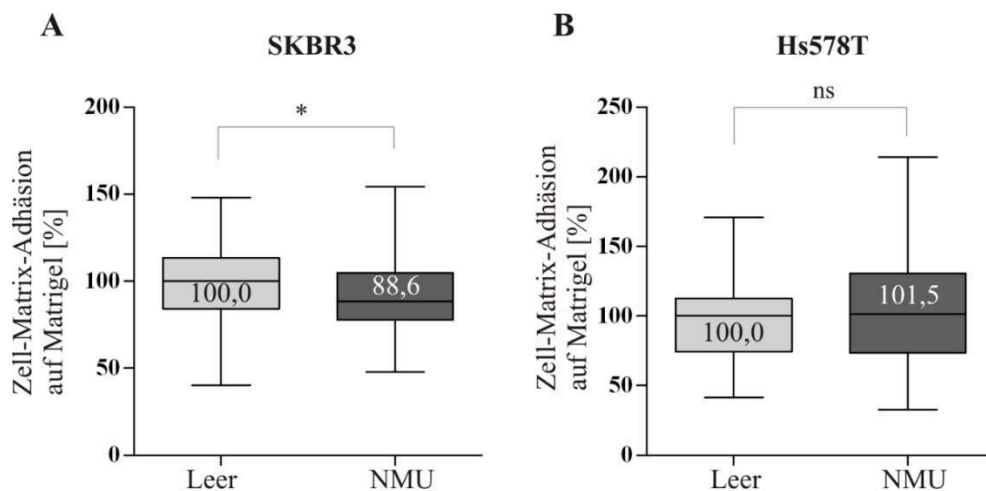


Abbildung 3-38: Der Einfluss von NMU auf die Matrigel-basierte Zell-Matrix-Adhäsion der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. Box-Plot-Darstellung der kolorimetrischen Bestimmung der Matrigel-basierten Zell-Matrix-Adhäsion von NMU-überexprimierenden (n=5, NMU, dunkelgrau) und Leervektor-Einzelklonen (n=5, Leer, hellgrau) des (A) SKBR3- und (B) Hs578T-Modells. Es wurden jeweils drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die Normierung der Werte erfolgte auf die mediane Zell-Matrix-Adhäsion der Leervektor-Klone (100%). Horizontale Linien der Box-Plots: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der beiden Versuchsgruppen sind in der Box-Plot-Darstellung abgebildet. *: $P < 0,05$; ns: nicht signifikant (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

Im SKBR3-Modell wurde eine geringe, dennoch signifikant ($P < 0,05$) reduzierte Zell-Matrix-Adhäsion der NMU-Klone auf Matrigel beobachtet (Abbildung 3-38A). Diese war im Median auf 88,6% im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen (mediane Zell-Matrix-Adhäsion: 100%) vermindert. Wie für die Zellproliferation und die migratorischen Eigenschaften beobachtet, konnte kein signifikanter Einfluss von Neuromedin U auf die Zell-Matrix-Adhäsion der basalen Hs578T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 3-38B). Bei einer medianen Zell-Matrix-Adhäsion der Leervektor-Kontrollen von 100%, ergab sich für die NMU-Klone eine mediane Adhäsion von 101,5%.

3.2.4.9 Expression potentieller NMU-Rezeptoren in Mammakarzinomzellen des luminalen und basalen Subtyps

Es wurde bereits gezeigt, dass sowohl die physiologischen Effekte von Neuromedin U [205] als auch die NMU-vermittelte Förderung progressions-assoziiierter Krebszeleigenschaften mindestens über zwei bekannte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren – NMUR1 und NMUR2 – vermittelt werden [233, 234]. Zusätzlich wurde kürzlich ein Heterodimer aus zwei weiteren Rezeptoren, namentlich *neurotensin receptor 1* (NTSR1) und *growth hormone secretagogue receptor* (GHSR), als möglicher Vermittler Tumor-fördernder Eigenschaften von NMU im Lungenkarzinom identifiziert [231]. Da bisher nicht geklärt ist über welche Rezeptoren Neuromedin U auf Brustkrebszellen wirkt, wurde die Expression der beiden bekannten NMU-Rezeptoren sowie des putativen Rezeptor-Heterodimers in den beiden NMU-Modellen SKBR3 und Hs578T analysiert.

Im luminalen SKBR3-Modell wurden eine moderate *NMUR2*- sowie eine starke *NTSR1*-mRNA-Expression herausgestellt, wobei eine mRNA-Expression der Rezeptoren *NMUR1* und *GHSR* nicht nachweisbar war. Im basalen Hs578T-Modell wurde hingegen keiner der analysierten, möglichen NMU-Rezeptoren exprimiert (Abbildung 3-39). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beobachteten, phänotypischen Effekte von NMU im SKBR3-Modell möglicherweise über den Rezeptor NMUR2 vermittelt werden und könnten zusätzlich das Ausbleiben dieser Effekte im Hs578T-Modell erklären.

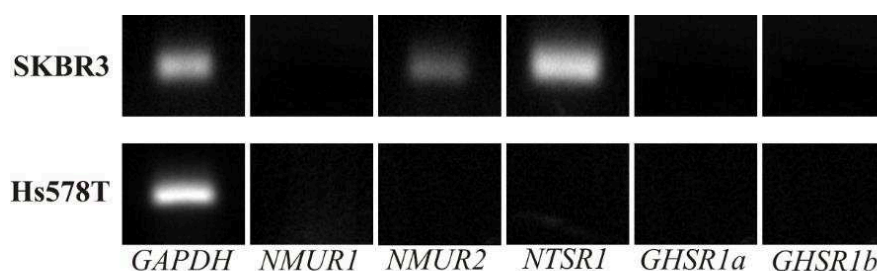


Abbildung 3-39: Expression potentieller Rezeptoren für Neuromedin U in den beiden Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. mRNA-Expression der beiden bekannten NMU-Rezeptoren *NMUR1* und *NMUR2* sowie der potentiellen NMU-Rezeptoren *NTSR1* und *GHSR* (1a und 1b stellen zwei *Splice*-Varianten dar) in den beiden humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T. Die Messung der *GAPDH*-Expression fungierte als Ladekontrolle.

Um zu verifizieren, ob das SKBR3-Tumor-Modell die *in vivo*-Situation im Brusttumorgewebe widerspiegelt, wurden RNA-*HiSeq*-Expressionsdaten von 516 PAM50-klassifizierten Mammakarzinomen des Datenportals TCGA herangezogen [237, 238] (siehe Abschnitt 2.1.4).

Während *NMUR1* hauptsächlich in basal-like Tumoren exprimiert wird (Abbildung 3-40A und B), ist die *NMUR2*-Expression überwiegend auf luminal, HER2-enriched und normal-like Mammakarzinome begrenzt (Abbildung 3-40A und C).

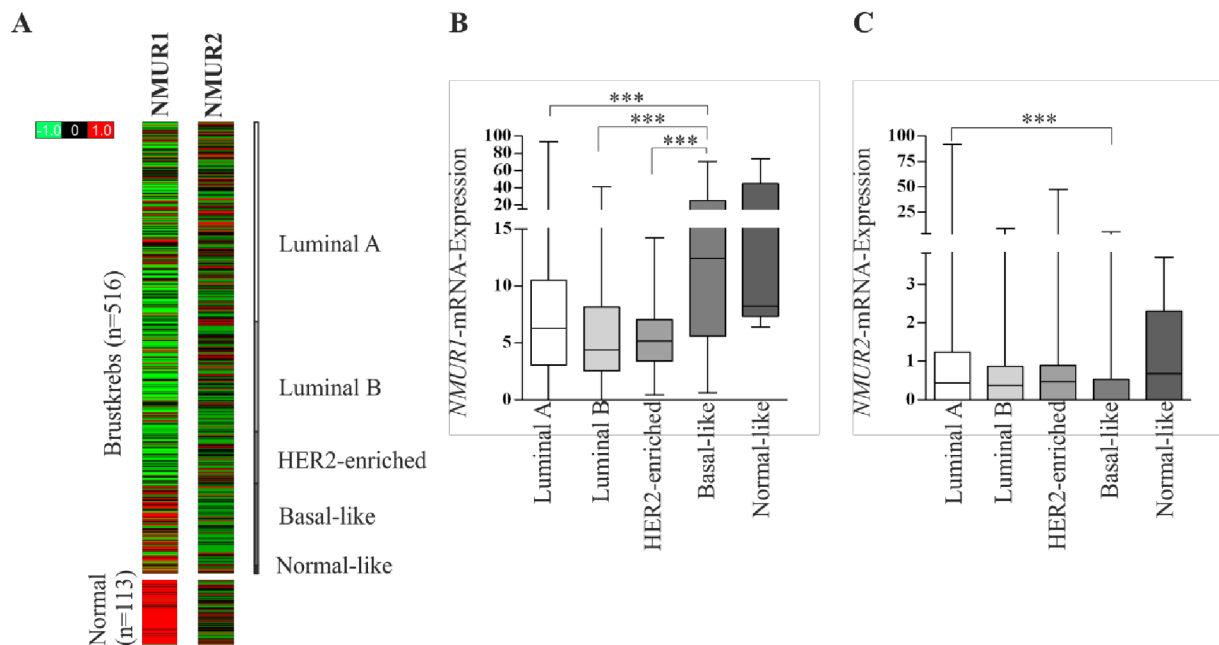


Abbildung 3-40: *NMUR1*- und *NMUR2*-mRNA-Expression in den molekularen Mammakarzinom-Subtypen. *In silico*-mRNA-Expressionsanalyse für *NMUR1* und *NMUR2* in 516 PAM50-klassifizierten Brusttumoren des TCGA-Datenportals. Die Expressionsdaten sind als (A) *Heat-Map* und (B) *Box-Plot* dargestellt. Rot: hohe, schwarz: intermediäre, grün: niedrige mRNA-Expression. Horizontale Linien der *Box-Plots*: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. ***: $P < 0,001$ (zweiseitiger Dunn's multipler Vergleichstest).

3.2.4.10 Identifizierung NMU-modulierter biologischer Prozesse und -assoziierter Genexpressions-Muster im luminalen SKBR3-Modell

Um im Folgenden erstmalig biologische Prozesse und Signalwege zu identifizieren, die im luminalen Mammakarzinom durch Neuromedin U moduliert werden und so zu einer Reduzierung der Zellproliferation bei gleichzeitiger Steigerung eines migratorischen Phänotypen führen, wurde die *Microarray*-Technologie genutzt. Die Analyse wurde in der *Chip Facility* des IZKF (Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung) der Uniklinik RWTH Aachen unter Verwendung des *GeneChip Human Gene 2.0 ST Array* des Herstellers Affymetrix durchgeführt. Der *Chip* deckt mehr als 33.500 Protein-kodierende sowie mehr als 11.000 nicht-kodierende *RefSeq*-, Ensembl- und IncRNAdb-annotierte Transkripte ab (siehe Abschnitt 2.18.8). Insgesamt wurde das Expressionsprofil von jeweils drei unabhängigen SKBR3 Leervektor- und NMU-Einzelklonen analysiert. Über-repräsentierte biologische Prozesse und

Signalwege wurden in einer *Gene Ontology* (GO)-Analyse identifiziert. Die annotierten Gene sind dabei unterschiedlichen GO-Klassen zugeordnet („zelluläre Komponente“, „biologischer Prozess“, „molekulare Funktion“), die wiederum in Sub-Bezeichnungen unterteilt werden. Die Filter-Parameter für die Identifizierung signifikant veränderter GO-Annotationen waren ein Z-Score von mindestens 1,96 („Beobachtet-Erwartet-Verhältnis“), ein P-Wert $< 0,05$ (exakter Test nach Fisher) sowie eine Anzahl von mindestens zwei veränderten Genen in der jeweiligen GO-Annotation. Gene, die zwischen Test- (NMU) und Kontrollgruppe (Leervektor) um einen Faktor größer 1,5 mit einem P-Wert $< 0,05$ differentiell exprimiert waren, wurden als „verändert“ definiert.

Es konnten signifikante Veränderungen in biologischen Prozessen beobachtet werden, die bereits in früheren Studien mit Neuromedin U assoziiert wurden und die Validität der eigenen experimentellen Daten untermauern. Darunter befanden sich GO-Bezeichnungen, welche die Knochenbildung (GO:0045671) [283], die Regulation des Blutdrucks (GO:0003071) [208], Entzündungs-Reaktionen (GO:0001816) [222], sowie die Regulation der Energie-Homöostase bzw. metabolischer Prozesse (GO:0045913; GO:0006629; GO:0031018) betrafen [205, 219] (siehe Tabelle 3-11 und Tabelle 3-12). Zusätzlich wiesen über-repräsentierte GO-Annotationen auf eine NMU-vermittelte Modulation bekannter Krebs-relevanter Signalwege hin. Darunter befand sich eine signifikante Veränderung des Ephrin- (GO:0048013; $P < 0,01$), WNT- (GO:0090090 und GO:0030177, $P < 0,001$ und $P < 0,05$), TGF β - (GO:0060395 und GO:0030511, für beide $P < 0,01$), ERK- (GO:0070372, $P < 0,01$), sowie des *Smoothed*-Signalweges (GO:0008589, $P < 0,05$). Mit Ausnahme des WNT- und ERK-Signalweges [284, 285], wurde keiner der anderen zuvor mit Neuromedin U in Verbindung gebracht.

Um anschließend Genexpressions-Muster zu identifizieren, welche mit der NMU-vermittelten Steigerung der Zellmotilität bei gleichzeitiger Reduktion der Zellproliferation assoziiert sind, wurde eine Klassen-Vergleichsanalyse (engl. *class comparison analysis*) zwischen NMU-Klonen und Leervektor-Kontrollen durchgeführt. Als Filter-Kriterium wurde eine signifikant ($P < 0,05$) differentielle Expression Protein-kodierender Transkripte zwischen Test- und Kontrollgruppe definiert. Insgesamt konnten so 1730 differentiell exprimierte Gene (exklusive NMU) identifiziert werden, von denen 963 herunter- und 767 aufreguliert waren. Unter Berücksichtigung der signifikanten Veränderung des Brustkrebs-relevanten WNT-Rezeptor-Signalweges, welcher im Fokus der Arbeitsgruppe Dahl liegt, wurde das signifikant ($P < 0,05$) in den NMU-Klonen aufregulierte *Naked 2*-(NKD2) als ein mögliches Schlüsselmolekül identifiziert, das zur Modulation des WNT-Signalweges in luminalen SKBR3-Zellen beitragen könnte (Tabelle 3-13).

Tabelle 3-11: Ausgewählte, über NMU aufregulierte GO-Kategorien im SKBR3-Tumormodell

GO-ID	GO-Bezeichnung	GO-Klasse	Veränderte Gene [%]	Z-Score	P-Wert ^a
GO:0045671	negative Regulation der Osteoclasten-Differenzierung	BP ^b	14,3	5,6801	0,0017
GO:0003071	in die Regulation des systemischen arteriellen Blutdrucks involvierter renaler Prozess	BP	14,3	5,6801	0,0017
GO:0090090	negative Regulation des kanonischen WNT-Rezeptor-Signalweges	BP	7,2	5,2387	0,0004
GO:0031532	Aktinzytoskelett-Reorganisation	BP	9,8	5,2046	0,0012
GO:0048013	Ephrin-Rezeptor-Signalweg	BP	9,7	4,4832	0,0052
GO:0040012	Regulation der Lokomotion	BP	3,2	4,4050	0,0002
GO:0001816	Zytokin-Produktion	BP	6,3	3,8590	0,0061
GO:0051492	Regulation der Stress-Faser-Anordnung	BP	7,3	3,7315	0,0113
GO:0042127	Regulation der Zellproliferation	BP	2,1	3,4533	0,0018
GO:0045913	positive Regulation des Kohlenhydrat-Metabolismus	BP	6,3	3,3407	0,0173

^aexakter Test nach Fisher, Signifikanzniveau von $P < 0,05$. ^bBP: Biologischer Prozess.

Tabelle 3-12: Ausgewählte, über NMU herabregulierte GO-Kategorien im SKBR3-Tumormodell

GO-ID	GO-Bezeichnung	GO-Klasse	Veränderte Gene [%]	Z-Score	P-Wert ^a
GO:0006629	Lipid-Metabolismus	BP	4,3	7,7679	<0,0001
GO:0031018	Entwicklung des endokrinen Pankreas	BP	11,9	5,3896	0,0005
GO:0060395	SMAD-Protein-Signaltransduktion	BP	17,6	5,3312	0,0022
GO:0007015	Aktinfilament-Organisation	BP	6,7	4,8038	0,0003
GO:0030511	positive Regulation des TGFβ-Rezeptor-Signalweges	BP	13,6	4,523	0,0047
GO:0070372	Regulation der ERK1- und ERK2-Kaskade	BP	6,3	4,2688	0,0010
GO:0042127	Regulation der Zellproliferation	BP	2,8	3,6925	0,0008
GO:0022407	Regulation der Zell-Zell-Adhäsion	BP	6,2	3,3360	0,0090
GO:0030177	positive Regulation des WNT-Rezeptor-Signalweges	BP	5,3	2,5922	0,0318
GO:0008589	Regulation des <i>Smoothed</i> -Signalweges	BP	6,1	2,5643	0,0417

^aexakter Test nach Fisher, Signifikanzniveau von $P < 0,05$. ^bBP: Biologischer Prozess.

Tabelle 3-13: Ausgewählte, deregulierte Gene des WNT-Rezeptor-Signalweges im SKBR3 NMU-Modell

Gensymbol	Log2 FC NMU vs. Leer	P-Wert ^a
<i>WNT11</i>	0,799	< 0,001
<i>NKD2</i>	0,390	< 0,05
<i>CLDN1</i>	- 1,360	< 0,01
<i>DKK1</i>	- 1,960	< 0,01

^a one-way ANOVA

3.2.4.11 NMU-induzierte Modulation des WNT-Rezeptor-Signalweges in luminalen SKBR3-Brustkrebszellen

Um die auf den *Microarray*-Daten basierende NMU-vermittelte Deregulation des WNT-Rezeptor-Signalweges zu validieren, sollte die Expression im *Chip*-Experiment differentiell exprimierter sowie weiterer WNT-Signalwegs-Komponenten mittels *Real-Time* PCR und Western Blot in SKBR3 NMU-und Leervektor-Einzelklonen untersucht werden.

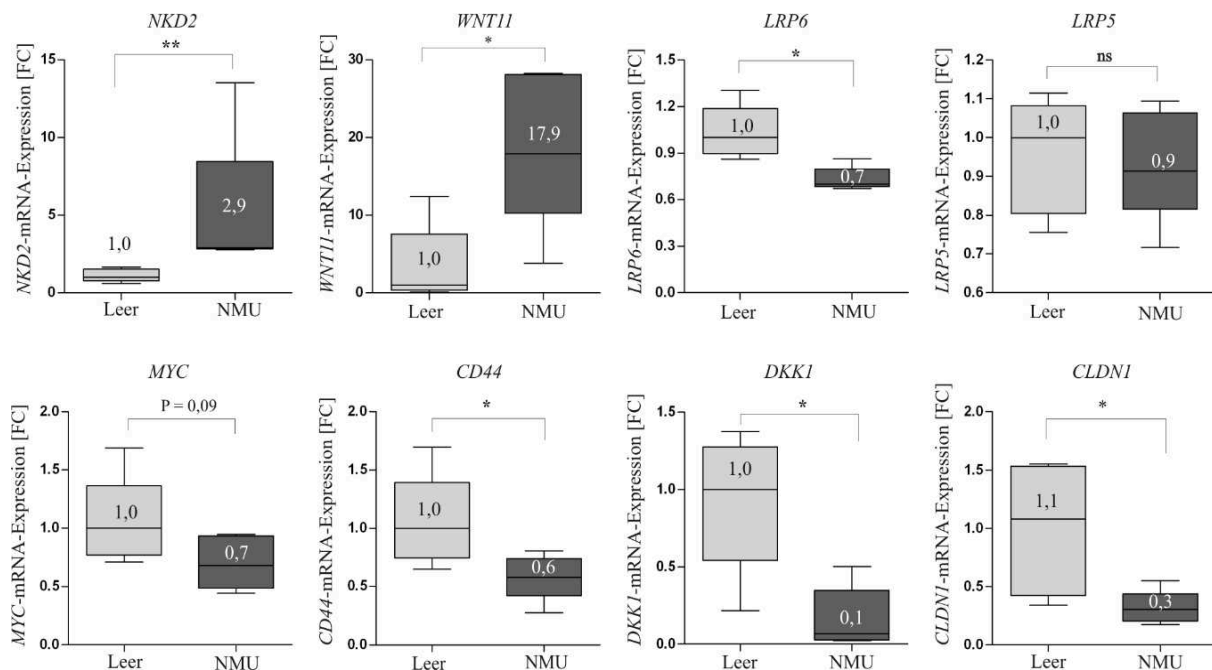


Abbildung 3-41: Real-Time PCR-basierte mRNA-Expressionsanalyse ausgewählter WNT-Signalwegs-Komponenten im luminalen SKBR3 NMU-Tumormodell. Dargestellt ist die *Box-Plot*-Analyse der mRNA-Expression verschiedener WNT-Signalwegs-Gene in NMU- und Leervektor-Einzelklonen des luminalen SKBR3-Tumormodells. Es wurden jeweils fünf unabhängige NMU- und Leervektor-Klone analysiert (Ausnahme *CLDN1*: fünf NMU-Klone, vier Leervektor-Klone). Normiert wurde auf die mediane Expression der Leervektor-Kontrollen. Das Haushaltsgen *GAPDH* fungierte als interner Standard der relativen Expression. Horizontale Linien der *Box-Plots*: Mediane, vertikale Linien: Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der beiden

Versuchsgruppen sind in der *Box-Plot*-Darstellung abgebildet. **: $P < 0,01$; *: $P < 0,05$; ns: nicht signifikant (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

In Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten konnte eine signifikante Aufregulation von NKD2 auf mRNA- ($P < 0,01$; medianer FC: 2,9; Abbildung 3-41) und Proteinebene ($P < 0,05$; medianer FC: 3,4; Abbildung 3-42 und Abbildung 3-43) in den SKBR3 NMU-Klonen gegenüber den Leervektor-Kontrollen gezeigt werden. *Naked*-Proteine (NKD1 und NKD2) wurden bisher hauptsächlich als „Schalter-Proteine“ beschrieben, die über eine direkte Wechselwirkung mit der intrazellulären WNT-Signalwegs-Komponente *Dishevelled* (DVL) einerseits die Aktivität des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges inhibieren, andererseits den WNT-PCP (*Planar Cell Polarity*)-Signalweg aktivieren können [155, 286].

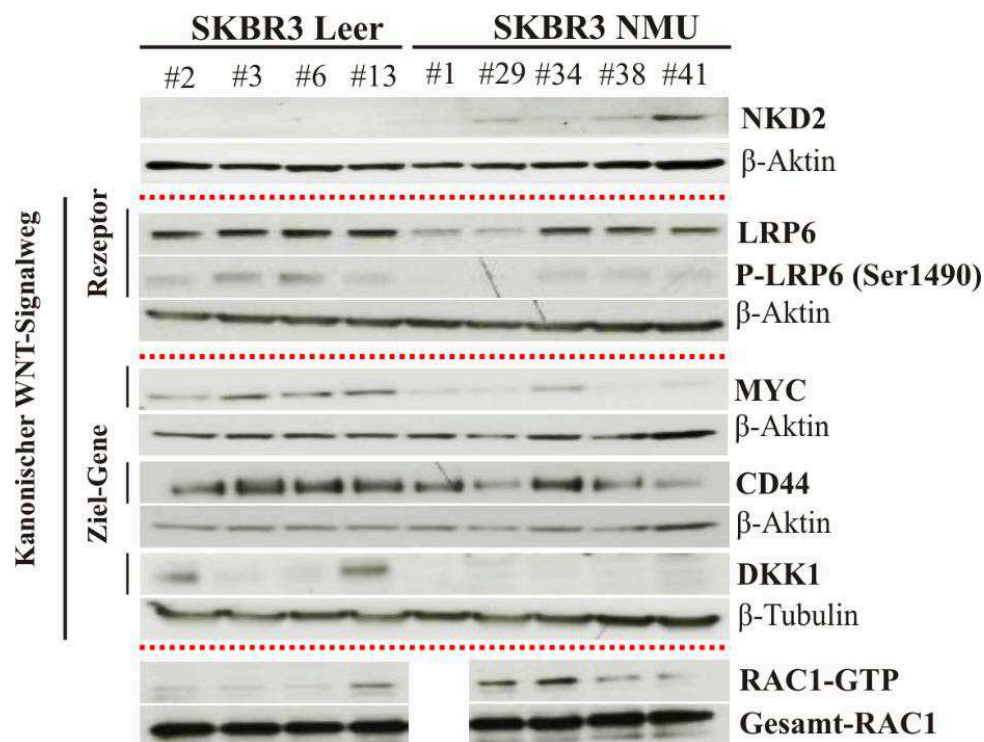


Abbildung 3-42: Western Blot-Analyse ausgewählter WNT-Signalwegs-Komponenten im luminalen SKBR3 NMU-Tumormodell. Repräsentative Western Blot-Darstellung der Proteinexpression ausgewählter WNT-Signalwegs-Komponenten in unabhängigen SKBR3 NMU-Einzelklonen und Leervektor-Kontrollen. Als Ladekontrollen fungierten β -Aktin, β -Tubulin, sowie Gesamt-RAC1-Protein.

Eine Aktivierung des PCP-Signalweges führt zur Modulation der Aktinzytoskelett-Organisation der Zelle und damit verbundenen Änderungen in Eigenschaften wie der Zellmotilität und -adhäsion. Als wichtige Effektoren des PCP-Signalling fungieren kleine

GTPasen der Rho-Familie wie RAC1 [153]. Es wurde bereits gezeigt, dass die Aktivierung des PCP-Signalweges über den Effektor RAC1 zu einer Steigerung der Migrationsfähigkeit von Krebszellen und einer damit verbunden erhöhten Metastasierung führen kann [148]. Als mögliches Maß für eine putative verstärkte Aktivierung des PCP-Signalweges in SKBR3 NMU-Klonen gegenüber den Leervektor-Kontrollen wurde die Menge der aktiven Form von RAC1, RAC1-GTP, ermittelt und ins Verhältnis zur vorhandenen Gesamtmenge zellulären RAC1-Proteins gesetzt. In der Tat konnte ein signifikant erhöhter Ratio ($P < 0,05$; medianer FC: 1,6) aus RAC1-GTP zu Gesamt-RAC1 in den NMU-Einzelklonen ermittelt werden (Abbildung 3-42 und Abbildung 3-43). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten wurde eine signifikant ($P < 0,05$) erhöhte *WNT11*-mRNA-Expression in SKBR3 NMU-Klonen im Vergleich zur Kontroll-Klon-Expression beobachtet (medianer FC: 17,9; Abbildung 3-41). Interessanterweise wurde *WNT11* zuvor mit einer erhöhten Motilität von Krebszellen (inklusive Brustkrebszellen) assoziiert, die zum Teil auf eine verstärkte Aktivierung des PCP-Signalweges zurückgeführt wurde [163, 287].

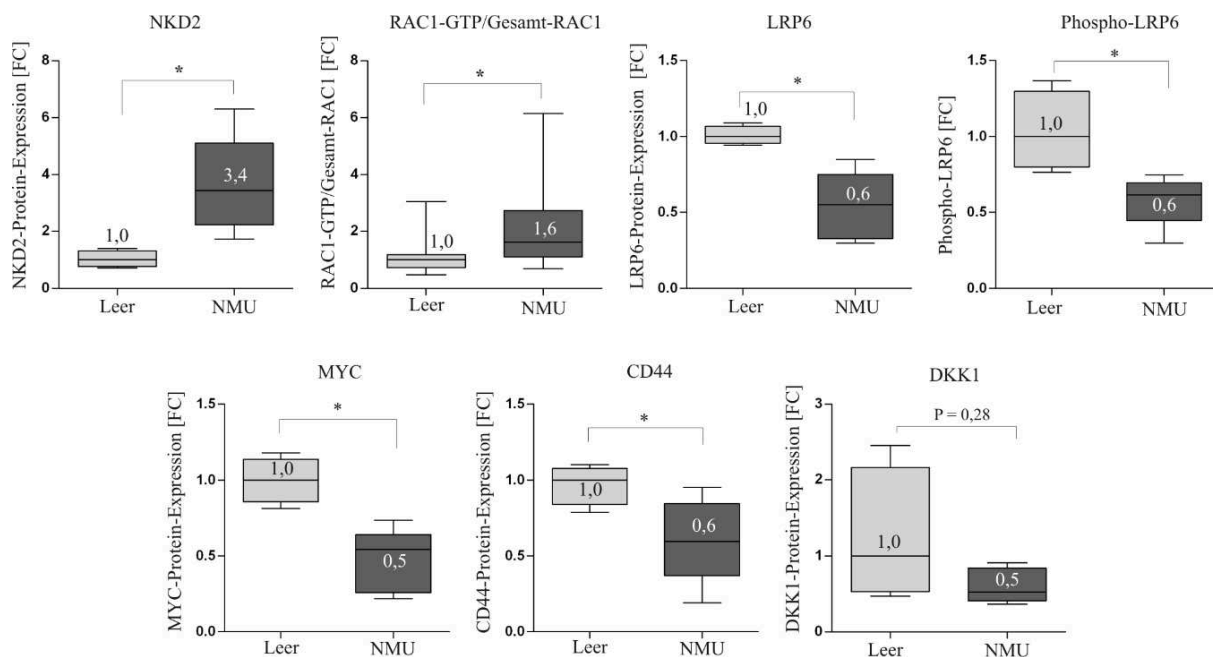


Abbildung 3-43: Densitometrische Auswertung der Western Blot-Proteinexpression ausgewählter WNT-Signalwegs-Komponenten im luminalen SKBR3 NMU-Modell. Box-Plot-Darstellung der Western Blot-Ergebnisse nach densitometrischer Auswertung der Proteinexpression ausgewählter WNT-Signalwegskomponenten in unabhängigen NMU- und Leervektor-Einzelklonen des SKBR3-Modells. Die Darstellung des Ratio RAC1-GTP zu Gesamt RAC1-Protein basiert auf drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier unabhängigen NMU- und Leervektor-Einzelklonen. Die Darstellung der Proteinexpression der restlichen WNT-Signalwegs-Komponenten (NKD2, LRP6, Phospho-LRP6, MYC, CD44, DKK1) basiert auf Auswertung des jeweiligen in Abbildung 3-42 gezeigten Western Blots mit jeweils vier unabhängigen Leervektor- und fünf NMU-Einzelklonen. Normiert wurde auf die mediane Expression der Leervektor-Kontrollen. Horizontale Linien der Box Plots: Mediane, vertikale Linien:

Minima und Maxima, Boxen: 25%- bis 75%-Quartile. Die Werte der Mediane der beiden Versuchsgruppen sind in der *Box-Plot*-Darstellung abgebildet. *: $P < 0,05$ (zweiseitiger Mann-Whitney-U-Test).

Nachfolgend wurde untersucht, ob neben einer putativen Stimulation des PCP-, eine NMU-vermittelte Modulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges vorliegen könnte. Die Aktivierung der kanonischen WNT-Signalkaskade benötigt neben vorhandener WNT-Liganden und *Frizzled*-Rezeptoren die Anwesenheit von Co-Rezeptoren der LDLR (*low-density lipoprotein receptor*)-Familie, namentlich LRP5 und LRP6 [288]. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass beide Co-Rezeptoren keine vollständige funktionelle Redundanz aufweisen [289]. Diese Annahme untersützend konnte gezeigt werden, dass der induzierte, alleinige Expressionsverlust von LRP6 zu einer reduzierten Aktivität des kanonischen WNT-Signalweges mit einhergehender Abnahme der Proliferation von Brustkrebszellen führen kann [140].

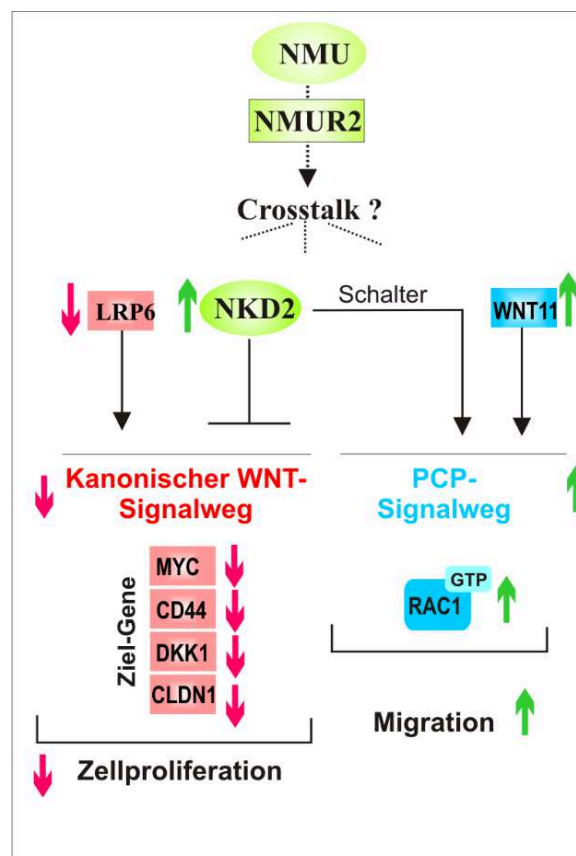


Abbildung 3-44: Mögliches Modell der NMU-vermittelten Modulation des WNT-Rezeptor-Signalweges in luminalen SKBR3-Brustkrebszellen. Die potentielle Bindung von NMU an den Rezeptor NMUR2 führt, über einen ungeklärten Mechanismus, zu einer Aufregulation der nachgeschalteten Signalwegs-Komponenten NKD2 und WNT11 sowie einer herabregulierten Expression des Rezeptors LRP6. Die verminderte Expression des Co-Rezeptors LRP6 sowie die erhöhte

Bildung des putativen Antagonisten des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges NKD2 könnten zu einer reduzierten Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges und folglich einer verminderten Expression TCF/LEF-regulierter Ziel-Gene wie MYC, CD44, DKK1 und CLDN1 beitragen. Die reduzierte Expression des Proto-Onkogens MYC kann möglicherweise zu einer Herabregulation der Zellproliferation führen. Es ist denkbar, dass die verstärkte Bildung von NKD2 und des nicht-kanonischen WNT-Liganden WNT11 zu einer gesteigerten Aktivität des PCP (*Planar Cell Polarity*)-Signalweges führen können. Die Stimulation (GTP-Bindung) von stromabwärts gelegenen PCP-Effektorproteinen wie RAC1 kann möglicherweise zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit der SKBR3-Brustkrebszellen beitragen.

Die Analyse der Expression der beiden zentralen Komponenten des kanonischen Signalweges im SKBR3-Tumormodell zeigte eine unveränderte mRNA-Expression von *LRP5* in NMU- und Leervektor-Einzelklonen (Abbildung 3-41), hingegen eine signifikante, NMU-vermittelte Herabregulation der *LRP6*-Expression auf mRNA- ($P < 0,05$; Abbildung 3-41) und Proteinebene ($P < 0,05$; Abbildung 3-42 und Abbildung 3-43). Des Weiteren konnte eine signifikant ($P < 0,05$) verringerte Menge der aktivierten (Phospho-Serin 1490) Form von *LRP6* [290] in SKBR3 NMU-Einzelklonen im Vergleich zu Leervektor-Kontrollen, vermutlich als Folge verringerter *LRP6*-Proteinexpression, festgestellt werden (Abbildung 3-42 und Abbildung 3-43).

Es wurde vermutet, dass die Kombination einer verringerten Menge des aktivierten Co-Rezeptors *LRP6* und einer erhöhten Expression des potentiellen, kanonischen WNT-Signalwegs-Antagonisten NKD2 in SKBR3 NMU-Einzelklonen zu einer reduzierten Signalwegs-Aktivität und folglich einer verringerten Expression TCF/LEF-regulierter Zielgene beitragen könnte. Die Hypothese unterstützend wurde eine reduzierte Expression bekannter kanonischer Zielgene gefunden, namentlich MYC [291], CD44 [292], DKK1 [293] und CLDN1 [294] (Abbildung 3-41, Abbildung 3-42, Abbildung 3-43). Die verminderte Expression des bedeutenden Proto-Onkogens MYC [295] als Folge forciertter NMU-Expression könnte zur beobachteten Reduktion der Zellproliferation im SKBR3-Modell beitragen.

In Abbildung 3-44 ist ein mögliches Modell der NMU-vermittelten Modulation des WNT-Rezeptor-Signalweges in luminalen SKBR3-Brustkrebszellen zusammenfassend dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Identifizierung und Validierung potentieller Proteinbiomarker für die Blut-basierte Brustkrebs-Früherkennung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Krebserkrankung der Frau in Deutschland und weltweit [1, 2]. Die Notwendigkeit einer Früherkennung der Brustkrebserkrankung wird durch die Abhängigkeit der Prognose vom Zeitpunkt der Diagnosestellung verdeutlicht. Die relative 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für eine noch lokal begrenzte Erkrankung liegt unter Einsatz derzeitiger Therapien bei rund 90%. Diese sinkt nach Metastasierung von Krebszellen in entfernt liegende Organe hingegen drastisch auf rund 20% ab [63]. Das Ziel eines *Screening*-Tests ist die Senkung der Erkrankungs-spezifischen Inzidenz und/oder Mortalität, abhängig davon, ob benigne Vorläufer-Läsionen der malignen Erkrankung bereits detektier- und behandelbar sind [64]. In Deutschland wird frühestens im Jahr 2015 absehbar sein, ob und in welchem Ausmaß das zwischen 2005 und 2009 implementierte Mammographie-*Screening*-Programm zu einer Reduktion der Brustkrebs-spezifischen Mortalität beitragen kann [1]. Eine Meta-Studie des Cochrane-Netzwerkes von 2013 schätzt die auf das Mammographie-*Screening* zurückzuführende Reduzierung der Brustkrebs-spezifischen Mortalität, unter Einbezug randomisierter, klinischer Studien bis November 2012 (600.000 Fälle umfassend), auf maximal 15% ein [296]. Es ist zu betonen, dass die Sinnhaftigkeit des Mammographie-*Screening*-Programmes aufgrund erkannter Limitationen und Risiken kontrovers diskutiert wird. Hervorzuheben ist insbesondere die Gefahr einer Überdiagnose und Überbehandlung, d.h. die Detektion und eine damit einhergehende, teilweise mit erheblichen Gesundheitsrisiken behaftete, kostenintensive Behandlung einer Brustkrebserkrankung, die in der Lebensspanne eines Individuums ohne den *Screening*-Einsatz nicht symptomatisch und damit klinisch nicht relevant geworden wäre [296]. Des Weiteren sind die unzureichende diagnostische Spezifität und Sensitivität der *Screening*-Mammographie bei einem Einsatz für Frauen mit dichtem Brustparenchym zu erwähnen [68]. Der Anteil an Frauen mit dichtem Brustgewebe im Alter über 50 Jahren beträgt nach Schätzungen mehr als 30% [67]. Als besonders problematisch ist der daraus resultierende Anstieg falsch-positiver Brustkrebs-Befunde zu bewerten. Die Konsequenzen sind invasive Folgeuntersuchungen, die neben möglichen körperlichen Schäden auch zu psychischen Beeinträchtigungen für die *Screening*-Teilnehmerinnen und immensen Zusatzkosten für das Gesundheitssystem führen können [297]. Das geschätzte kumulative Risiko für eine Frau in einem europäischen Land nach 10 *Screening*-Teilnahmen im 2-Jahres-

Rhythmus, beginnend mit 50 Jahren, einen falsch-positiven Mammographie-Befund zu erhalten, liegt bei rund 20% [298].

Die Limitationen und die damit verbundenen Risiken der *Screening*-Mammographie unterstreichen den Bedarf an komplementären Früherkennungs-Strategien für das humane Mammakarzinom. Einen minimal-invasiven Ansatz stellt die Detektion von in Körperflüssigkeiten wie Blutserum befindlichen Biomarkern dar [72, 268]. Insbesondere für zirkulierende Proteinbiomarker ist ein Potential für einen routinemäßigen Einsatz belegt. Beispielhaft sei auf die MUC1-basierten Tests CA 15-3 und CA 27.29 sowie die Messung der CEA-Serumkonzentration verwiesen. Aufgrund ihrer unzureichenden klinischen Spezifität und Sensitivität in frühen Brustkrebs-Stadien bezieht sich die derzeitige Empfehlung jedoch ausschließlich auf eine Nutzung als ergänzende *Monitoring*-Biomarker für das metastasierende Mammakarzinom. Eine Empfehlung der ASCO (*American Society of Clinical Oncology*) für einen Biomarker-basierten Brustkrebs-Früherkennungs-Test liegt hingegen nicht vor [73]. Die Nutzung mikrofluider Chip-Technologien für eine Vor-Ort-Diagnose (engl. *Point-Of-Care*, *POC*) weist, aufgrund der potentiellen schnellen und simplen Durchführbarkeit bei reduzierten Kosten, ein enormes Potential für einen routinemäßigen Einsatz als mögliches *Screening-Tool* auf [76, 78].

Übergeordnetes Ziel des interdisziplinären MicroBioMed-Projektes war die Entwicklung eines mikrofluiden, Blutserum-basierten Chip-Systems, das vorrangig für die Brustkrebs-Früherkennung nutzbar sein sollte. Monoklonale Antikörper gegen validierte Serum-Proteinbiomarker sollen von Kooperationspartnern mittelfristig in den entwickelten Biochip integriert werden. Als biomedizinischer Partner innerhalb des Projektes war die Identifizierung und Validierung dieser Serum-Proteinbiomarker mit adäquater klinischer Spezifität und Sensitivität, Ziel der vorliegenden Arbeit.

Auf Grundlage von Gewebe-Expressionsdaten sowie unter Berücksichtigung einer möglichen Auffindbarkeit im Blutkreislauf wurden die Kandidaten ASPN, CTHRC1 und AGR3 als aussichtsreiche, potentielle Serum-Proteinbiomarker für das humane Mammakarzinom ermittelt. CELSR1, NMU und GREM1 wurden aufgrund einer vergleichsweise geringen festgestellten Tumor-spezifischen Aufregulation für weitere Analysen im humanen Serum nicht weiter berücksichtigt. Von den drei in humanen Seren analysierten Kandidaten ASPN, CTHRC1 und AGR3, erwies sich letztlich AGR3 als potentieller Biomarker für die Brustkrebs-Früherkennung.

Auf mRNA-Ebene wurde eine signifikante Aufregulation der ASPN-Expression im Mammakarzinom, insbesondere in luminalen Tumoren gegenüber Normalgeweben der Brust

beobachtet. Ferner konnte eine signifikante Assoziation zwischen *ASPN*-Expression und gut bis mittelgradiger Differenzierung sowie geringer Tumorgroße (pT1) herausgestellt werden. Auf Proteinebene ließ sich eine Aufregulation der *ASPN*-Expression nicht quantifizieren. Der immunhistochemische Nachweis von *ASPN* zeigte eine auf die extrazelluläre Matrix beschränkte Expression des Proteins sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe der Brust. Turashvili und Kollegen identifizierten *ASPN* erstmals im Mammakarzinom als ein im Epithel (jedoch nicht im Stroma) des ILC (invasiv-lobuläres Karzinom) gegenüber dem des IDC (invasiv-duktales Karzinom) sowie des normalen Brustgewebes aufreguliertes Gen [200]. Im Gegensatz dazu wurde *ASPN* in einer Folge-Studie als Teil einer Signatur von im Brustkrebs-assoziierten Stroma aufregulierter Gene beschrieben [299]. In Übereinstimmung mit den eigenen mRNA-Daten zeigten Castellana *et al.* eine Assoziation der *ASPN*-mRNA-Expression mit Hormonrezeptor-positiven Mammakarzinomen. Die immunhistochemische nukleäre Detektion von *ASPN* in epithelialen Brustkrebszellen [300] steht im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen extrazellulären, stromalen Lokalisation. *ASPN* zählt zur Familie der SLRPs (engl. *Small Leucine-rich Repeat Proteoglycans*), für deren Mitglieder inklusive *ASPN*, eine Kollagen-Bindung beschrieben ist [274, 301, 302]. Auch neuere Studien in unterschiedlichen Geweben wiesen *ASPN* als ein hauptsächlich stromal lokalisiertes Protein sowohl in Normal- als auch in Tumorgewebe nach [303, 304]. Neben anderen Tumorentitäten wurde *ASPN* kürzlich als ein im Prostatakarzinom aufreguliertes Gen beschrieben [304]. In einer massenspektrometrischen Analyse humaner Serumproben konnte eine signifikant erhöhte *ASPN*-Konzentration in Proben von Patienten mit fortgeschrittenem Prostatakarzinom herausgestellt werden [305]. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die potentielle Nutzbarkeit von *ASPN* als Blutserum-basierter Biomarker für das Mammakarzinom anhand Brustkrebs-assoziierten Seren von Patientinnen mit überwiegend frühen Tumorstadien untersucht. Es konnte keine signifikant differentielle *ASPN*-Konzentration zwischen Brustkrebs-assoziierten und altersgematchten Seren gesunder Spenderinnen festgestellt werden. Trotz der detektierten starken Aufregulation der *ASPN*-mRNA-Expression im Mammakarzinom ließ sich der Nachweis einer signifikant differentiellen *ASPN*-Proteinexpression zwischen Tumor- und Normalgewebe der Brust nicht erbringen. Es ist folglich möglich, dass sich der auf mRNA-Ebene detektierte Expressionsunterschied nicht oder deutlich geringfügiger auf Proteinebene manifestiert und somit zu einer nicht feststellbaren signifikant differentiellen *ASPN*-Serumkonzentration zwischen Test- und Kontrollgruppe führte. Zudem wurde eine *ASPN*-Expression mit entzündlichen Erkrankungen wie Osteoarthritis [302, 306] und Pankreatitis [303] in Verbindung gebracht. Eine Entzündungs-

assoziierte, nicht Tumor-spezifische ASPN-Expressionsinduktion kann als weitere mögliche Erklärung einer im Serum nicht detektierbaren differentiellen ASPN-Konzentration zwischen beiden Versuchsgruppen angesehen werden.

Für *CTHRC1* konnte in der vorliegenden Arbeit die von allen untersuchten Kandidaten stärkste signifikante Aufregulation auf mRNA-Ebene in Tumor- gegenüber Normalgeweben der Brust beobachtet werden. Eine Tumor-spezifische Aufregulation von *CTHRC1* ist in der überwiegenden Mehrheit humaner, solider Tumoren inklusive des Mammakarzinoms bereits beschrieben worden [193, 200, 202, 299]. Jedoch liegt eine Diskrepanz hinsichtlich des für *CTHRC1* beschriebenen Expressionsmusters zwischen einzelnen Studien vor. In der vorliegenden Arbeit wurde im Normal-und Tumorgewebe der Brust eine ähnlich starke, zytoplasmatische *CTHRC1*-Proteinexpression in stromalen und epithelialen Zellen verzeichnet, hingegen eine auffällige Zunahme (auf qualitativer Ebene) der Anfärbbarkeit der Brustkrebs-assoziierten extrazellulären Matrix im Vergleich zu der des Normalgewebes beobachtet. Während zwei weitere Studien im Mammakarzinom *CTHRC1* ebenfalls im Stroma wie auch im Brustepithel lokalisierten [201, 202], wurde in anderen Arbeiten eine auf das Stroma beschränkte Expression für *CTHRC1* beschrieben [192, 199]. Im humanen Serum gesunder Spenderinnen war ein Nachweis von *CTHRC1*-Protein, mit wenigen Ausnahmen, nicht möglich. Im Vergleich dazu konnte eine signifikant erhöhte *CTHRC1*-Konzentration in altersgematchten Brustkrebs-assoziierten Seren verzeichnet werden. Da die detektierten Konzentrationen in den Brustkrebs-assoziierten Seren jedoch an der Grenze der analytischen Sensitivität des verwendeten Assays lagen, wurde *CTHRC1* nicht weiter als möglicher Serumbiomarker im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt. In einer vorausgehenden Studie wurde *CTHRC1* bereits als potentieller Serumbiomarker für das humane Mammakarzinom in Erwägung gezogen. Jedoch konnte seine potentielle Nutzbarkeit aufgrund fehlender etablierter ELISA nicht im humanen Serum geprüft werden [271]. In Übereinstimmung mit den eigenen Daten beschrieben Stohn und Kollegen die humane *CTHRC1*-Plasmakonzentration gesunder Spender im unteren pg/ml-Bereich [185]. Parallel zur Entstehung der vorliegenden Arbeit überprüften Duarte und Kollegen die Verwendbarkeit von *CTHRC1* als Serum-Proteinbiomarker für diverse Erkrankungen, einschließlich humaner Tumorerkrankungen inklusive Brustkrebs [192]. In dieser Studie konnte keine signifikante Erhöhung im Tumor-assoziierten Plasma diverser solider Tumorerkrankungen (einschließlich Brustkrebs) festgestellt werden. Hingegen wurde unter anderem eine Assoziation zwischen erhöhter *CTHRC1*-Plasmakonzentration und rothaarigen Individuen sowie dem Vorliegen einer Schwangerschaft, entzündlichen Erkrankungen und Diabetes herausgestellt.

Mit AGR3 wurde ein neuer potentieller Serum-Proteinbiomarker für die Brustkrebs-Früherkennung identifiziert. In unabhängigen Gewebe-Kohorten konnte eine Aufregulation der AGR3-Expression auf mRNA- und Proteinebene im humanen Mammakarzinom gegenüber Normalgewebe-Kontrollen gezeigt werden. Ferner wurde eine signifikante Assoziation der AGR3-Expression mit gut bis mittelgradig differenzierten sowie Brusttumoren des luminalen Subtyps herausgestellt. Diese Daten stehen im Einklang mit zwei früheren Studien zu AGR3 im humanen Mammakarzinom, die allerdings kleinere Gewebe-Kollektive analysierten [113, 125]. Bisher wurde die potentielle klinische Relevanz von AGR3 als möglicher Früherkennungs-Proteinbiomarker für das humane Mammakarzinom nicht untersucht. Unter Verwendung eines kommerziellen ELISA konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine signifikant erhöhte AGR3-Proteinkonzentration in Brustkrebs-assoziierten Seren im Vergleich zu altersgematchten Kontroll-Seren gesunder Spenderinnen beschrieben werden. Es ist erwähnenswert, dass sich die Kohorte der analysierten, Brustkrebs-assoziierten Seren überwiegend aus Patientinnen mit frühen (invasiven) Tumorstadien zusammensetzte, was eine potentielle Nutzbarkeit von AGR3 als möglichen Früherkennungsmarker unterstreicht. Dies ist zudem in Übereinstimmung mit dem bereits in prä-invasiven Läsionen (DCIS) beobachteten Anstieg der AGR3-Proteinexpression gegenüber dem Brust-Normalgewebe, mit der stärksten AGR3-Expression im invasiven Mammakarzinom. Die Überprüfung der Biomarker-Effizienz von AGR3 mittels ROC (*Receiver Operating Characteristic*)-Analyse ergab, unter Berücksichtigung der Erzielung maximaler klinischer Spezifität (100%), eine klinische Sensitivität von 25%. Es herrscht Konsens darüber, dass die Verwendung von Einzelmarkern, gerade für eine heterogene Erkrankung wie das humane Mammakarzinom [23], nicht genügt um die für einen *Screening*-Test zwingend erforderlichen hohen Werte für die diagnostische Spezifität und Sensitivität zu erzielen. Zudem hat die Kombination von Biomarkern zu einer Signatur das Potential die Detektion einer spezifischen Krebs-Entität wie Brustkrebs zu gewährleisten [63, 76, 275, 307, 308]. Basierend auf diesen Erkenntnissen lag das vorrangige Ziel dieser Arbeit in der Identifizierung mehrerer Einzel-Biomarker, die zu einem *Panel* kombiniert werden können. AGR2 ist das wahrscheinliche Paralog zu AGR3 [113] und wurde bereits in einer großen Anzahl humaner solider Tumoren, inklusive dem Mammakarzinom [111, 112], als aufreguliert beschrieben [99]. Im Gegensatz zu AGR3 konnten darüber hinaus bereits erhöhte AGR2-Konzentrationen in Serum- oder Plasmaproben von Patienten mit Ovarial-, Lungen-, Pankreas- und Prostatakarzinom im Vergleich zu Kontrollen gesunder Spender detektiert werden [109, 122–124, 275]. Die potentielle klinische Nutzbarkeit von AGR2 als Serum-Proteinbiomarker für die Detektion von Brustkrebs wurde hingegen noch

nicht untersucht. Unter Verwendung eines etablierten, kommerziellen ELISA [124, 275] konnte erstmalig in der vorliegenden Arbeit eine signifikant erhöhte AGR2-Konzentration in Brustkrebs-assoziierten Seren im Vergleich zu altersgematchten Kontrollen gesunder Spenderinnen nachgewiesen werden. Die Überprüfung der Biomarker-Effizienz mittels ROC-Analyse ergab eine auf der gemessenen AGR2-Serumkonzentration beruhende Diskriminierung von Brustkrebs-Patientinnen und gesunden Frauen mit einer klinischen Sensitivität von 7,5% bei maximal möglicher Spezifität von 97,5%. Die Kombination der beiden Einzelmarker AGR2 und AGR3, durch Bildung ihrer gemittelten Konzentration in den analysierten Serumproben, ergab eine deutliche Steigerung der klinischen Sensitivität auf 64,5% bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung einer hohen kinischen Spezifität von 89,5%.

Zusammenfassend wurden mit AGR3 und AGR2 zwei neue potentielle Serumbiomarker für die Früherkennung des humanen Mammakarzinoms identifiziert. Es ist hervorzuheben, dass zusätzliche Analysen großer unabhängiger Serumkollektive erforderlich sind, um die Robustheit des identifizierten AGR2/AGR3-Dupletts zu validieren. In diese Analysen sind neben weiteren Brustkrebs-assoziierten Seren überwiegend früher Tumorstadien zusätzliche Kontroll-Kohorten (Seren von Patientinnen mit benignen Veränderungen der Brust, häufigen entzündlichen Erkrankungen sowie mit anderen Tumorentitäten) einzuschließen. Um die klinische Spezifität und Sensitivität weiter zu erhöhen, ist eine Kombination mit zusätzlichen Serumbiomarkern wie den MUC1-basierten Tests CA 15-3 und CA 27.29 sowie CEA erforderlich. Die Integration eines hinsichtlich diagnostischer Spezifität und Sensitivität optimierten *Panels* in einen mikrofluiden Biochip könnte eine kostengünstige, schnell und simpel vor Ort durchführbare Methode zur Komplementation der *Screening*-Mammographie darstellen.

4.2 Prognostische und funktionelle Relevanz ausgewählter Kandidaten für das Mammakarzinom

Neben der Entwicklung neuer Strategien für die Früherkennung von Krebserkrankungen verfolgt die molekulare Onkologie das Ziel aus der Entschlüsselung der diesen Erkrankungen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen, neue therapeutische Optionen abzuleiten. Um aus einem Repertoire an Behandlungsmöglichkeiten diejenigen zu selektieren, welche mit einem größtmöglichen, individuellen Patienten-*Benefit* verknüpft sind, bedarf es adäquater prognostischer und prädiktiver Biomarker [61]. Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand folglich in der Analyse einer möglichen prognostischen Relevanz neuer Brustkrebs-assoziiierter Gene sowie der parallelen Untersuchung ihrer potentiellen Involvierung in die Entstehung und

Progression des humanen Mammakarzinoms. Proteine, welche über die Modulation Tumor-relevanter Signalwege die Karzinogenese fördern, stellen potentielle Zielstrukturen für therapeutische Interventionen dar.

4.2.1 Der Kandidat AGR3

Die potentielle klinische Nutzbarkeit von AGR3 als prognostischer Biomarker für das humane Mammakarzinom wurde vor Beginn dieser Arbeit noch nicht analysiert. Wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 4.1) wird AGR3 verstärkt in gut bis mittelgradig differenzierten und luminalen Brusttumoren exprimiert. Die univariate Kaplan-Meier-Analyse ergab, dass eine hohe AGR3-Proteinexpression innerhalb der Gruppe der Brustkrebs-Patientinnen mit gut (G1) bis mittelgradiger (G2) Tumor-Differenzierung mit einem signifikant verringerten Tumorspezifischen Überleben assoziiert ist. In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse konnte AGR3 als unabhängiger prognostischer Faktor bestätigt werden. Die neben der vorliegenden Arbeit bisher einzige weitere Studie, welche den putativen prognostischen Nutzen von AGR3 analysierte, beschrieb das Protein als möglichen prognostischen Faktor für einen günstigen Krankheitsverlauf des serösen Ovarialkarzinoms [126]. In Übereinstimmung mit der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten potentiellen Nutzbarkeit von AGR3 als Prognose-Parameter für einen ungünstigen Verlauf von G1/G2-Mammakarzinomen wurde das homologe Protein AGR2 in der Mehrzahl vorliegender Studien ebenfalls als möglicher Biomarker für eine ungünstige Prognose der humanen Brustkrebserkrankung beschrieben [116, 118, 119].

Eine Tumor-assoziierte Aufregulation von AGR3 konnte neben Tumoren der Brust, im Ovarial- [126] sowie Prostatakarzinom [127] beobachtet werden. Sowohl die genaue physiologische Funktion als auch die Rolle von AGR3 innerhalb der Karzinogenese sind bisher weitgehend ungeklärt [129]. Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine funktionellen Studien zu AGR3 in humanen Krebserkrankungen vor, so dass im Rahmen dieser Arbeit eine erstmalige Untersuchung eines möglichen Einflusses von AGR3 auf Tumor-relevante Eigenschaften humaner Mammakarzinomzellen angestrebt wurde.

In Übereinstimmung mit den generierten prognostischen Daten konnte ein möglicher fördernder Effekt von AGR3 auf das Koloniebildungsvermögen gut differenzierter MCF7-Brustkrebszellen in einem *loss-of-function*-Modell herausgestellt werden. Im stabilen BT549-*gain-of-function*-Zellkulturmodell zur Abbildung schlecht differenzierter, aggressiver Mammakarzinome, wurde hingegen ein suppressiver Effekt von AGR3 auf das Zellwachstum beobachtet. Es liegen mehrere indirekte Hinweise auf eine mögliche onkogene Wirkung von AGR3 in anderen Krebsentitäten vor. Zum Beispiel im Ovarialkarzinom konnte eine mögliche

Involvierung von AGR3 in die Entstehung einer Cisplatin-Resistenz beobachtet werden [130]. Erst kürzlich wurde in *in vitro*-Experimenten mit Zelllinien des humanen Endometriumkarzinoms indirekt auf mögliche Zellwachstums-fördernde Eigenschaften von AGR3 geschlossen [309]. Eine Studie von Al Zeyadi *et al.* zeigt zudem eine Amplifikation des AGR3-Lokus im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom auf [310]. Darüber hinaus ist auch das homologe Protein AGR2 ein gut beschriebener onkogener Faktor in einigen Krebsentitäten [99], der auch im Mammakarzinom neben der Metastasierung [111] das Krebszellwachstum von vorwiegend Östrogenrezeptor- α -positiven Zellen fördert [115].

In vorausgegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die AGR2-Expression infolge von Stress des endoplasmatischen Retikulums induziert werden kann [103]. Es wird angenommen, dass AGR2 als Chaperon dazu beiträgt die proteotoxischen Einflüsse fehlgefalteter Proteine zu reduzieren und so Krebszellen unter widrigen Bedingungen innerhalb des Tumormilieus einen Wachstumsvorteil verschaffen kann [104, 114]. Es sollte in dieser Arbeit erstmals untersucht werden, ob die AGR3-Expression ebenfalls durch Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) induzierbar ist und ob dem Protein daher eine ähnliche molekulare Funktion wie AGR2 zukommen kann. In Tunicamycin-Expositions-Experimenten konnte in zwei unabhängigen Brustkrebs-Zellkulturmodellen eine Aufregulation von AGR2 unter ER-Stressbedingungen bestätigt, hingegen eine Induktion der AGR3-Expression nicht nachgewiesen werden. Diese Daten stehen im Einklang mit einer erst kürzlich publizierten Studie zu AGR3, die ebenfalls eine ausbleibende AGR3-Expressionsinduktion infolge von ER-Stress beobachtete [311].

Zusammenfassend wurde mit AGR3 ein möglicher neuer Biomarker identifiziert, der neben einer potentiellen Nutzbarkeit für die Brustkrebs-Früherkennung, einen unabhängigen prognostischen Informationsgewinn über den Krankheitsverlauf gut bis mittelgradig differenzierter Mammakarzinome liefern könnte. Erste funktionelle Daten demonstrieren eine onkogene, Zellwachstums-fördernde Wirkung von AGR3 auf gut differenzierte, lumbale MCF7-Brustkrebszellen und unterstützen somit die prognostischen Daten. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass AGR3 in humanen Brustkrebszellen, ungleich dem homologen Protein AGR2, nicht infolge von ER-Stress induziert wird, was eine nicht vollständige funktionelle Redundanz beider Proteine suggeriert. Die physiologische Rolle von AGR3 sowie der molekulare Mechanismus, der eine Förderung des Zellwachstums in gut/mittelgradig differenzierten Mammakarzinomen bedingt ist bisher unverstanden und muss in Folge-Studien analysiert werden.

4.2.2 Der Kandidat CELSR1

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig eine Subtyp-spezifische Expressionsanalyse für *CELSR1* im humanen Mammakarzinom durchgeführt. Neben einer geringfügigen, nicht signifikanten Aufregulation der *CELSR1*-mRNA-Expression im Mammakarzinom gegenüber Normalgeweben der Brust, konnte eine signifikante Korrelation der *CELSR1*-Expression mit Hormonrezeptor-positiven Karzinomen und niedrigerem Tumorgrad herausgestellt werden. Diese Daten sind im Einklang mit zwei unabhängigen, vorausgehenden Studien, die *CELSR1* als Gen einer Östrogenrezeptor- α -assoziierten Signatur im humanen Mammakarzinom beschrieben [183, 184]. Hinsichtlich der putativen prognostischen Relevanz und funktionellen Bedeutung von CELSR1 für das Mammakarzinom lagen vor Beginn dieser Arbeit keine Studien vor.

Die Durchführung einer univariaten Kaplan-Meier-Überlebensanalyse unter Verwendung einer großen *in silico*-Patientenkohorte des TCGA-Portals [237, 238] ergab eine signifikante Assoziation zwischen erhöhter *CELSR1*-mRNA-Expression und einem verlängerten Rezidiv-freien-Überleben. Hingegen war kein Zusammenhang zwischen *CELSR1*-Expression und dem Gesamtüberleben der Brustkrebs-Patientinnen feststellbar. Ob *CELSR1* einen zusätzlichen Informationsgewinn zu bereits klinisch genutzten prognostischen Markern liefern kann muss in Folge-Studien in einer multivariaten Analyse untersucht werden.

Um zu überprüfen, ob den über die prognostischen Daten suggerierten möglichen tumorsuppressiven Eigenschaften von CELSR1 eine Beeinflussung Tumor-relevanter Zelleigenschaften zugrunde liegt, wurde ein transienter, siRNA-vermittelter CELSR1-*Knockdown* in luminalen, gut differenzierten MCF7-Zellen erzeugt. Die reduzierte CELSR1-Proteinexpression resultierte in einem signifikant gesteigerten Zellwachstum und einer signifikant erhöhten Matrigel-Adhäsion der Zellen. Eine gesicherte Aussage über eine veränderte Zellmigration konnte aufgrund der möglichen Überlagerung mit der beobachteten Zellwachstumssteigerung im 2D-Wundheilungstest nicht getroffen werden und bedarf der weiteren experimentellen Klärung. Insgesamt unterstützen auch diese ersten funktionellen Daten im Mammakarzinom mögliche tumorsuppressive Effekte von CELSR1. Interessanterweise beschrieben Liao und Kollegen *CELSR1* als Bestandteil einer möglichen prognostischen DNA-Signatur zur Vorhersage einer malignen Progression des niedrig-gradigen DCIS zum invasiven Mammakarzinom. Sie beobachteten eine verstärkte Amplifikation des *CELSR1*-Genlokus in prä-invasiven Läsionen (reines DCIS), die sich hingegen beim Übergang zum malignen, invasiven Stadium wieder reduzierte [182]. Diese Daten implizieren damit indirekt eine mögliche suppressive Funktion von *CELSR1* in malignen Brustkrebs-Stadien. In

Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde im zirrhotischen Lebergewebe sowie im hepatozellulären Karzinom eine Hypermethylierung des *CELSR1*-Promotors im Vergleich zu Normalgewebe-Kontrollen verzeichnet [181].

CELSR1 bis 3 zählen zu einer Subgruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (engl. *G Protein-Coupled Receptors*, GPCRs), den Adhäsions-GPCRs [312]. Der Name rührt von einer möglichen dualen Rolle in Zelladhäsion und Signalübertragung her. Für einige Mitglieder ist eine Bindung ihrer N-terminalen, extrazellulären Domäne an zelluläre und in der extrazellulären Matrix befindliche Liganden beschrieben. Zudem gibt es Belege für eine G-Protein-abhängige und –unabhängige Signalübertragung [165]. *CELSR*-Proteine wurden bisher hauptsächlich als zentrale Komponenten des nicht-kanonischen WNT/PCP-Signalweges identifiziert, welchem eine essentielle Bedeutung für embryonale Entwicklungsprozesse wie der Schließung des Neuralrohres in Vertebraten zukommt [143, 147]. Für alle drei Mitglieder der *CELSR*-Familie konnte eine homophile trans-Interaktion ihrer N-terminalen extrazellulären Domänen demonstriert werden [166, 167], die im Speziellen für *CELSR1* nachweislich zu einer Aktivierung stromabwärts gelegener Komponenten des WNT/PCP-Signalweges führte [167]. Für den WNT/PCP-Signalweg und andere nicht-kanonische WNT-Signalwege ist eine biphasische Rolle in der Karzinogenese ähnlich der des TGF β -*Signalling* beschrieben worden [148]. Die überwiegend tumorsuppressiven Effekte in frühen Tumorstadien wurden auf eine Inhibition des hauptsächlich Zellwachstums-fördernden WNT/ β -Catenin-Signalweges zurückgeführt [149, 157, 158, 313], hingegen wird die progressionsfördernde Wirkung in fortgeschrittenen Tumoren über eine Steigerung von Zellmotilität und Invasion und letztlich der Metastasierung von Krebszellen begründet [159–161, 163, 179]. Interessanterweise konnte in Krebszellen der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) eine Aufregulation von Kernkomponenten des PCP-Signalweges inklusive *CELSR1*, insbesondere in Zellen fortgeschrittener Tumorstadien beobachtet werden. Ihre Expression und die gesteigerte Aktivierung des PCP-Signalweges waren mit einer erhöhten Migration und transendothelialer Invasion sowie einer schlechteren Prognose assoziiert [179]. Auch im Mammakarzinom konnte kürzlich demonstriert werden, dass eine Aktivierung der WNT/PCP-Signalkaskade *in vitro* und *in vivo* in einer gesteigerten Migration bzw. Metastasierung von Krebszellen resultierte [163]. Die hier beobachtete Steigerung des Zellwachstums infolge einer *CELSR1*-Expressionsreduktion in MCF7-Brustkrebszellen ist im Einklang mit der beschriebenen möglichen antagonistischen Wirkung des WNT/PCP-Signalweges auf den β -Catenin-abhängigen-Signalweg [157]. Aufgrund der dokumentierten Stimulation der Zellmotilität über den PCP-Signalweg [163] wäre bei einer möglichen Involvierung von *CELSR1* in die PCP-

Signalkaskade im Mammakarzinom parallel eine Reduzierung der Zellmotilität zu erwarten gewesen, die jedoch nicht herausgestellt werden konnte. Eine mögliche Erklärung könnte die Überlagerung migratorischer Veränderungen mit der beobachteten Steigerung des Zellwachstums im 2D-Wundheilungstest darstellen. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, ist die *CELSR1*-Expression im humanen Mammakarzinom eher mit kleinen, gut differenzierten (weniger aggressiven) Tumoren assoziiert, was auf der anderen Seite gegen eine Involvierung des Proteins in den progressionsfördernden WNT/PCP-Signalweg in Mammakarzinomzellen spricht. Denkbar wäre auch eine Involvierung von CELSR2 und/oder 3 anstelle von CELSR1 in die PCP-Signalkaskade humaner Mammakarzinomzellen. Diese Hypothese bedarf jedoch einer weiteren experimentellen Abklärung.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig eine detaillierte Expressionsanalyse für *CELSR1* im humanen Mammakarzinom durchgeführt. Die *CELSR1*-mRNA-Expression ist mit Hormonrezeptor-positiven (luminalen), gut bis mittelgradig differenzierten Mammakarzinomen kleiner Tumorgöße assoziiert. Prognostische und erste funktionelle Daten dieser Arbeit deuten auf mögliche tumorsuppressive Effekte des Proteins im Brustkrebs hin. Die Durchführung einer multivariaten Analyse ist erforderlich um eine putative prognostische Nutzbarkeit von CELSR1 für das humane Mammakarzinom beurteilen zu können. Die zugrunde liegende molekulare Wirkungsweise von CELSR1 im humanen Mammakarzinom ist bisher nicht untersucht und bedarf einer weiteren experimentellen Analyse.

4.2.3 Der Kandidat CTHRC1

CTHRC1 wurde ursprünglich als Protein beschrieben, das bei Gefäßverletzungen durch Fibroblasten und glatte Muskelzellen transient gebildet wird und bemerkenswerterweise ihre Motilität fördert sowie die Ablagerung von Kollagen I inhibiert [186]. CTHRC1 ist in einer großen Anzahl humaner, solider Tumoren einschließlich des Mammakarzinoms aufreguliert [193] und einige Studien unterstützen eine mögliche Beteiligung des Proteins in Prozessen der Tumorprogression [190, 194–197]. So konnte eine Assoziation der CTHRC1-Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium und aggressiven Tumoren sowie schlechter Prognose herausgestellt werden [190, 196, 197, 201, 202]. Zudem zeigten *in vitro*- und *in vivo*-Studien eine CTHRC1-vermittelte Förderung der Motilität und Invasivität von Krebszellen bzw. der Metastasierung [190, 194–197].

Auch im Mammakarzinom deuten zwei neuere Studien auf eine mögliche Involvierung von CTHRC1 in die Progression der Erkrankung hin. Eine Korrelation einer hohen CTHRC1-

Proteinexpression mit positivem Nodalstatus und insgesamt fortgeschrittenem Tumorstadium [202] sowie einem signifikant verkürzten Rezidiv-freien Überleben [201, 202] unterstützen die Beobachtungen zu CTHRC1 in anderen Krebsentitäten. Im Unterschied zur Studie von Kim *et al.* demonstrierten Kharaishvili und Kollegen eine potentielle, prognostische Relevanz einer stromalen CTHRC1-Proteinexpression. Zudem war der beobachtete prognostische Effekt abhängig von einer zusätzlichen stromalen Expression des Proteins Periostin [201]. Kim und Kollegen identifizierten hingegen einen Zusammenhang zwischen Rezidiv-freiem Überleben und der Menge zytoplasmatisch im Tumorepithel exprimierten CTHRC1-Proteins, unabhängig von einer Periostin-Expression.

Trotz dieser Vordaten lagen zu Beginn dieser Arbeit keine funktionellen Analysen zu CTHRC1 im Mammakarzinom vor. Ein Ziel dieser Arbeit bestand folglich darin sowohl die potentielle prognostische Relevanz von CTHRC1 aufgrund der oben beschriebenen Diskrepanz in einem unabhängigen Mammakarzinom-Kollektiv zu überprüfen und ferner, wie bereits für andere Tumorentitäten gezeigt, eine mögliche CTHRC1-vermittelte Beeinflussung der Motilität von Brustkrebszellen und damit einen möglichen Einfluss auf die Metastasierung zu analysieren.

Die univariate Überlebensanalyse unter Verwendung einer großen *in silico*-Patientenkohorte des TCGA-Portals [237, 238] ergab, dass die *CTHRC1*-mRNA-Expression weder einen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben noch das Rezidiv-freie Überleben von Mammakarzinom-Patientinnen darstellt. Es ist dennoch denkbar, dass die Analyse einer CTHRC1-Proteinexpression im Mammakarzinom einen prognostischen Informationsgewinn liefern kann. Von den zwei vorliegenden prognostischen Studien zu CTHRC1 im Mammakarzinom wurde nur in einer der beiden die Unabhängigkeit von derzeit klinisch genutzten Prognoseparametern untersucht [202]. Dort wurde eine signifikante Unabhängigkeit von CTHRC1 als möglicher prognostischer Marker knapp verfehlt ($P=0,06$).

Wie bereits oben beschrieben (siehe Abschnitt 4.1) konnte im Einklang mit bisherigen Studien [193, 201, 202] eine signifikante Aufregulation der *CTHRC1*-mRNA-Expression im Mammakarzinom- gegenüber Normal-Gewebe der Brust im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der *CTHRC1*-mRNA-Expression und fortgeschrittenem Tumorstadium, wie von Kim *et al.* auf Proteinebene in einem Kollektiv humaner Mammakarzinome [202] sowie in anderen Tumorentitäten bereits gezeigt [190, 196], zu überprüfen, wurden zwei unabhängige Mammakarzinom-Kohorten analysiert. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Korrelation der *CTHRC1*-mRNA-Expression mit fortgeschrittenen Brustkrebs-Stadien festgestellt werden.

Die erstmalige Analyse eines möglichen Einflusses von CTHRC1 auf die Migration von Brustkrebszellen sollte durch Generierung eines siRNA-vermittelten CTHRC1-Expressionsverlustes in einer humanen Brustkrebs-Zelllinie erfolgen. Bemerkenswerterweise konnte eine Assoziation der CTHRC1-Expression mit Brustkrebs-Zelllinien des molekularen Subtyps Basal B beobachtet werden. Diese sind durch ein höheres migratorisches und invasives Potential im Vergleich zu Zellen der beiden anderen Subtypen (Luminal, Basal A) charakterisiert [239]. Der siRNA-vermittelte CTHRC1-Expressionsverlust in der Zelllinie BT549 des Subtyps Basal B mit hoher endogener CTHRC1-mRNA- und -Proteinexpression resultierte in einer signifikant reduzierten Motilität der Zellen in einem 2D-Wundheilungstest gegenüber Kontrollansätzen. Dieser fördernde Einfluss von CTHRC1 auf die Migration konnte in einem *Boyden-Chamber*-Migrationstest unter Verwendung des gleichen *in vitro*-Modells bestätigt werden. Der in dieser Arbeit erstmalig im humanen Mammakarzinom aufgezeigte mögliche funktionelle Einfluss von CTHRC1 auf das migratorische Potential von Krebszellen und damit möglicherweise die Metastasierung dieser Entität steht im Einklang mit der beschriebenen funktionellen Rolle von CTHRC1 in anderen Tumorentitäten [190, 193–197, 314]. Neben einer Steigerung der Migration wird zudem häufig eine Modulation der Zell-Matrix-Adhäsion sowie eine CTHRC1-vermittelte Förderung der Invasivität von Krebszellen beschrieben [190, 194, 196, 197]. Diese Zelleigenschaften wurden im vorliegenden Projekt nicht analysiert. Der molekulare Mechanismus, der in einer Steigerung der Zellmigration humaner Brustkrebszellen mündet ist noch nicht bekannt und bedarf einer experimentellen Klärung in weiteren Studien. Einen möglichen Ansatzpunkt könnte die Studie von Yamamoto *et al.* bieten [149]. Dort wurde erstmals demonstriert, dass CTHRC1 möglicherweise als selektiver Aktivator des nicht-kanonischen WNT/PCP-Signalweges wirken kann [149], dessen Effektorproteine wie kleine GTPasen der Rho-Familie, einen direkten Einfluss auf das Aktinzytoskelett ausüben [153]. Diese Beobachtung konnte auch in weiteren Studien im Mundhöhlenkrebs und im gastrointestinalen Stromatumor bestätigt werden [190, 195]. Zudem wurde auch eine Modulation der Integrin-SRC-FAK-Signalkaskade über CTHRC1 beschrieben [194, 197], der eine entscheidende Bedeutung in der Regulation von Migration und Zell-Matrix-Adhäsion zukommt [315].

Zusammengefasst konnte in der vorliegenden Dissertation eine signifikante Aufregulation der *CTHRC1*-mRNA-Expression im Mammakarzinom gegenüber Normalgewebe-Kontrollen bestätigt werden. Die Bestimmung der *CTHRC1*-mRNA-Expression in humanen Tumoren der Brustdrüse erlaubt keine prognostische Stratifizierung der Mammakarzinome, weder bei Betrachtung des Gesamt- noch des Rezidiv-freien Überlebens. Weitere Untersuchungen einer

putativen Nutzbarkeit einer CTHRC1-Proteinexpression als möglichen prognostischen Marker sind erforderlich. Der siRNA-induzierte CTHRC1-Expressionsverlust in der Brustkrebs-Zelllinie BT549 mit einem motilen und invasiven Phänotypen resultierte in einer signifikant reduzierten Zellmigration. Diese hier erstmals beschriebene funktionelle Beeinflussung der Zellmotilität humaner Brustkrebszellen durch CTHRC1 steht im Einklang zur bereits in anderen Tumorentitäten beschriebenen wahrscheinlichen Involvierung des Proteins in die Tumorprogression (Metastasierung). Zusätzliche Experimente sind erforderlich, um zum einen die mögliche CTHRC1-vermittelte Beeinflussung weiterer Krebs-relevanter Zelleigenschaften, zum anderen den zugrunde liegenden molekularen Wirkungsmechanismus von CTHRC1 in Mammakarzinomzellen zu analysieren.

4.2.4 Der Kandidat NMU

Neuromedin U gehört der Neuromedin-Peptid-Familie an und wurde erst kürzlich im Zusammenhang mit Krebserkrankungen beschrieben [316]. Bisher publizierte Studien suggerieren eine überwiegend tumorfördernde Rolle des Peptids, insbesondere eine Beteiligung von NMU an Prozessen, die eine Progression (Metastasierung) mehrerer Krebsentitäten begünstigen [231–234]. Da zu Beginn der vorliegenden Dissertation keine Studien zu NMU im humanen Mammakarzinom existierten, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine erstmalige Analyse der putativen prognostischen Relevanz für diese Entität sowie die Erhebung von Daten zur möglichen funktionellen Rolle von NMU in Entstehung und Progression der Brustkrebserkrankung angestrebt.

Basierend auf der Expressionsanalyse zweier unabhängiger Patientenkohorten konnte eine Assoziation der *NMU*-mRNA-Expression mit Hormonrezeptor-negativen, HER2-positiven Mammakarzinomen herausgestellt werden. Zudem wurde eine erhöhte *NMU*-Expression in größeren Tumoren der Brust (größer pT1) beobachtet. Die detaillierte *NMU*-Expressionsanalyse zeigte eine signifikant erhöhte *NMU*-Expression in allen molekularen Brustkrebs-Subtypen, mit Ausnahme der *normal-like* Fälle, gegenüber der Normalgewebe-Expression. Der Nachweis endogenen NMU-Proteins war nur in wenigen Mammakarzinom-Geweben mit sehr starker *NMU*-mRNA-Expression möglich und kann möglicherweise auf eine geringe Halbwertszeit von NMU [205] und/oder eine geringe Sensitivität des verwendeten Antikörpers zurückzuführen sein. Jedoch implizieren die ersten hier gezeigten, qualitativen Proteinexpressions-Daten für NMU im Mammakarzinomgewebe eine Aufregulation von NMU im Zytoplasma epithelialer Krebszellen im Vergleich zur Proteinexpression im Tumor-angrenzenden Normal-Epithel.

Die univariate Analyse des Rezidiv-freien und des Fernmetastasen-freien Überlebens in Abhängigkeit von der *NMU*-mRNA-Expression zeigte, dass eine erhöhte *NMU*-Expression signifikant mit einem ungünstigen Krankheitsverlauf luminaler Mammakarzinome, jedoch nicht der Brusttumoren nicht-luminaler Subtypen (*Basal-like*, *HER2-enriched*) assoziiert ist. Insbesondere der Zusammenhang einer erhöhten *NMU*-mRNA-Expression mit einem gehäuftem Auftreten von Fernmetastasen unterstützt die Hypothese einer möglichen Involvierung von *NMU* in die Tumorprogression. Eine multivariate Analyse zwecks Beurteilung einer Unabhängigkeit von derzeitig genutzten prognostischen Faktoren und einem damit verbundenen potentiellen klinischen Informationsgewinn steht noch aus. Erst kürzlich, parallel zur Durchführung der vorliegenden *NMU*-basierten Analysen dieser Arbeit wurde *NMU* erstmalig im humanen Mammakarzinom beschrieben [235]. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen, war eine erhöhte *NMU*-mRNA-Expression in der Studie von Rani und Kollegen insbesondere mit einer ungünstigen Prognose *HER2*-positiver Fälle assoziiert. Allerdings ist zu betonen, dass in der erwähnten Studie kein einheitlicher Endpunkt für das Überleben definiert wurde, sondern vielmehr Daten für das Rezidiv-freie, Fernmetastasen-freie sowie das Gesamtüberleben kombiniert wurden [235]. Diese Vorgehensweise erschwert eine verlässliche Aussage der Überlebensdaten. Darüber hinaus konnte eine erhöhte *NMU*-Proteinexpression im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom als prognostischer Parameter für einen ungünstigen Krankheitsverlauf identifiziert werden. Jedoch ergab sich keine signifikante Unabhängigkeit von bekannten prognostischen Markern in der multivariaten Analyse [231].

Ob den prognostischen Daten ein onkogener Effekt von *NMU* zugrunde liegt, der ferner eine Subtyp-Spezifität aufweist, sollte durch Generierung zweier stabiler *gain-of-function*-Modelle unter Verwendung der luminalen Brustkrebs-Zelllinie SKBR3 und basaler Hs578T-Zellen überprüft werden. In der Tat konnten im Einklang mit den prognostischen Daten infolge ektopischer *NMU*-Expression nur Effekte im luminalen SKBR3-, jedoch nicht im basalen Hs578T-Modell beobachtet werden. Die forcierte *NMU*-Expression resultierte in einer signifikant gesteigerten Zellmigration bei gleichzeitig signifikant reduzierter Zellproliferation. Für die progressions-assoziierten Faktoren AGR2, SIP1 und YB1 wurden bereits ähnliche Effekte einer Zellzyklus-Blockade bei gleichzeitiger Steigerung von Migration und Invasion *in vitro* bzw. der Metastasierung *in vivo* demonstriert [131, 317, 318]. Die Beobachtung, dass Rezidive einer Tumorerkrankung wie dem Mammakarzinom erst Jahre später nach adjuvanter Chemotherapie auftreten können, ist mit der aufkommenden Erkenntnis verknüpft, dass vom Primärtumor disseminierte, metastasierende Krebszellen häufig durch einen Phänotypen

charakterisiert sind, der sich durch eine reversibel reduzierte Proliferation (Dormanz) bei paralleler Steigerung des Migrations- und Invasionspotential auszeichnet. Da viele Chemotherapeutika einen toxischen Effekt auf aktiv proliferierende Zellen ausüben, zeigen dormante Krebszellen eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Behandlung mit diesen Medikamenten [319–321]. Es konnte zudem demonstriert werden, dass eine verringerte Zellproliferation direkt mit einer erhöhten Anoikis-Resistenz von Brustzellen verknüpft ist, einer Voraussetzung für die Metastasierung von Zellen in entfernt liegende Gewebe [322]. In Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zeigten Rani und Kollegen ebenfalls eine NMU-vermittelte Steigerung des Potentials von Brustkrebszellen (SKBR3 und HCC1954) zur Migration und zusätzlich zur Invasion. Interessanterweise wurde zudem eine NMU-vermittelte Erhöhung der Anoikis-Resistenz dieser Zellen beobachtet. Mögliche Effekte von NMU auf das Zellwachstum wurden *in vitro* nicht beschrieben. Jedoch wurde eine Reduktion des Tumorwachstums infolge eines stabilen NMU-*Knockdowns* in einem HCC1954-Xenograft-Mausmodell beschrieben [235], die der eigenen Beobachtung einer NMU-vermittelten Zellproliferations-Hemmung entgegensteht. In folgenden Arbeiten wäre es von Bedeutung eine mögliche NMU-vermittelte Anoikis-Resistenz im eigenen SKBR3-Brustkrebsmodell zu analysieren.

Nachfolgend sollten mögliche molekulare Mechanismen untersucht werden, die zur Ausprägung des beobachteten Phänotyps im luminalen SKBR3-Modell beitragen könnten. Es ist bekannt, dass physiologische und pathologische Effekte von NMU hauptsächlich über die beiden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren Neuromedin-U-Rezeptor 1 und 2 (NMUR1 und NMUR2) vermittelt werden, wobei NMUR1 in peripheren Geweben, NMUR2 verstärkt im Zentralnervensystem gebildet wird [205, 212]. Obwohl im Vergleich schwächer exprimiert, konnte neben einer *NMUR1*- auch eine *NMUR2*-mRNA-Expression im humanen Brustgewebe nachgewiesen werden [212]. Im Ovar der Ratte wurde überraschenderweise NMUR2 und nicht NMUR1 als dominanter NMU-Rezeptor identifiziert [323]. Erst kürzlich beschrieben Takahashi *et al.* im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom ein Heterodimer aus GHSR (engl. *Growth Hormone Secretagogue Receptor*) und NTSR1 (engl. *Neurotensin Receptor 1*) als mutmaßlichen Rezeptor für die Vermittlung onkogener NMU-basierter Effekte auf Zellwachstum und Invasion humaner Lungenkarzinom-Zelllinien [231]. Im innerhalb dieser Arbeit generierten SKBR3-Brustkrebsmodell konnte eine mäßige bis starke *NMUR2*- sowie eine starke *NTSR1*-, jedoch eine fehlende mRNA-Expression von *NMUR1* und *GHSR* herausgestellt werden. Im basalen Hs578T-Modell wurde hingegen die Expression keiner der genannten Rezeptoren beobachtet. Es ist daher denkbar, dass die phänotypischen Effekte

infolge einer ektopischen NMU-Expression im SKBR3-Modell via NMUR2 vermittelt werden und das Ausbleiben eines entsprechenden Phänotyps im basalen Modell auf das Fehlen der möglichen NMU-Rezeptoren zurückzuführen ist. Rani und Kollegen beobachteten eine Expression beider Rezeptoren NMUR1 und NMUR2 in den untersuchten Brustkrebs-Zelllinien SKBR3 und HCC1954 [235]. Daten des TCGA-Portals [237, 238] unterstreichen eine verstärkte Expression von *NMUR2* im luminalen gegenüber dem basalen Subtypen sowohl in humanen Brustkrebs-Zelllinien als auch in humanen Mammakarzinom-Geweben. In Übereinstimmung mit den eigenen Beobachtungen zeigen die *in silico*-Daten zudem eine deutlich stärkere *NMUR2*- gegenüber der *NMUR1*-mRNA-Expression in SKBR3-Zellen (siehe <https://genome-cancer.ucsc.edu/>). Sowohl NMUR1 als auch NMUR2 wurden bereits als mögliche Rezeptoren für die Vermittlung onkogener Effekte von NMU beschrieben [229, 233, 234]. Interessanterweise zeigten Ketterer und Kollegen eine NMU-NMUR2-vermittelte Steigerung der Migration und Invasivität humaner Pankreaskarzinomzellen [233].

Um mögliche NMU-modulierte biologische Prozesse und Schlüsselmoleküle zu identifizieren wurde in dieser Arbeit erstmalig eine genomweite *Microarray*-Analyse im humanen Mammakarzinom unter Verwendung unabhängiger Einzelklone des luminalen SKBR3-*gain-of-function*-Modells durchgeführt. Eine GO (engl. *Gene Ontology*)-Analyse der *Microarray*-Daten identifizierte signifikante Veränderungen in mehreren Krebs-relevanten Signalwegen, darunter eine mögliche negative Regulation des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges. In Übereinstimmung mit den hier gemachten Beobachtungen konnte bereits zuvor eine NMU-vermittelte Modulation des WNT-Rezeptor-Signalweges ebenfalls via NMUR2 im Hypothalamus von Ratten beschrieben werden [285]. Über eine Klassen-Vergleichsanalyse wurden im Anschluss signifikant differentiell exprimierte Gene identifiziert, die dem WNT-Signalweg zugeordnet werden konnten, darunter *NKD2*, *WNT11* und *DKK1* [154, 287, 293]. Die nachfolgende detaillierte Untersuchung der Expression von zentralen Komponenten des WNT-Signalweges in SKBR3-Einzelklonen mittels *Real-Time* PCR- und Western Blot-Analyse bestätigte eine signifikante Aufregulation von *NKD2* und *WNT11* in stabil transfizierten, NMU-überexprimierenden SKBR3-Klonen gegenüber den Leervektor-Kontrollen. *Naked*-Proteine (*NKD1* und *NKD2*) wurden in verschiedenen Studien als mögliche „Schalter“-Proteine beschrieben, die über eine direkte Wechselwirkung mit zytoplasmatischem *Dishevelled*, einer zentralen Komponente des kanonischen WNT/ β -Catenin- und des nicht-kanonischen WNT/PCP-Signalweges [138, 143], sowohl die Aktivität der β -Catenin-abhängigen Signalkaskade hemmen als auch den PCP-Signalweg stimulieren können [155, 286]. *WNT11* wurde als nicht-kanonisches WNT-Molekül klassifiziert, das neben *WNT5A* den

Aktinzytoskelett-modulierenden WNT/PCP-Signalweg aktivieren kann [147, 148, 324]. Erst kürzlich konnte WNT11 als essentieller Faktor für eine Steigerung der Migration und Metastasierung von Brustkrebszellen über die Stimulation der PCP-Signalkaskade identifiziert werden [163]. Um die Hypothese einer möglichen Stimulation des nicht-kanonischen WNT/PCP-Signalweges über NMU im SKBR3-Modell zu überprüfen sollte eine mögliche Aktivierung von stromabwärts gelegenen Effektorproteinen der PCP-Kaskade, den kleinen GTPasen der Rho-Familie wie RAC1 gemessen werden [153]. In der Tat konnte eine signifikante Erhöhung des Ratios aus der Menge der aktivierten GTP-gebundenen Form zur Gesamtmenge zellulären RAC1-Proteins in NMU-Einzelklonen im Vergleich zu Leervektor-Kontrollen verzeichnet werden. Vorherige Studien demonstrierten bereits, dass eine verstärkte Aktivierung von RAC1 mit einer gesteigerten Migration und Invasion von Krebszellen assoziiert ist [160, 325].

Abschließend sollte untersucht werden, ob die ektopische NMU-Expression neben einer möglichen Stimulation des WNT/PCP-Signalweges eine Modulation der β -Catenin-abhängigen Signalkaskade zur Folge haben kann. Die Co-Rezeptoren LRP5/6 sind essentiell für die Aktivierung des kanonischen Signalweges [138, 288]. Die Expressionsanalyse im SKBR3-Modell zeigte eine signifikante Reduktion von LRP6 auf mRNA- und Proteinebene sowie eine signifikant verminderte Menge der aktivierten Form des Rezeptors (Phospho-LRP6 Ser1490) in NMU-Einzelklonen im Vergleich zu den Leervektor-Kontrollen. Hingegen konnte kein signifikanter Unterschied in der *LRP5*-mRNA-Expression zwischen beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass keine vollständige funktionelle Redundanz der beiden Rezeptoren LRP5 und 6 besteht und dass dem Rezeptor LRP6 eine dominantere Rolle innerhalb der β -Catenin-abhängigen-Signaltransduktion zukommt als LRP5 [289, 326]. Beispielsweise ist der *Knockout* von LRP6 in Mäusen embryonal lethal, hingegen sind *LRP5-Knockout*-Mäuse lebensfähig und fertil [327, 328]. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnte gezeigt werden, dass der alleinige Expressionsverlust von LRP6 in humanen Brustkrebszellen, die zusätzlich *LRP5*-exprimieren, zu einer deutlichen Inhibition des WNT/ β -Catenin-Signalweges mit einhergehender Reduktion des Zellwachstums sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt [140].

Es ist denkbar, dass sowohl die erhöhte Bildung von NKD2 als möglicher Antagonist des kanonischen WNT-Signalweges, eine verminderte Bildung des kanonischen Co-Rezeptors LRP6, als auch die putative Stimulation des nicht-kanonischen PCP-Signalweges über eine erhöhte Expression von NKD2 und WNT11 in NMU-Einzelklonen insgesamt in einer reduzierten Aktivierung der kanonischen WNT-Signalkaskade münden kann. Eine

antagonistische Wirkung nicht-kanonischer WNT-Signalwege auf den β -Catenin-abhängigen Signalweg wurde bereits mehrfach beschrieben [149, 151, 158, 329]. Die Aktivierung des kanonischen WNT-Signalweges führt zur Akkumulation zytosolischen und nukleären β -Catenins, dessen Interaktion mit TCF/LEF-Transkriptionsfaktoren zur Expression von Zielgenen führt [139]. Die Expressionsanalyse unabhängiger NMU- und Leervektor-Einzelklone des SKBR3-Modells zeigte eine klare Herabregulation des zentralen kanonischen WNT-Zielgens *MYC* [291] sowie der weiteren TCF/LEF-regulierten Gene *DKK1* [293], *CD44* [292] und *CLDN1* [294]. Es ist zu betonen, dass weitere Folge-Experimente notwendig sind, um eine putative Hemmung der kanonischen WNT-Signalkaskade zu bestätigen. Eine etablierte Analyse-Strategie stellt die Verwendung TCF-regulierter Reporter-Konstrukte dar [140, 149], welche gegenüber der Messung zellulärer β -Catenin-Proteinlevel zu bevorzugen sind. Es ist bekannt, dass eine Inhibition des kanonischen WNT-Signalweges auch unabhängig von einer Beeinflussung des β -Catenin-Proteinlevels stromabwärts auf der Ebene der TCF-Transkription erfolgen kann [151, 329]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die vorhandene Menge β -Catenins nicht zwangsläufig mit der TCF/LEF-abhängigen transkriptionellen Aktivität korreliert [330].

MYC ist ein zentraler Transkriptionsfaktor, dessen Expression über eine Vielzahl an Signalwegen inklusive der kanonischen WNT/ β -Catenin-Kaskade reguliert wird. Als pleiotroper Faktor, nimmt MYC Einfluss auf viele zelluläre Prozesse, darunter die Zellproliferation und die Apoptose [52]. Zudem ist MYC in rund 16% aller humanen Mammakarzinome amplifiziert [52] und es konnte im Mausmodell demonstriert werden, dass MYC die Entstehung von Tumoren der Brustdrüse fördert [295, 331]. Liu und Kollegen beschrieben kürzlich, dass MYC die Zellproliferation humaner Brustkrebs-Zelllinien sowohl *in vitro* als auch im Xenograft-Mausmodell stimuliert, andererseits die Motilität und Invasivität und damit die Metastasierung von Brustkrebszellen inhibiert [332]. In einer weiteren Studie von Cappellen *et al.* konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden, d.h. MYC hatte einen überwiegend aktivierenden Effekt auf die Proliferation mehrerer Brustkrebs-Zelllinien. Die Effekte auf die Migration waren jedoch divergent: wohingegen der *Knockdown* von MYC die Migration in basalen MDA-MB-231-Zellen hemmte, führte dieser zu einer Steigerung der Migration in luminalen MCF7-Zellen [51]. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Expressionsreduktion von MYC im luminalen SKBR3-Modell infolge ektopischer NMU-Expression könnte daher zur verminderten Zellproliferation sowie möglicherweise auch der gesteigerten Motilität der SKBR3-Zellen beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Subtyp-spezifische Expressionsanalyse für NMU im humanen Mammakarzinom durchgeführt. Es konnte eine Aufregulation der *NMU*-mRNA-Expression in allen molekularen Brustkrebs-Subtypen (mit Ausnahme der *normal-like* Fälle) gegenüber der Normalgewebe-Expression beschrieben werden. Die stärkste Expression zeigte sich in den Subtypen *Basal-like* und *HER2-enriched*. Darüber hinaus wurde *NMU* verstärkt in größeren Tumoren der Brust exprimiert. Eine NMU-Proteinexpression war nur in wenigen Fällen mit sehr starker *NMU*-mRNA-Expression detektierbar. Im Einklang mit einer möglichen Involvierung von Neuromedin U in die Tumorprogression konnte neben der signifikanten Assoziation einer erhöhten *NMU*-mRNA-Expression mit einem verkürzten Rezidiv-freien Überleben zudem ein gehäuftes Auftreten von Fernmetastasen in Tumoren mit erhöhter *NMU*-Expression beschrieben werden. Eine Subgruppen-Analyse ergab, dass eine erhöhte *NMU*-mRNA-Expression einen prognostischen Faktor für einen ungünstigen Krankheitsverlauf luminaler Brustkrebsfälle, jedoch nicht anderer Brustkrebs-Subtypen darstellt. Eine multivariate Analyse zwecks Beurteilung einer Unabhängigkeit von anderen klinisch genutzten prognostischen Faktoren steht jedoch noch aus. In Übereinstimmung mit den prognostischen Daten der univariaten Analyse führte die ektopische NMU-Expression in luminalen SKBR3-, hingegen nicht in basalen Hs578T-Zellen zur Ausprägung eines malignen Phänotyps, der durch eine gesteigerte Zellmigration bei gleichzeitiger Proliferations-Reduktion charakterisiert ist. Ein mögliches mechanistisches Modell könnte wie folgt aussehen: die Bindung von NMU in luminalen Brustkrebszellen an den Rezeptor NMUR2 führt unter anderem zur Modulation des WNT-Rezeptor-Signalweges, mit einer möglichen Stimulation der nicht-kanonischen WNT/PCP-, andererseits einer hypothetischen Aktivitätshemmung der β -Catenin-abhängigen Signalkaskade. Eine resultierende gesteigerte Aktivierung der kleinen GTPase RAC1 sowie eine Herabregulation des Proto-Onkogens MYC könnten zur Ausprägung des beobachteten Phänotyps beitragen. Es ist folglich möglich, dass die Aktivierung der NMU-Expression in größeren (fortgeschrittenen) Mammakarzinomen des luminalen Subtyps zur Entstehung motiler, gering proliferierender Krebszellen beitragen kann, die das Potential zur Ausbildung von Metastasen aufweisen.

4.3 Schlussfolgerungen

Schlussfolgernd konnten im Rahmen dieser Arbeit mit AGR3 und AGR2 zwei neue potentielle Serumbiomarker identifiziert werden, die eine Brustkrebs-Früherkennung, komplementär zur *Screening*-Mammographie, unterstützen könnten.

Ferner wurde erstmalig demonstriert, dass die Bestimmung der AGR3-Proteinexpression einen Informationsgewinn über den Krankheitsverlauf gut bis mittelgradig differenzierter Mammakarzinome, zusätzlich zu derzeitig klinisch genutzten prognostischen Stratifizierungsmarkern, liefern könnte. Die hier erstmalig durchgeführte Untersuchung einer putativen funktionellen Rolle von AGR3 innerhalb der Karzinogenese des humanen Mammakarzinoms, deutet auf einen Zellwachstums-stimulierenden Effekt von AGR3 in luminalen, gut differenzierten Brustkrebszellen hin. In Folge-Studien muss eine klinische Nutzbarkeit von AGR3 als möglicher neuer Prognosemarker und gegebenenfalls als putative therapeutische Zielstruktur für das Mammakarzinom weiter validiert werden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten konnten eine potentielle progressionsfördernde Wirkung der sezernierten Faktoren CTHRC1 und NMU im humanen Mammakarzinom erstmalig funktionell demonstrieren bzw. weiter erhärten. In zukünftigen Arbeiten ist zu validieren, ob sich diese Proteine möglicherweise für die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien zur Blockade einer Metastasierung der Brustkrebserkrankung eignen könnten.

5 Literaturverzeichnis

1. Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C: *Krebs in Deutschland 2009/2010. Gesundheitsberichterstattung Des Bundes. Robert-Koch-Institut.* Berlin; 2013.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2011, **61**:69–90.
3. Magnusson CM, Persson IR, Baron JA, Ekblom A, Bergström R, Adami HO: **The role of reproductive factors and use of oral contraceptives in the aetiology of breast cancer in women aged 50 to 74 years.** *Int J Cancer* 1999, **80**:231–6.
4. Collins JA, Blake JM, Crosignani PG: **Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment.** *Hum Reprod Update* 2005, **11**:545–60.
5. Hulka BS, Moorman PG: **Breast cancer: hormones and other risk factors.** *Maturitas* 2001, **38**:103–13; discussion 113–6.
6. James FR, Wootton S, Jackson A, Wiseman M, Copson ER, Cutress RI: **Obesity in breast cancer - What is the risk factor?** *Eur J Cancer* 2015, **51**:705–720.
7. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W: **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.** *Science* 1994, **266**:66–71.
8. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G: **Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2.** *Nature* , **378**:789–92.
9. Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth B-M, Wolf U: *Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung Der Prävalenzen Zwischen 1990 Und 2010. Robert-Koch-Institut.* Berlin; 2010.
10. Engel JM, Stankowski-Drengler TJ, Stankowski R V, Liang H, Doi SA, Onitilo AA: **All-cause mortality is decreased in women undergoing annual mammography before breast cancer diagnosis.** *AJR Am J Roentgenol* 2015, **204**:898–902.
11. Lüllmann-Rauch R: *Taschenlehrbuch Histologie.* 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006.
12. Lüllmann-Rauch R: *Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2003.
13. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG: **An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions.** *J Natl Cancer Inst* 1975, **55**:231–73.
14. Wellings SR, Jensen HM: **On the origin and progression of ductal carcinoma in the human breast.** *J Natl Cancer Inst* 1973, **50**:1111–8.

15. Wagener C, Müller O: *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, Klinische Aspekte*. 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2010.
16. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS: **Histological types of breast cancer: how special are they?** *Mol Oncol* 2010, **4**:192–208.
17. Sinn H-P, Kreipe H: **A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition.** *Breast Care (Basel)* 2013, **8**:149–54.
18. Guiu S, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessey BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner N, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, Reis-Filho JS: **Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement.** *Ann Oncol* 2012, **23**:2997–3006.
19. Elston EW, Ellis IO: **Method for grading breast cancer.** *J Clin Pathol* 1993, **46**:189–90.
20. Sobin L, Wittekind C: **TNM classification of malignant tumors.** 5th edition. New York: Wiley-Liss; 1997.
21. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R: **Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials.** *Lancet* 2011, **378**:771–84.
22. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF: **Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update.** *Arch Pathol Lab Med* 2014, **138**:241–56.
23. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**:747–52.
24. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:10869–74.
25. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale A-L, Botstein D: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:8418–23.
26. Sotiriou C, Neo S-Y, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET: **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:10393–8.

27. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS: **Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes.** *J Clin Oncol* 2009, **27**:1160–7.
28. Cheang MCU, Voduc KD, Tu D, Jiang S, Leung S, Chia SK, Shepherd LE, Levine MN, Pritchard KI, Davies S, Stijleman IJ, Davis C, Ebbert MTW, Parker JS, Ellis MJ, Bernard PS, Perou CM, Nielsen TO: **Responsiveness of intrinsic subtypes to adjuvant anthracycline substitution in the NCIC.CTG MA.5 randomized trial.** *Clin Cancer Res* 2012, **18**:2402–12.
29. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J: **Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011.** *Ann Oncol* 2011, **22**:1736–47.
30. Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO: **Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2009, **101**:736–50.
31. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer J-U, Costa S-D, Decker T, Diel I, Dimpfl T, Eiermann W, Fehm T, Friese K, Jänicke F, Janni W, Jonat W, Kiechle M, Köhler U, Lück H-J, Maass N, Possinger K, Rody A, Scharl A, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, et al.: **13th st. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a german team of experts (zurich 2013).** *Breast Care (Basel)* 2013, **8**:221–9.
32. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B: **Clonal analysis of human colorectal tumors.** *Science* 1987, **238**:193–7.
33. Wang JCY, Dick JE: **Cancer stem cells: lessons from leukemia.** *Trends Cell Biol* 2005, **15**:494–501.
34. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF: **Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:3983–8.
35. Nowell PC: **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science* 1976, **194**:23–8.
36. Russo J, Yang X, Hu YF, Bove BA, Huang Y, Silva ID, Tahin Q, Wu Y, Higgy N, Zekri A, Russo IH: **Biological and molecular basis of human breast cancer.** *Front Biosci* 1998, **3**:D944–60.
37. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57–70.
38. Hanahan D, Weinberg RA: **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011, **144**:646–74.
39. Weinberg RA: **The retinoblastoma protein and cell cycle control.** *Cell* 1995, **81**:323–30.

40. Hanahan D, Folkman J: **Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.** *Cell* 1996, **86**:353–64.
41. Vergara D, Simeone P, Latorre D, Cascione F, Leporatti S, Trerotola M, Giudetti AM, Capobianco L, Lunetti P, Rizzello A, Rinaldi R, Alberti S, Maffia M: **Proteomics analysis of E-cadherin knockdown in epithelial breast cancer cells.** *J Biotechnol* 2014.
42. Christofori G, Semb H: **The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene.** *Trends Biochem Sci* 1999, **24**:73–6.
43. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD: **Genomic instability--an evolving hallmark of cancer.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**:220–8.
44. Land H, Parada LF, Weinberg RA: **Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis.** *Science* 1983, **222**:771–8.
45. Der CJ: **Cellular oncogenes and human carcinogenesis.** *Clin Chem* 1987, **33**:641–6.
46. Osborne C, Wilson P, Tripathy D: **Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications.** *Oncologist* 2004, **9**:361–77.
47. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ: **The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy.** *Oncologist* 2003, **8**:307–25.
48. Paplomata E, Nahta R, O'Regan RM: **Systemic therapy for early-stage HER2-positive breast cancers: time for a less-is-more approach?** *Cancer* 2015, **121**:517–26.
49. Lee EYHP, Muller WJ: **Oncogenes and tumor suppressor genes.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, **2**:a003236.
50. Barnes DM, Gillett CE: **Cyclin D1 in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 1998, **52**:1–15.
51. Cappellen D, Schlange T, Bauer M, Maurer F, Hynes NE: **Novel c-MYC target genes mediate differential effects on cell proliferation and migration.** *EMBO Rep* 2007, **8**:70–6.
52. Hynes NE, Stoelzle T: **Key signalling nodes in mammary gland development and cancer: Myc.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**:210.
53. Karakas B, Bachman KE, Park BH: **Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers.** *Br J Cancer* 2006, **94**:455–9.
54. Brady CA, Attardi LD: **p53 at a glance.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 15):2527–32.
55. Hainaut P, Hollstein M: **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** *Adv Cancer Res* 2000, **77**:81–137.
56. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale A-L: **The clinical value of**

somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006, **12**:1157–67.

57. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA: **Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype.** *Cancer Res* 2003, **63**:6643–50.

58. Fackenthal JD, Olopade OI: **Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**:937–948.

59. Turner N, Tutt A, Ashworth A: **Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours.** *Curr Opin Pharmacol* 2005, **5**:388–93.

60. Strimbu K, Tavel JA: **What are biomarkers?** *Curr Opin HIV AIDS* 2010, **5**:463–6.

61. Henry NL, Hayes DF: **Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer.** *Oncologist* 2006, **11**:541–52.

62. Graham LJ, Shupe MP, Schneble EJ, Flynt FL, Clemenshaw MN, Kirkpatrick AD, Gallagher C, Nissan A, Henry L, Stojadinovic A, Peoples GE, Shumway NM: **Current Approaches and Challenges in Monitoring Treatment Responses in Breast Cancer.** *J Cancer* 2014, **5**:58–68.

63. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, Radich J, Anderson G, Hartwell L: **The case for early detection.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:243–52.

64. Bretthauer M, Kalager M: **Principles, effectiveness and caveats in screening for cancer.** *Br J Surg* 2013, **100**:55–65.

65. Gøtzsche PC, Nielsen M: **Screening for breast cancer with mammography.** *Cochrane database Syst Rev* 2009:CD001877.

66. Armstrong K, Moye E, Williams S, Berlin JA, Reynolds EE: **Screening mammography in women 40 to 49 years of age: a systematic review for the American College of Physicians.** *Ann Intern Med* 2007, **146**:516–26.

67. Stomper PC, D'Souza DJ, DiNitto PA, Arredondo MA: **Analysis of parenchymal density on mammograms in 1353 women 25-79 years old.** *AJR Am J Roentgenol* 1996, **167**:1261–5.

68. Carney PA, Miglioretti DL, Yankaskas BC, Kerlikowske K, Rosenberg R, Rutter CM, Geller BM, Abraham LA, Taplin SH, Dignan M, Cutter G, Ballard-Barbash R: **Individual and combined effects of age, breast density, and hormone replacement therapy use on the accuracy of screening mammography.** *Ann Intern Med* 2003, **138**:168–75.

69. Berg WA: **Tailored supplemental screening for breast cancer: what now and what next?** *AJR Am J Roentgenol* 2009, **192**:390–9.

70. Hooley RJ, Andrejeva L, Scoutt LM: **Breast cancer screening and problem solving using mammography, ultrasound, and magnetic resonance imaging.** *Ultrasound Q* 2011, **27**:23–47.

71. Smith-Bindman R, Chu P, Miglioretti DL, Quale C, Rosenberg RD, Cutter G, Geller B, Bacchetti P, Sickles EA, Kerlikowske K: **Physician predictors of mammographic accuracy.** *J Natl Cancer Inst* 2005, **97**:358–67.
72. Kloten V, Becker B, Winner K, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T, Veeck J, Hartmann A, Knüchel R, Dahl E: **Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening.** *Breast Cancer Res* 2013, **15**:R4.
73. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC: **American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2007, **25**:5287–312.
74. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, Winget M, Yasui Y: **Phases of biomarker development for early detection of cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**:1054–61.
75. Bast RC, Badgwell D, Lu Z, Marquez R, Rosen D, Liu J, Baggerly KA, Atkinson EN, Skates S, Zhang Z, Lokshin A, Menon U, Jacobs I, Lu K: **New tumor markers: CA125 and beyond.** *Int J Gynecol Cancer* , **15 Suppl 3**:274–81.
76. Rusling JF, Kumar C V, Gutkind JS, Patel V: **Measurement of biomarker proteins for point-of-care early detection and monitoring of cancer.** *Analyst* 2010, **135**:2496–511.
77. Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM: **Mining the plasma proteome for cancer biomarkers.** *Nature* 2008, **452**:571–9.
78. Ying L, Wang Q: **Microfluidic chip-based technologies: emerging platforms for cancer diagnosis.** *BMC Biotechnol* 2013, **13**:76.
79. Garczyk S, von Stillfried S, Antonopoulos W, Hartmann A, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T, Tannapfel A, Ergönenc Y, Knüchel R, Rose M, Dahl E: **AGR3 in Breast Cancer: Prognostic Impact and Suitable Serum-Based Biomarker for Early Cancer Detection.** *PLoS One* 2015, **10**:e0122106.
80. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FCG, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, et al.: **American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:2784–95.
81. Stephens RW, Brünner N, Jänicke F, Schmitt M: **The urokinase plasminogen activator system as a target for prognostic studies in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 1998, **52**:99–111.
82. Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Christensen IJ, Thomssen C, Kates R, Spyrtos F, Fernö M, Eppenberger-Castori S, Sweep CGJF, Ulm K, Peyrat J-P, Martin P-M, Magdelenat H, Brünner N, Duggan C, Lisboa BW, Bendahl P-O, Quillien V, Daver A, Ricolleau G, Meijer-van Gelder ME, Manders P, Fiets WE, Blankenstein MA, Broët P, Romain

S, Daxenbichler G, Windbichler G, et al.: **Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients.** *J Natl Cancer Inst* 2002, **94**:116–28.

83. Isaacs C, Stearns V, Hayes DF: **New prognostic factors for breast cancer recurrence.** *Semin Oncol* 2001, **28**:53–67.

84. Cummings FJ: **Evolving uses of hormonal agents for breast cancer therapy.** *Clin Ther* 2002, **24 Suppl C**:C3–25.

85. Arpino G, Weiss H, Lee A V, Schiff R, De Placido S, Osborne CK, Elledge RM: **Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance.** *J Natl Cancer Inst* 2005, **97**:1254–61.

86. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL: **Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.** *Science* 1987, **235**:177–82.

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

88. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N: **A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer.** *N Engl J Med* 2004, **351**:2817–26.

89. Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE, Wickerham DL, Wolmark N: **Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer.** *J Clin Oncol* 2006, **24**:3726–34.

90. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH: **Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer.** *Nature* 2002, **415**:530–6.

91. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AAM, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R: **A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.** *N Engl J Med* 2002, **347**:1999–2009.

92. Filipits M, Rudas M, Jakesz R, Dubsy P, Fitzal F, Singer CF, Dietze O, Greil R, Jelen A, Sevela P, Freibauer C, Müller V, Jänicke F, Schmidt M, Kölbl H, Rody A, Kaufmann M, Schroth W, Brauch H, Schwab M, Fritz P, Weber KE, Feder IS, Hennig G, Kronenwett R, Gehrman M, Gnant M: **A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors.** *Clin Cancer Res* 2011, **17**:6012–20.

93. Denkert C, Kronenwett R, Schlake W, Bohmann K, Penzel R, Weber KE, Höfler H, Lehmann U, Schirmacher P, Specht K, Rudas M, Kreipe H-H, Schraml P, Schlake G, Bago-Horvath Z, Tiecke F, Varga Z, Moch H, Schmidt M, Prinzler J, Kerjaschki D, Sinn BV, Müller BM, Filipits M, Petry C, Dietel M: **Decentral gene expression analysis for ER+/Her2- breast cancer: results of a proficiency testing program for the EndoPredict assay.** *Virchows Arch* 2012, **460**:251–9.
94. Györfy B, Hatzis C, Sanft T, Hofstatter E, Aktas B, Pusztai L: **Multigene prognostic tests in breast cancer: past, present, future.** *Breast Cancer Res* 2015, **17**:11.
95. Alanen HI, Williamson RA, Howard MJ, Lappi A-K, Jäntti HP, Rautio SM, Kellokumpu S, Ruddock LW: **Functional characterization of ERp18, a new endoplasmic reticulum-located thioredoxin superfamily member.** *J Biol Chem* 2003, **278**:28912–20.
96. Persson S, Rosenquist M, Knoblach B, Khosravi-Far R, Sommarin M, Michalak M: **Diversity of the protein disulfide isomerase family: identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family.** *Mol Phylogenet Evol* 2005, **36**:734–40.
97. Ivanova AS, Tereshina MB, Ermakova G V, Belousov V V, Zarausky AG: **Agr genes, missing in amniotes, are involved in the body appendages regeneration in frog tadpoles.** *Sci Rep* 2013, **3**:1279.
98. Benham AM: **The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease.** *Antioxid Redox Signal* 2012, **16**:781–9.
99. Chevet E, Fessart D, Delom F, Mulot A, Vojtesek B, Hrstka R, Murray E, Gray T, Hupp T: **Emerging roles for the pro-oncogenic anterior gradient-2 in cancer development.** *Oncogene* 2012, **32**:2499–509.
100. Park S-W, Zhen G, Verhaeghe C, Nakagami Y, Nguyenvu LT, Barczak AJ, Killeen N, Erle DJ: **The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:6950–5.
101. Zhao F, Edwards R, Dizon D, Afrasiabi K, Mastroianni JR, Geyfman M, Ouellette AJ, Andersen B, Lipkin SM: **Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in Agr2^{-/-} mice.** *Dev Biol* 2010, **338**:270–9.
102. Schroeder BW, Verhaeghe C, Park S-W, Nguyenvu LT, Huang X, Zhen G, Erle DJ: **AGR2 is induced in asthma and promotes allergen-induced mucin overproduction.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012, **47**:178–85.
103. Higa A, Mulot A, Delom F, Bouchecareilh M, Nguyễn DT, Boismenu D, Wise MJ, Chevet E: **Role of pro-oncogenic protein disulfide isomerase (PDI) family member anterior gradient 2 (AGR2) in the control of endoplasmic reticulum homeostasis.** *J Biol Chem* 2011, **286**:44855–68.
104. Ryu J, Park SG, Lee PY, Cho S, Lee DH, Kim GH, Kim J-H, Park BC: **Dimerization of pro-oncogenic protein Anterior Gradient 2 is required for the interaction with BiP/GRP78.** *Biochem Biophys Res Commun* 2013, **430**:610–5.

105. Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, Logsdon CD: **Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival.** *Cancer Res* 2008, **68**:7811–8.
106. Pohler E, Craig AL, Cotton J, Lawrie L, Dillon JF, Ross P, Kernohan N, Hupp TR: **The Barrett's antigen anterior gradient-2 silences the p53 transcriptional response to DNA damage.** *Mol Cell Proteomics* 2004, **3**:534–47.
107. Fritzsche FR, Dahl E, Dankof A, Burkhardt M, Pahl S, Petersen I, Dietel M, Kristiansen G: **Expression of AGR2 in non small cell lung cancer.** *Histol Histopathol* 2007, **22**:703–8.
108. Zhang J-S, Gong A, Cheville JC, Smith DI, Young CYF: **AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer.** *Genes Chromosomes Cancer* 2005, **43**:249–59.
109. Park K, Chung YJ, So H, Kim K, Park J, Oh M, Jo M, Choi K, Lee E-J, Choi Y-L, Song SY, Bae D-S, Kim B-G, Lee J-H: **AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration.** *Exp Mol Med* 2011, **43**:91–100.
110. Thompson DA, Weigel RJ: **hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **251**:111–6.
111. Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R: **Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas.** *Cancer Res* 2005, **65**:3796–805.
112. Fritzsche FR, Dahl E, Pahl S, Burkhardt M, Luo J, Mayordomo E, Gansukh T, Dankof A, Knuechel R, Denkert C, Winzer K-J, Dietel M, Kristiansen G: **Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:1728–34.
113. Fletcher GC, Patel S, Tyson K, Adam PJ, Schenker M, Loader JA, Daviet L, Legrain P, Parekh R, Harris AL, Terrett JA: **hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan.** *Br J Cancer* 2003, **88**:579–85.
114. Moenner M, Pluquet O, Bouche-careilh M, Chevet E: **Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer.** *Cancer Res* 2007, **67**:10631–4.
115. Vanderlaag KE, Hudak S, Bald L, Fayadat-Dilman L, Sathe M, Grein J, Janatpour MJ: **Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and survivin.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**:R32.
116. Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A, Maslon MM, Naughton C, Langdon S, Murray E, Larionov A, Petrakova K, Muller P, Dixon MJ, Hupp TR, Vojtesek B: **The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers.** *Oncogene* 2010, **29**:4838–47.

117. Wang Z, Hao Y, Lowe AW: **The Adenocarcinoma-Associated Antigen, AGR2, Promotes Tumor Growth, Cell Migration, and Cellular Transformation.** *Cancer Res* 2008, **68**:492–497.
118. Innes HE, Liu D, Barraclough R, Davies MPA, O'Neill PA, Platt-Higgins A, de Silva Rudland S, Sibson DR, Rudland PS: **Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally treated breast cancer patients.** *Br J Cancer* 2006, **94**:1057–65.
119. Barraclough DL, Platt-Higgins A, de Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley J, West CR, Rudland PS: **The metastasis-associated anterior gradient 2 protein is correlated with poor survival of breast cancer patients.** *Am J Pathol* 2009, **175**:1848–57.
120. Dumartin L, Whiteman HJ, Weeks ME, Hariharan D, Dmitrovic B, Iacobuzio-Donahue CA, Brentnall TA, Bronner MP, Feakins RM, Timms JF, Brennan C, Lemoine NR, Crnogorac-Jurcevic T: **AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D.** *Cancer Res* 2011, **71**:7091–102.
121. Gupta A, Dong A, Lowe AW: **AGR2 gene function requires a unique endoplasmic reticulum localization motif.** *J Biol Chem* 2012, **287**:4773–82.
122. Edgell TA, Barraclough DL, Rajic A, Dhulia J, Lewis KJ, Armes JE, Barraclough R, Rudland PS, Rice GE, Autelitano DJ: **Increased plasma concentrations of anterior gradient 2 protein are positively associated with ovarian cancer.** *Clin Sci (Lond)* 2010, **118**:717–25.
123. Chung K, Nishiyama N, Yamano S, Komatsu H, Hanada S, Wei M, Wanibuchi H, Suehiro S, Kakehashi A: **Serum AGR2 as an early diagnostic and postoperative prognostic biomarker of human lung adenocarcinoma.** *Cancer Biomark* 2012, **10**:101–7.
124. Kani K, Malihi PD, Jiang Y, Wang H, Wang Y, Ruderman DL, Agus DB, Mallick P, Gross ME: **Anterior gradient 2 (AGR2): blood-based biomarker elevated in metastatic prostate cancer associated with the neuroendocrine phenotype.** *Prostate* 2013, **73**:306–15.
125. Adam PJ, Boyd R, Tyson KL, Fletcher GC, Stamps A, Hudson L, Poyser HR, Redpath N, Griffiths M, Steers G, Harris AL, Patel S, Berry J, Loader JA, Townsend RR, Daviet L, Legrain P, Parekh R, Terrett JA: **Comprehensive proteomic analysis of breast cancer cell membranes reveals unique proteins with potential roles in clinical cancer.** *J Biol Chem* 2003, **278**:6482–9.
126. King ER, Tung CS, Tsang YTM, Zu Z, Lok GTM, Deavers MT, Malpica A, Wolf JK, Lu KH, Birrer MJ, Mok SC, Gershenson DM, Wong K-K: **The anterior gradient homolog 3 (AGR3) gene is associated with differentiation and survival in ovarian cancer.** *Am J Surg Pathol* 2011, **35**:904–12.
127. Pascal LE, Vêncio RZN, Page LS, Liebeskind ES, Shadle CP, Troisch P, Marzolf B, True LD, Hood LE, Liu AY: **Gene expression relationship between prostate cancer cells of Gleason 3, 4 and normal epithelial cells as revealed by cell type-specific transcriptomes.** *BMC Cancer* 2009, **9**:452.
128. Brychtova V, Zampachova V, Hrstka R, Fabian P, Novak J, Hermanova M, Vojtesek B: **Differential expression of anterior gradient protein 3 in intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma.** *Exp Mol Pathol* 2014, **96**:375–81.

129. Obacz J, Takacova M, Brychtova V, Dobes P, Pastorekova S, Vojtesek B, Hrstka R: **The role of AGR2 and AGR3 in cancer: Similar but not identical.** *Eur J Cell Biol* , **94**:139–47.
130. Gray TA, MacLaine NJ, Michie CO, Bouchalova P, Murray E, Howie J, Hrstka R, Maslon MM, Nenutil R, Vojtesek B, Langdon S, Hayward L, Gourley C, Hupp TR: **Anterior Gradient-3: a novel biomarker for ovarian cancer that mediates cisplatin resistance in xenograft models.** *J Immunol Methods* 2012, **378**:20–32.
131. Bu H, Bormann S, Schäfer G, Horninger W, Massoner P, Neeb A, Lakshmanan V-K, Maddalo D, Nestl A, Sültmann H, Cato ACB, Klocker H: **The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection.** *Prostate* 2011, **71**:575–87.
132. Logan CY, Nusse R: **The Wnt signaling pathway in development and disease.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004, **20**:781–810.
133. Ford CE, Qian Ma SS, Quadir A, Ward RL: **The dual role of the novel Wnt receptor tyrosine kinase, ROR2, in human carcinogenesis.** *Int J Cancer* 2013, **133**:779–87.
134. Klaus A, Birchmeier W: **Wnt signalling and its impact on development and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2008, **8**:387–98.
135. Brennan KR, Brown AMC: **Wnt proteins in mammary development and cancer.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004, **9**:119–31.
136. Nakopoulou L, Mylona E, Papadaki I, Kavantzias N, Giannopoulou I, Markaki S, Keramopoulos A: **Study of phospho-beta-catenin subcellular distribution in invasive breast carcinomas in relation to their phenotype and the clinical outcome.** *Mod Pathol* 2006, **19**:556–63.
137. Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC: **Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, **97**:4262–6.
138. Clevers H, Nusse R: **Wnt/ β -catenin signaling and disease.** *Cell* 2012, **149**:1192–205.
139. Chien AJ, Conrad WH, Moon RT: **A Wnt survival guide: from flies to human disease.** *J Invest Dermatol* 2009, **129**:1614–27.
140. Liu C-C, Prior J, Piwnica-Worms D, Bu G: **LRP6 overexpression defines a class of breast cancer subtype and is a target for therapy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:5136–41.
141. Macdonald BT, Semenov M V, He X: **SnapShot: Wnt/beta-catenin signaling.** *Cell* 2007, **131**:1204.
142. Semenov M V, Habas R, Macdonald BT, He X: **SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways.** *Cell* 2007, **131**:1378.
143. Seifert JRK, Mlodzik M: **Frizzled/PCP signalling: a conserved mechanism regulating cell polarity and directed motility.** *Nat Rev Genet* 2007, **8**:126–38.

144. Curtin JA, Quint E, Tsipouri V, Arkell RM, Cattanach B, Copp AJ, Henderson DJ, Spurr N, Stanier P, Fisher EM, Nolan PM, Steel KP, Brown SDM, Gray IC, Murdoch JN: **Mutation of Celsr1 disrupts planar polarity of inner ear hair cells and causes severe neural tube defects in the mouse.** *Curr Biol* 2003, **13**:1129–33.
145. Wu J, Klein TJ, Mlodzik M: **Subcellular localization of frizzled receptors, mediated by their cytoplasmic tails, regulates signaling pathway specificity.** *PLoS Biol* 2004, **2**:E158.
146. Montcouquiol M, Sans N, Huss D, Kach J, Dickman JD, Forge A, Rachel RA, Copeland NG, Jenkins NA, Bogani D, Murdoch J, Warchol ME, Wenthold RJ, Kelley MW: **Asymmetric localization of Vangl2 and Fz3 indicate novel mechanisms for planar cell polarity in mammals.** *J Neurosci* 2006, **26**:5265–75.
147. Katoh M: **WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review).** *Oncol Rep* 2005, **14**:1583–8.
148. Wang Y: **Wnt/Planar cell polarity signaling: a new paradigm for cancer therapy.** *Mol Cancer Ther* 2009, **8**:2103–9.
149. Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, Nishita M, Minami Y, Yonemura S, Tarui H, Sasaki H: **Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex.** *Dev Cell* 2008, **15**:23–36.
150. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y: **The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway.** *Genes Cells* 2003, **8**:645–54.
151. Mikels AJ, Nusse R: **Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context.** *PLoS Biol* 2006, **4**:e115.
152. Van Amerongen R, Mikels A, Nusse R: **Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors.** *Sci Signal* 2008, **1**:re9.
153. Schlessinger K, Hall A, Tolwinski N: **Wnt signaling pathways meet Rho GTPases.** *Genes Dev* 2009, **23**:265–277.
154. Zeng W, Wharton KA, Mack JA, Wang K, Gadbaw M, Suyama K, Klein PS, Scott MP: **naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling.** *Nature* 2000, **403**:789–95.
155. Yan D, Wallingford JB, Sun TQ, Nelson AM, Sakanaka C, Reinhard C, Harland RM, Fantl WJ, Williams LT: **Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:3802–7.
156. Akhurst RJ, Derynck R: **TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword.** *Trends Cell Biol* 2001, **11**:S44–51.
157. Ying J, Li H, Yu J, Ng KM, Poon FF, Wong SCC, Chan ATC, Sung JJY, Tao Q: **WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* 2008, **14**:55–61.

158. Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y: **Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation.** *J Cell Biol* 2003, **162**:899–908.
159. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM: **Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma.** *Cancer Cell* 2002, **1**:279–88.
160. Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W, Kikuchi A: **Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion.** *Cancer Res* 2006, **66**:10439–48.
161. Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, Gradl D, Schulz M, Siemes S, Trümper L, Binder C: **Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:5454–9.
162. Fukukawa C, Nagayama S, Tsunoda T, Toguchida J, Nakamura Y, Katagiri T: **Activation of the non-canonical Dvl-Rac1-JNK pathway by Frizzled homologue 10 in human synovial sarcoma.** *Oncogene* 2009, **28**:1110–20.
163. Luga V, Zhang L, Vitoria-Petit AM, Ogunjimi AA, Inanlou MR, Chiu E, Buchanan M, Hosein AN, Basik M, Wrana JL: **Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration.** *Cell* 2012, **151**:1542–56.
164. Wang X-J, Zhang D-L, Xu Z-G, Ma M-L, Wang W-B, Li L-L, Han X-L, Huo Y, Yu X, Sun J-P: **Understanding cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptors.** *J Neurochem* 2014, **131**:699–711.
165. Yona S, Lin H-H, Siu WO, Gordon S, Stacey M: **Adhesion-GPCRs: emerging roles for novel receptors.** *Trends Biochem Sci* 2008, **33**:491–500.
166. Shima Y, Kawaguchi S, Kosaka K, Nakayama M, Hoshino M, Nabeshima Y, Hirano T, Uemura T: **Opposing roles in neurite growth control by two seven-pass transmembrane cadherins.** *Nat Neurosci* 2007, **10**:963–9.
167. Nishimura T, Honda H, Takeichi M: **Planar cell polarity links axes of spatial dynamics in neural-tube closure.** *Cell* 2012, **149**:1084–97.
168. Araç D, Aust G, Calebiro D, Engel FB, Formstone C, Goffinet A, Hamann J, Kittel RJ, Liebscher I, Lin H-H, Monk KR, Petrenko A, Piao X, Prömel S, Schiöth HB, Schwartz TW, Stacey M, Ushkaryov YA, Wobus M, Wolfrum U, Xu L, Langenhan T: **Dissecting signaling and functions of adhesion G protein-coupled receptors.** *Ann N Y Acad Sci* 2012, **1276**:1–25.
169. Araç D, Boucard AA, Bolliger MF, Nguyen J, Soltis SM, Südhof TC, Brunger AT: **A novel evolutionarily conserved domain of cell-adhesion GPCRs mediates autoproteolysis.** *EMBO J* 2012, **31**:1364–78.
170. Krasnoperov V, Lu Y, Buryanovsky L, Neubert TA, Ichtchenko K, Petrenko AG: **Post-translational proteolytic processing of the calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin (CIRL), a natural chimera of the cell adhesion protein and the G protein-**

coupled receptor. Role of the G protein-coupled receptor proteolysis site (GPS) moti. *J Biol Chem* 2002, **277**:46518–26.

171. Lin H-H, Chang G-W, Davies JQ, Stacey M, Harris J, Gordon S: **Autocatalytic cleavage of the EMR2 receptor occurs at a conserved G protein-coupled receptor proteolytic site motif.** *J Biol Chem* 2004, **279**:31823–32.

172. Hsiao C-C, Chen H-Y, Chang G-W, Lin H-H: **GPS autoproteolysis is required for CD97 to up-regulate the expression of N-cadherin that promotes homotypic cell-cell aggregation.** *FEBS Lett* 2011, **585**:313–8.

173. Hadjantonakis AK, Sheward WJ, Harmar AJ, de Galan L, Hoovers JM, Little PF: **Celsr1, a neural-specific gene encoding an unusual seven-pass transmembrane receptor, maps to mouse chromosome 15 and human chromosome 22qter.** *Genomics* 1997, **45**:97–104.

174. Formstone CJ, Barclay J, Rees M, Little PF: **Chromosomal localization of Celsr2 and Celsr3 in the mouse; Celsr3 is a candidate for the tippy (tip) lethal mutant on chromosome 9.** *Mamm Genome* 2000, **11**:392–4.

175. Robinson A, Escuin S, Doudney K, Vekemans M, Stevenson RE, Greene NDE, Copp AJ, Stanier P: **Mutations in the planar cell polarity genes CELSR1 and SCRIB are associated with the severe neural tube defect craniorachischisis.** *Hum Mutat* 2012, **33**:440–7.

176. Tatin F, Taddei A, Weston A, Fuchs E, Devenport D, Tissir F, Makinen T: **Planar cell polarity protein Celsr1 regulates endothelial adherens junctions and directed cell rearrangements during valve morphogenesis.** *Dev Cell* 2013, **26**:31–44.

177. Cortijo C, Gouzi M, Tissir F, Grapin-Botton A: **Planar cell polarity controls pancreatic beta cell differentiation and glucose homeostasis.** *Cell Rep* 2012, **2**:1593–606.

178. Del Giudice I, Messina M, Chiaretti S, Santangelo S, Tavoraro S, De Propris MS, Nanni M, Pescarmona E, Mancini F, Pulsoni A, Martelli M, Di Rocco A, Finolezzi E, Paoloni F, Mauro FR, Cuneo A, Guarini A, Foà R: **Behind the scenes of non-nodal MCL: downmodulation of genes involved in actin cytoskeleton organization, cell projection, cell adhesion, tumour invasion, TP53 pathway and mutated status of immunoglobulin heavy chain genes.** *Br J Haematol* 2012, **156**:601–611.

179. Kaucka M, Plevova K, Pavlova S, Janovska P, Mishra A, Verner J, Prochazkova J, Krejci P, Kotaskova J, Ovesna P, Tichy B, Brychtova Y, Doubek M, Kozubik A, Mayer J, Pospisilova S, Bryja V: **The Planar Cell Polarity Pathway Drives Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia by the Regulation of B-Lymphocyte Migration.** *Cancer Res* 2013, **73**:1491–1501.

180. Fukumoto I, Hanazawa T, Kinoshita T, Kikkawa N, Koshizuka K, Goto Y, Nishikawa R, Chiyomaru T, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N: **MicroRNA expression signature of oral squamous cell carcinoma: functional role of microRNA-26a/b in the modulation of novel cancer pathways.** *Br J Cancer* 2015, **112**:891–900.

181. Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, von Kampen O, Brosch M, Sipos B, von Schönfels W, Balschun K, Röcken C, Arlt A, Schniewind B, Grauholm J, Kalthoff H, Neuhaus P, Stickel F, Schreiber S, Becker T, Siebert R, Hampe J: **Distinct DNA**

methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2012, **130**:1319–28.

182. Liao S, Desouki MM, Gaile DP, Shepherd L, Nowak NJ, Conroy J, Barry WT, Geradts J: **Differential copy number aberrations in novel candidate genes associated with progression from in situ to invasive ductal carcinoma of the breast.** *Genes, Chromosom Cancer* 2012, **51**:1067–1078.

183. Dutta B, Pusztai L, Qi Y, André F, Lazar V, Bianchini G, Ueno N, Agarwal R, Wang B, Shiang CY, Hortobagyi GN, Mills GB, Symmans WF, Balázs G: **A network-based, integrative study to identify core biological pathways that drive breast cancer clinical subtypes.** *Br J Cancer* 2012, **106**:1107–16.

184. Dvorkin-Gheva A, Hassell JA: **Hormone receptor and ERBB2 status in gene expression profiles of human breast tumor samples.** *PLoS One* 2011, **6**:e26023.

185. Stohn JP, Perreault NG, Wang Q, Liaw L, Lindner V: **Cthrc1, a novel circulating hormone regulating metabolism.** *PLoS One* 2012, **7**:e47142.

186. Pyagay P, Heroult M, Wang Q, Lehnert W, Belden J, Liaw L, Friesel RE, Lindner V: **Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration.** *Circ Res* 2005, **96**:261–8.

187. Durmus T, LeClair RJ, Park K-S, Terzic A, Yoon JK, Lindner V: **Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 (Cthrc1).** *Gene Expr Patterns* 2006, **6**:935–40.

188. LeClair RJ, Durmus T, Wang Q, Pyagay P, Terzic A, Lindner V: **Cthrc1 is a novel inhibitor of transforming growth factor-beta signaling and neointimal lesion formation.** *Circ Res* 2007, **100**:826–33.

189. Takeshita S, Fumoto T, Matsuoka K, Park K, Aburatani H, Kato S, Ito M, Ikeda K: **Osteoclast-secreted CTHRC1 in the coupling of bone resorption to formation.** *J Clin Invest* 2013, **123**:3914–24.

190. Ma M-Z, Zhuang C, Yang X-M, Zhang Z-Z, Ma H, Zhang W-M, You H, Qin W, Gu J, Yang S, Cao H, Zhang Z-G: **CTHRC1 acts as a prognostic factor and promotes invasiveness of gastrointestinal stromal tumors by activating Wnt/PCP-Rho signaling.** *Neoplasia* 2014, **16**:265–78, 278.e1–13.

191. LeClair R, Lindner V: **The role of collagen triple helix repeat containing 1 in injured arteries, collagen expression, and transforming growth factor beta signaling.** *Trends Cardiovasc Med* 2007, **17**:202–5.

192. Duarte CW, Stohn JP, Wang Q, Emery IF, Prueser A, Lindner V: **Elevated plasma levels of the pituitary hormone Cthrc1 in individuals with red hair but not in patients with solid tumors.** *PLoS One* 2014, **9**:e100449.

193. Tang L, Dai DL, Su M, Martinka M, Li G, Zhou Y: **Aberrant expression of collagen triple helix repeat containing 1 in human solid cancers.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:3716–22.

194. Park EH, Kim S, Jo JY, Kim SJ, Hwang Y, Kim J-M, Song SY, Lee D-K, Koh SS: **Collagen triple helix repeat containing-1 promotes pancreatic cancer progression by regulating migration and adhesion of tumor cells.** *Carcinogenesis* 2013, **34**:694–702.
195. Liu G, Sengupta PK, Jamal B, Yang H-Y, Bouchie MP, Lindner V, Varelas X, Kukuruzinska MA: **N-glycosylation induces the CTHRC1 protein and drives oral cancer cell migration.** *J Biol Chem* 2013, **288**:20217–27.
196. Wang P, Wang Y-C, Chen X-Y, Shen Z-Y, Cao H, Zhang Y-J, Yu J, Zhu J-D, Lu Y-Y, Fang J-Y: **CTHRC1 is upregulated by promoter demethylation and transforming growth factor- β 1 and may be associated with metastasis in human gastric cancer.** *Cancer Sci* 2012, **103**:1327–33.
197. Chen Y-L, Wang T-H, Hsu H-C, Yuan R-H, Jeng Y-M: **Overexpression of CTHRC1 in hepatocellular carcinoma promotes tumor invasion and predicts poor prognosis.** *PLoS One* 2013, **8**:e70324.
198. Allinen M, Beroukhi R, Cai L, Brennan C, Lahti-Domenici J, Huang H, Porter D, Hu M, Chin L, Richardson A, Schnitt S, Sellers WR, Polyak K: **Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer.** *Cancer Cell* 2004, **6**:17–32.
199. West RB, Nuyten DSA, Subramanian S, Nielsen TO, Corless CL, Rubin BP, Montgomery K, Zhu S, Patel R, Hernandez-Boussard T, Goldblum JR, Brown PO, van de Vijver M, van de Rijn M: **Determination of stromal signatures in breast carcinoma.** *PLoS Biol* 2005, **3**:e187.
200. Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J, Klein J, Fridman E, Skarda J, Srovnal J, Hajdich M, Murray P, Kolar Z: **Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis.** *BMC Cancer* 2007, **7**:55.
201. Kharashvili G, Cizkova M, Bouchalova K, Mgebrishvili G, Kolar Z, Bouchal J: **Collagen triple helix repeat containing 1 protein, periostin and versican in primary and metastatic breast cancer: an immunohistochemical study.** *J Clin Pathol* 2011, **64**:977–82.
202. Kim JH, Baek T-H, Yim HS, Kim KH, Jeong S-H, Kang HB, Oh S, Lee HG, Kim JW, Kim KD: **Collagen Triple Helix Repeat Containing-1 (CTHRC1) Expression in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast: The Impact on Prognosis and Correlation to Clinicopathologic Features.** *Pathol Oncol Res* 2013, **19**:731–737.
203. Brighton PJ, Szekeres PG, Willars GB: **Neuromedin U and its receptors: structure, function, and physiological roles.** *Pharmacol Rev* 2004, **56**:231–48.
204. Minamino N, Kangawa K, Matsuo H: **Neuromedin U-8 and U-25: novel uterus stimulating and hypertensive peptides identified in porcine spinal cord.** *Biochem Biophys Res Commun* 1985, **130**:1078–85.
205. Mitchell JD, Maguire JJ, Davenport AP: **Emerging pharmacology and physiology of neuromedin U and the structurally related peptide neuromedin S.** *Br J Pharmacol* 2009, **158**:87–103.

206. Szekeres PG, Muir AI, Spinage LD, Miller JE, Butler SI, Smith A, Rennie GI, Murdock PR, Fitzgerald LR, Wu H I, McMillan LJ, Guerrero S, Vawter L, Elshourbagy NA, Mooney JL, Bergsma DJ, Wilson S, Chambers JK: **Neuromedin U is a potent agonist at the orphan G protein-coupled receptor FM3.** *J Biol Chem* 2000, **275**:20247–50.
207. Hedrick JA, Morse K, Shan L, Qiao X, Pang L, Wang S, Laz T, Gustafson EL, Bayne M, Monsma FJ: **Identification of a human gastrointestinal tract and immune system receptor for the peptide neuromedin U.** *Mol Pharmacol* 2000, **58**:870–5.
208. Mitchell JD, Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP: **Expression and vasoconstrictor function of anorexigenic peptides neuromedin U-25 and S in the human cardiovascular system.** *Cardiovasc Res* 2009, **81**:353–61.
209. Austin C, Lo G, Nandha KA, Meleagros L, Bloom SR: **Cloning and characterization of the cDNA encoding the human neuromedin U (NmU) precursor: NmU expression in the human gastrointestinal tract.** *J Mol Endocrinol* 1995, **14**:157–69.
210. Fujii R, Hosoya M, Fukusumi S, Kawamata Y, Habata Y, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M: **Identification of neuromedin U as the cognate ligand of the orphan G protein-coupled receptor FM-3.** *J Biol Chem* 2000, **275**:21068–74.
211. Hosoya M, Moriya T, Kawamata Y, Ohkubo S, Fujii R, Matsui H, Shintani Y, Fukusumi S, Habata Y, Hinuma S, Onda H, Nishimura O, Fujino M: **Identification and functional characterization of a novel subtype of neuromedin U receptor.** *J Biol Chem* 2000, **275**:29528–32.
212. Raddatz R, Wilson AE, Artymyshyn R, Bonini JA, Borowsky B, Boteju LW, Zhou S, Kouranova E V, Nagorny R, Guevarra MS, Dai M, Lerman GS, Vaysse PJ, Branchek TA, Gerald C, Forray C, Adham N: **Identification and characterization of two neuromedin U receptors differentially expressed in peripheral tissues and the central nervous system.** *J Biol Chem* 2000, **275**:32452–9.
213. Maggi CA, Patacchini R, Giuliani S, Turini D, Barbanti G, Rovero P, Meli A: **Motor response of the human isolated small intestine and urinary bladder to porcine neuromedin U-8.** *Br J Pharmacol* 1990, **99**:186–8.
214. Jones NA, Morton MF, Prendergast CE, Powell GL, Shankley NP, Hollingsworth SJ: **Neuromedin U stimulates contraction of human long saphenous vein and gastrointestinal smooth muscle in vitro.** *Regul Pept* 2006, **136**:109–16.
215. Howard AD, Wang R, Pong SS, Mellin TN, Strack A, Guan XM, Zeng Z, Williams DL, Feighner SD, Nunes CN, Murphy B, Stair JN, Yu H, Jiang Q, Clements MK, Tan CP, McKee KK, Hreniuk DL, McDonald TP, Lynch KR, Evans JF, Austin CP, Caskey CT, Van der Ploeg LH, Liu Q: **Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding.** *Nature* 2000, **406**:70–4.
216. Kowalski TJ, Spar BD, Markowitz L, Maguire M, Golovko A, Yang S, Farley C, Cook JA, Tetzloff G, Hoos L, Del Vecchio RA, Kazdoba TM, McCool MF, Hwa JJ, Hyde LA, Davis H, Vassileva G, Hedrick JA, Gustafson EL: **Transgenic overexpression of neuromedin U promotes leanness and hypophagia in mice.** *J Endocrinol* 2005, **185**:151–64.

217. Hainerová I, Torekov SS, Ek J, Finková M, Borch-Johnsen K, Jørgensen T, Madsen OD, Lebl J, Hansen T, Pedersen O: **Association between neuromedin U gene variants and overweight and obesity.** *J Clin Endocrinol Metab* 2006, **91**:5057–63.
218. Kaczmarek P, Malendowicz LK, Pruszyńska-Oszmala E, Wojciechowski T, Szczepankiewicz D, Szkudelski T, Nowak KW: **Neuromedin U receptor 1 expression in the rat endocrine pancreas and evidence suggesting neuromedin U suppressive effect on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets.** *Int J Mol Med* 2006, **18**:951–5.
219. Alfa RW, Park S, Skelly K-R, Poffenberger G, Jain N, Gu X, Kockel L, Wang J, Liu Y, Powers AC, Kim SK: **Suppression of Insulin Production and Secretion by a Deletin Hormone.** *Cell Metab* 2015, **21**:323–333.
220. Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, Domin J, Bloom SR: **Regional hemodynamic effects of neuromedin U in conscious rats.** *Am J Physiol* 1990, **258**(1 Pt 2):R32–8.
221. Sumi S, Inoue K, Kogire M, Doi R, Takaori K, Suzuki T, Yajima H, Tobe T: **Effect of synthetic neuromedin U-8 and U-25, novel peptides identified in porcine spinal cord, on splanchnic circulation in dogs.** *Life Sci* 1987, **41**:1585–90.
222. Johnson EN, Appelbaum ER, Carpenter DC, Cox RF, Disa J, Foley JJ, Ghosh SK, Naselsky DP, Pullen MA, Sarau HM, Scheff SR, Steplewski KM, Zaks-Zilberman M, Aiyar N: **Neuromedin U elicits cytokine release in murine Th2-type T cell clone D10.G4.1.** *J Immunol* 2004, **173**:7230–8.
223. Moriyama M, Matsukawa A, Kudoh S, Takahashi T, Sato T, Kano T, Yoshimura A, Kojima M: **The neuropeptide neuromedin U promotes IL-6 production from macrophages and endotoxin shock.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **341**:1149–54.
224. Moriyama M, Sato T, Inoue H, Fukuyama S, Teranishi H, Kangawa K, Kano T, Yoshimura A, Kojima M: **The neuropeptide neuromedin U promotes inflammation by direct activation of mast cells.** *J Exp Med* 2005, **202**:217–24.
225. Iwai T, Iinuma Y, Kodani R, Oka J-I: **Neuromedin U inhibits inflammation-mediated memory impairment and neuronal cell-death in rodents.** *Neurosci Res* 2008, **61**:113–9.
226. Alevizos I, Mahadevappa M, Zhang X, Ohyama H, Kohno Y, Posner M, Gallagher GT, Varvares M, Cohen D, Kim D, Kent R, Donoff RB, Todd R, Yung CM, Warrington JA, Wong DT: **Oral cancer in vivo gene expression profiling assisted by laser capture microdissection and microarray analysis.** *Oncogene* 2001, **20**:6196–204.
227. Yamashita K, Upadhyay S, Osada M, Hoque MO, Xiao Y, Mori M, Sato F, Meltzer SJ, Sidransky D: **Pharmacologic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer Cell* 2002, **2**:485–95.
228. Tokumaru Y, Yamashita K, Osada M, Nomoto S, Sun D-I, Xiao Y, Hoque MO, Westra WH, Califano JA, Sidransky D: **Inverse correlation between cyclin A1 hypermethylation and p53 mutation in head and neck cancer identified by reversal of epigenetic silencing.** *Cancer Res* 2004, **64**:5982–7.

229. Shetzline SE, Rallapalli R, Dowd KJ, Zou S, Nakata Y, Swider CR, Kalota A, Choi JK, Gewirtz AM: **Neuromedin U: a Myb-regulated autocrine growth factor for human myeloid leukemias.** *Blood* 2004, **104**:1833–40.
230. Euer NI, Kaul S, Deissler H, Möbus VJ, Zeillinger R, Weidle UH: **Identification of L1CAM, Jagged2 and Neuromedin U as ovarian cancer-associated antigens.** *Oncol Rep* 2005, **13**:375–87.
231. Takahashi K, Furukawa C, Takano A, Ishikawa N, Kato T, Hayama S, Suzuki C, Yasui W, Inai K, Sone S, Ito T, Nishimura H, Tsuchiya E, Nakamura Y, Daigo Y: **The neuromedin U-growth hormone secretagogue receptor 1b/neurotensin receptor 1 oncogenic signaling pathway as a therapeutic target for lung cancer.** *Cancer Res* 2006, **66**:9408–19.
232. Wu Y, McRoberts K, Berr SS, Frierson HF, Conaway M, Theodorescu D: **Neuromedin U is regulated by the metastasis suppressor RhoGDI2 and is a novel promoter of tumor formation, lung metastasis and cancer cachexia.** *Oncogene* 2007, **26**:765–73.
233. Ketterer K, Kong B, Frank D, Giese NA, Bauer A, Hoheisel J, Korc M, Kleeff J, Michalski CW, Friess H: **Neuromedin U is overexpressed in pancreatic cancer and increases invasiveness via the hepatocyte growth factor c-Met pathway.** *Cancer Lett* 2009, **277**:72–81.
234. Harten SK, Esteban MA, Shukla D, Ashcroft M, Maxwell PH: **Inactivation of the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene induces Neuromedin U expression in renal cancer cells.** *Mol Cancer* 2011, **10**:89.
235. Rani S, Corcoran C, Shiels L, Germano S, Breslin S, Madden S, McDermott MS, Browne BC, O'Donovan N, Crown J, Gogarty M, Byrne AT, O'Driscoll L: **Neuromedin U: a candidate biomarker and therapeutic target to predict and overcome resistance to HER-tyrosine kinase inhibitors.** *Cancer Res* 2014, **74**:3821–33.
236. Dahl E, Kristiansen G, Gottlob K, Klamann I, Ebner E, Hinzmann B, Hermann K, Pilarsky C, Dürst M, Klinkhammer-Schalke M, Blaszyk H, Knuechel R, Hartmann A, Rosenthal A, Wild PJ: **Molecular profiling of laser-microdissected matched tumor and normal breast tissue identifies karyopherin alpha2 as a potential novel prognostic marker in breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2006, **12**:3950–60.
237. The Cancer Genome Atlas Network: **Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2012, **490**:61–70.
238. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N: **The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data.** *Cancer Discov* 2012, **2**:401–4.
239. Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe J-P, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo W-L, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW: **A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes.** *Cancer Cell* 2006, **10**:515–27.

240. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: **Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986, **51 Pt 1**:263–73.
241. Weyant RS, Edmonds P, Swaminathan B: **Effect of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase.** *Biotechniques* 1990, **9**:308–9.
242. Katcher HL, Schwartz I: **A distinctive property of Tth DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol.** *Biotechniques* 1994, **16**:84–92.
243. Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrli M, Oluoch AO, Kakoma I: **Optimization of the PCR for detection of Staphylococcus aureus nuc gene in bovine milk.** *J Dairy Sci* 2001, **84**:74–83.
244. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K: **Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification.** *J Forensic Sci* 1994, **39**:362–72.
245. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Rådström P: **Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:345–50.
246. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R: **Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.** *Biotechnology (N Y)* 1992, **10**:413–7.
247. Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW: **Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up.** *Nucleic Acids Res* 2003, **31**:e122.
248. Fink L, Seeger W, Ermert L, Hänze J, Stahl U, Grimminger F, Kummer W, Bohle RM: **Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking.** *Nat Med* 1998, **4**:1329–33.
249. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463–7.
250. Boenisch T: **Heat-induced antigen retrieval restores electrostatic forces: prolonging the antibody incubation as an alternative.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002, **10**:363–7.
251. Urbas L, Brne P, Gabor B, Barut M, Strlic M, Petric TC, Strancar A: **Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and pseudo-affinity column.** *J Chromatogr A* 2009, **1216**:2689–94.
252. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**:76–85.
253. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T: **Small GTP-binding proteins.** *Physiol Rev* 2001, **81**:153–208.

254. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**:680–5.
255. Gan SD, Patel KR: **Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay.** *J Invest Dermatol* 2013, **133**:e12.
256. Wood MW, Nordone SK, Vaden SL, Breitschwerdt EB: **Assessment of urine solute and matrix effects on the performance of an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of interleukin-6 in dog urine.** *J Vet Diagn Invest* 2011, **23**:316–20.
257. Selby C: **Interference in immunoassay.** *Ann Clin Biochem* 1999, **36 (Pt 6)**:704–21.
258. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: **Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*.** *Nature* 1998, **391**:806–11.
259. Cerutti H, Casas-Mollano JA: **On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man.** *Curr Genet* 2006, **50**:81–99.
260. Ghildiyal M, Zamore PD: **Small silencing RNAs: an expanding universe.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**:94–108.
261. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR: **Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines.** *Cancer Res* 1988, **48**:4827–33.
262. BOYDEN S: **The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes.** *J Exp Med* 1962, **115**:453–66.
263. Mihailidou C, Chatzistamou I, Papavassiliou A, Kiaris H: **Improvement of chemotherapeutic drug efficacy by endoplasmic reticulum stress.** *Endocr Relat Cancer* 2015.
264. Teske BF, Fusakio ME, Zhou D, Shan J, McClintick JN, Kilberg MS, Wek RC: **CHOP induces activating transcription factor 5 (ATF5) to trigger apoptosis in response to perturbations in protein homeostasis.** *Mol Biol Cell* 2013, **24**:2477–90.
265. Gene Ontology Consortium: **The Gene Ontology (GO) project in 2006.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**(Database issue):D322–6.
266. Emig D, Salomonis N, Baumbach J, Lengauer T, Conklin BR, Albrecht M: **AltAnalyze and DomainGraph: analyzing and visualizing exon expression data.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(Web Server issue):W755–62.
267. Zambon AC, Gaj S, Ho I, Hanspers K, Vranizan K, Evelo CT, Conklin BR, Pico AR, Salomonis N: **GO-Elite: a flexible solution for pathway and ontology over-representation.** *Bioinformatics* 2012, **28**:2209–10.

268. Zhang P, Zou M, Wen X, Gu F, Li J, Liu G, Dong J, Deng X, Gao J, Li X, Jia X, Dong Z, Chen L, Wang Y, Tian Y: **Development of serum parameters panels for the early detection of pancreatic cancer.** *Int J Cancer* 2014, **134**:2646–55.
269. Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E, Betz B, Grube S, Kreutzfeld R, Himmelfarb M, An H-X, Gelling S, Klamann I, Hinzmann B, Kristiansen G, Grützmann R, Kuner R, Petschke B, Rhiem K, Wiechen K, Sers C, Wiestler O, Schneider A, Höfler H, Nährig J, Dietel M, Schäfer R, Rosenthal A, Schmutzler R, Dürst M, Meindl A, Niederacher D: **Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer.** *J Pathol* 2005, **205**:21–8.
270. Chang G-W, Stacey M, Kwakkenbos MJ, Hamann J, Gordon S, Lin H-H: **Proteolytic cleavage of the EMR2 receptor requires both the extracellular stalk and the GPS motif.** *FEBS Lett* 2003, **547**:145–50.
271. Ruiz-Garcia E, Scott V, Machavoine C, Bidart JM, Lacroix L, Delaloge S, Andre F: **Gene expression profiling identifies Fibronectin 1 and CXCL9 as candidate biomarkers for breast cancer screening.** *Br J Cancer* 2010, **102**:462–8.
272. Remmele W, Stegner HE: **[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue].** *Pathologie* 1987, **8**:138–40.
273. Van Cleef A, Altintas S, Huizing M, Papadimitriou K, Van Dam P, Tjalma W: **Current view on ductal carcinoma in situ and importance of the margin thresholds: A review.** *Facts, views Vis ObGyn* 2014, **6**:210–8.
274. Kalamajski S, Aspberg A, Lindblom K, Heinegård D, Oldberg A: **Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium and promotes osteoblast collagen mineralization.** *Biochem J* 2009, **423**:53–9.
275. Makawita S, Dimitromanolakis A, Soosaipillai A, Soleas I, Chan A, Gallinger S, Haun RS, Blasutig IM, Diamandis EP: **Validation of four candidate pancreatic cancer serological biomarkers that improve the performance of CA19.9.** *BMC Cancer* 2013, **13**:404.
276. Györfy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z: **An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2010, **123**:725–31.
277. Hudis CA, Barlow WE, Costantino JP, Gray RJ, Pritchard KI, Chapman J-AW, Sparano JA, Hunsberger S, Enos RA, Gelber RD, Zujewski JA: **Proposal for standardized definitions for efficacy end points in adjuvant breast cancer trials: the STEEP system.** *J Clin Oncol* 2007, **25**:2127–32.
278. Hamann J, Aust G, Arac D, Engel FB, Formstone C, Fredriksson R, Hall RA, Harty BL, Kirchhoff C, Knapp B, Krishnan A, Liebscher I, Lin H-H, Martinelli DC, Monk KR, Peeters MC, Piao X, Promel S, Schoneberg T, Schwartz TW, Singer K, Stacey M, Ushkaryov YA, Vallon M, Wolfrum U, Wright MW, Xu L, Langenhan T, Schioth HB: **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G Protein-Coupled Receptors.** *Pharmacol Rev* 2015, **67**:338–367.

279. Cavallaro U, Christofori G: **Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough.** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1552**:39–45.
280. Ke Z, He W, Lai Y, Guo X, Chen S, Li S, Wang Y, Wang L: **Overexpression of collagen triple helix repeat containing 1 (CTHRC1) is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis in human non-small cell lung cancer.** *Oncotarget* 2014, **5**:9410–24.
281. Jelínek M, Balušíková K, Schmiedlová M, Němcová-Fürstová V, Šrámek J, Stančíková J, Zanardi I, Ojima I, Kovář J: **The role of individual caspases in cell death induction by taxanes in breast cancer cells.** *Cancer Cell Int* 2015, **15**:8.
282. Sánchez-Margalet V, Lucas M, Solano F, Goberna R: **Sensitivity of insulin-secreting RIN m5F cells to undergoing apoptosis by the protein kinase C inhibitor staurosporine.** *Exp Cell Res* 1993, **209**:160–3.
283. Zofková I, Matucha P: **New insights into the physiology of bone regulation: the role of neurohormones.** *Physiol Res* 2014, **63**:421–7.
284. Zhang Y, Jiang D, Zhang Y, Jiang X, Wang F, Tao J: **Neuromedin U type 1 receptor stimulation of A-type K⁺ current requires the $\beta\gamma$ subunits of Go protein, protein kinase A, and extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) in sensory neurons.** *J Biol Chem* 2012, **287**:18562–72.
285. Helfer G, Ross AW, Morgan PJ: **Neuromedin U partly mimics thyroid-stimulating hormone and triggers Wnt/ β -catenin signalling in the photoperiodic response of F344 rats.** *J Neuroendocrinol* 2013, **25**:1264–72.
286. Wharton KA, Zimmermann G, Rousset R, Scott MP: **Vertebrate proteins related to Drosophila Naked Cuticle bind Dishevelled and antagonize Wnt signaling.** *Dev Biol* 2001, **234**:93–106.
287. Katoh M, Katoh M: **Integrative genomic analyses of WNT11: transcriptional mechanisms based on canonical WNT signals and GATA transcription factors signaling.** *Int J Mol Med* 2009, **24**:247–51.
288. Joiner DM, Ke J, Zhong Z, Xu HE, Williams BO: **LRP5 and LRP6 in development and disease.** *Trends Endocrinol Metab* 2013, **24**:31–9.
289. Goel S, Chin EN, Fakhraldeen SA, Berry SM, Beebe DJ, Alexander CM: **Both LRP5 and LRP6 receptors are required to respond to physiological Wnt ligands in mammary epithelial cells and fibroblasts.** *J Biol Chem* 2012, **287**:16454–66.
290. Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X: **A mechanism for Wnt coreceptor activation.** *Mol Cell* 2004, **13**:149–56.
291. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: **Identification of c-MYC as a target of the APC pathway.** *Science* 1998, **281**:1509–12.

292. Wielenga VJ, Smits R, Korinek V, Smit L, Kielman M, Fodde R, Clevers H, Pals ST: **Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway.** *Am J Pathol* 1999, **154**:515–23.
293. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T: **DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway.** *Oncogene* 2004, **23**:8520–6.
294. Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y: **Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers.** *Oncol Res* 2001, **12**:469–76.
295. Leder A, Pattengale PK, Kuo A, Stewart TA, Leder P: **Consequences of widespread deregulation of the c-myc gene in transgenic mice: multiple neoplasms and normal development.** *Cell* 1986, **45**:485–95.
296. Gøtzsche PC, Jørgensen KJ: **Screening for breast cancer with mammography.** *Cochrane database Syst Rev* 2013, **6**:CD001877.
297. Løberg M, Lousdal ML, Bretthauer M, Kalager M: **Benefits and harms of mammography screening.** *Breast Cancer Res* 2015, **17**:63.
298. Hofvind S, Ponti A, Patnick J, Asuncion N, Njor S, Broeders M, Giordano L, Frigerio A, Törnberg S, Van Hal G, Martens P, Májek O, Danes J, von Euler-Chelpin M, Aasmaa A, Anttila A, Becker N, Péntek Z, Budai A, Mádaí S, Fitzpatrick P, Mooney T, Zappa M, Ventura L, Scharpantgen A, Hofvind S, Seroczynski P, Morais A, Rodrigues V, Bento MJ, et al.: **False-positive results in mammographic screening for breast cancer in Europe: a literature review and survey of service screening programmes.** *J Med Screen* 2012, **19** Suppl 1:57–66.
299. Ma X-J, Dahiya S, Richardson E, Erlander M, Sgroi DC: **Gene expression profiling of the tumor microenvironment during breast cancer progression.** *Breast Cancer Res* 2009, **11**:R7.
300. Castellana B, Escuin D, Peiró G, Garcia-Valdecasas B, Vázquez T, Pons C, Pérez-Olabarria M, Barnadas A, Lerma E: **ASPN and GJB2 Are Implicated in the Mechanisms of Invasion of Ductal Breast Carcinomas.** *J Cancer* 2012, **3**:175–83.
301. Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrughe B, Hook M, Mayne R: **Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family.** *J Biol Chem* 2001, **276**:12212–21.
302. Lorenzo P, Aspberg A, Onnerfjord P, Bayliss MT, Neame PJ, Heinegard D: **Identification and characterization of asporin, a novel member of the leucine-rich repeat protein family closely related to decorin and biglycan.** *J Biol Chem* 2001, **276**:12201–11.
303. Turtoi A, Musmeci D, Wang Y, Dumont B, Somja J, Bevilacqua G, De Pauw E, Delvenne P, Castronovo V: **Identification of novel accessible proteins bearing diagnostic and therapeutic potential in human pancreatic ductal adenocarcinoma.** *J Proteome Res* 2011, **10**:4302–13.

304. Orr B, Riddick ACP, Stewart GD, Anderson RA, Franco OE, Hayward SW, Thomson AA: **Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate.** *Oncogene* 2012, **31**:1130–42.
305. Klee EW, Bondar OP, Goodmanson MK, Dyer RB, Erdogan S, Bergstralh EJ, Bergen HR, Sebo TJ, Klee GG: **Candidate serum biomarkers for prostate adenocarcinoma identified by mRNA differences in prostate tissue and verified with protein measurements in tissue and blood.** *Clin Chem* 2012, **58**:599–609.
306. Xu L, Li Z, Liu S-Y, Xu S-Y, Ni G-X: **Asporin and osteoarthritis.** *Osteoarthritis Cartilage* 2015, **23**:933–939.
307. Kulasingam V, Diamandis EP: **Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies.** *Nat Clin Pract Oncol* 2008, **5**:588–99.
308. Woolas RP, Conaway MR, Xu F, Jacobs IJ, Yu Y, Daly L, Davies AP, O'Briant K, Berchuck A, Soper JT: **Combinations of multiple serum markers are superior to individual assays for discriminating malignant from benign pelvic masses.** *Gynecol Oncol* 1995, **59**:111–6.
309. Li H, Narahara H: **15-Deoxy- Δ (12,14)-prostaglandin J(2) induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer cell lines.** *Int J Mol Med* 2013, **31**:778–88.
310. Al Zeyadi M, Dimova I, Ranchich V, Rukova B, Nesheva D, Hamude Z, Georgiev S, Petrov D, Toncheva D: **Whole genome microarray analysis in non-small cell lung cancer.** *Biotechnol Biotechnol Equip* 2015, **29**:111–118.
311. Bonser LR, Schroeder BW, Ostrin LA, Baumlin N, Olson JL, Salathe M, Erle DJ: **The ER resident protein AGR3 is required for regulation of ciliary beat frequency in the airway.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015.
312. Lagerström MC, Schiöth HB: **Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery.** *Nat Rev Drug Discov* 2008, **7**:339–57.
313. Olson DJ, Gibo DM: **Antisense wnt-5a mimics wnt-1-mediated C57MG mammary epithelial cell transformation.** *Exp Cell Res* 1998, **241**:134–41.
314. Tano K, Mizuno R, Okada T, Rakwal R, Shibato J, Masuo Y, Ijiri K, Akimitsu N: **MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes.** *FEBS Lett* 2010, **584**:4575–80.
315. Nagano M, Hoshino D, Koshikawa N, Akizawa T, Seiki M: **Turnover of focal adhesions and cancer cell migration.** *Int J Cell Biol* 2012, **2012**:310616.
316. Martinez VG, O'Driscoll L: **Neuromedin U: a multifunctional neuropeptide with pleiotropic roles.** *Clin Chem* 2015, **61**:471–82.
317. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Ruzanov P, Melnyk N, Fink D, Sorokin A, Ovchinnikov LP, Davicioni E, Triche TJ, Sorensen PHB: **Translational activation of snail1 and other**

developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Cell* 2009, **15**:402–15.

318. Mejlvang J, Kriaievska M, Vandewalle C, Chernova T, Sayan AE, Berx G, Mellon JK, Tulchinsky E: **Direct repression of cyclin D1 by SIP1 attenuates cell cycle progression in cells undergoing an epithelial mesenchymal transition.** *Mol Biol Cell* 2007, **18**:4615–24.

319. Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Sorensen PHB: **Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1.** *Cell Cycle* 2009, **8**:2901–6.

320. Sosa MS, Bragado P, Aguirre-Ghiso JA: **Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field.** *Nat Rev Cancer* 2014, **14**:611–22.

321. Müller V, Stahmann N, Riethdorf S, Rau T, Zabel T, Goetz A, Jänicke F, Pantel K: **Circulating tumor cells in breast cancer: correlation to bone marrow micrometastases, heterogeneous response to systemic therapy and low proliferative activity.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**:3678–85.

322. Collins NL, Reginato MJ, Paulus JK, Sgroi DC, Labaer J, Brugge JS: **G1/S cell cycle arrest provides anoikis resistance through Erk-mediated Bim suppression.** *Mol Cell Biol* 2005, **25**:5282–91.

323. Lin T-Y, Wu F-J, Lee W-Y, Hsiao C-L, Luo C-W: **Ovarian regulation of neuromedin U and its local actions in the ovary, mediated through neuromedin U receptor 2.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013, **304**:E800–9.

324. Andre P, Song H, Kim W, Kispert A, Yang Y: **Wnt5a and Wnt11 regulate mammalian anterior-posterior axis elongation.** *Development* 2015, **142**:1516–27.

325. Zhu Y, Shen T, Liu J, Zheng J, Zhang Y, Xu R, Sun C, Du J, Chen Y, Gu L: **Rab35 is required for Wnt5a/Dvl2-induced Rac1 activation and cell migration in MCF-7 breast cancer cells.** *Cell Signal* 2013, **25**:1075–85.

326. MacDonald BT, Semenov M V, Huang H, He X: **Dissecting molecular differences between Wnt coreceptors LRP5 and LRP6.** *PLoS One* 2011, **6**:e23537.

327. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC: **An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice.** *Nature* 2000, **407**:535–8.

328. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH-J, Glass DA, Hartmann C, Li L, Hwang T-H, Brayton CF, Lang RA, Karsenty G, Chan L: **Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor.** *J Cell Biol* 2002, **157**:303–14.

329. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, Ueno N, Yasuda J, Waterman M, Shibuya H, Moon RT, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K: **The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca(2+) pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling.** *Mol Cell Biol* 2003, **23**:131–9.

330. Staal FJT, Noort Mv M van, Strous GJ, Clevers HC: **Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin.** *EMBO Rep* 2002, **3**:63–8.
331. Stewart TA, Pattengale PK, Leder P: **Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes.** *Cell* 1984, **38**:627–37.
332. Liu H, Radisky DC, Yang D, Xu R, Radisky ES, Bissell MJ, Bishop JM: **MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of αv and $\beta 3$ integrin subunits.** *Nat Cell Biol* 2012, **14**:567–74.
333. Wittekind C, Meyer H: **TNM. Klassifikation maligner Tumoren.** 7. Auflage. Weinheim: Wiley; 2010.

6 Anhang

6.1 Eigenschaften verwendeter Patienten-Kohorten

Tabelle 6-1: Klinisch-pathologische Parameter des Mamma-Kryogewebe-Kollektivs

Parameter	Kategorisierung	n ^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 63,5 Jahre Spanne: 33-84 Jahre		
	<63,5 Jahre	31	50,0
	≥63,5 Jahre	31	50,0
Tumorgroße^b			
	pT1	35	56,5
	pT2	25	40,3
	pT3	2	3,2
	pT4	0	0
Lymphknoten-Status^b			
	pN0	34	54,8
	pN1-3	27	43,6
	unbekannt	1	1,6
Histologischer Grad^c			
	G1	2	3,2
	G2	21	33,9
	G3	38	61,3
	unbekannt	1	1,6
Histologischer Typ			
	invasiv-duktral	55	88,7
	invasiv-lobulär	5	8,1
	andere	2	3,2
Östrogenrezeptor-Status			
	negativ (IRS ^d 0-2)	18	29,0
	positiv (IRS ^d 3-12)	42	67,7
	unbekannt	2	3,2
Progesteronrezeptor-Status			
	negativ (IRS ^d 0-2)	20	32,3
	positiv (IRS ^d 3-12)	39	62,9
	unbekannt	3	4,8
HER2-Status^e			
	negativ	53	85,5
	positiv	8	12,9
	unbekannt	1	1,6

^aWeibliche Patienten mit einem primären, unilateralen, invasiven Brusttumor. ^bGemäß der TNM-Klassifikation nach Sobin and Wittekind [20] ^cNach Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [19]. ^dImmunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^eDie Überexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-Score-System diagnostiziert. Zweifelhafte (DAKO-IHC: 2+) Fälle wurden zusätzlich mittels FISH-Analyse auf Amplifikation des Gens hin analysiert.

Tabelle 6-2: Klinisch-pathologische Parameter des TMA für die AGR3-Proteinexpressions-Studie

Parameter	Kategorisierung	n^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 58 Jahre		
	Spanne: 25-82 Jahre		
	<58 Jahre	92	48,4
	≥58 Jahre	96	50,5
Tumorgröße^b	unbekannt	2	1,1
	pT1	61	32,1
	pT2	87	45,8
	pT3	12	6,3
	pT4	26	13,7
	unbekannt	4	2,1
Lymphknoten-Status^b	pN0	81	42,6
	pN1-3	102	53,7
	unbekannt	7	3,7
Histologischer Tumorgrad^c	G1	15	7,9
	G2	89	46,8
	G3	82	43,2
	unbekannt	4	2,1
Histologischer Typ	DCIS/IDC	9	4,7
	invasiv-dukta	173	91,1
	invasiv-lobulär	7	3,7
	andere	1	0,5
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^d 0-2)	44	23,2
	positiv (IRS ^d 3-12)	101	53,2
	unbekannt	45	23,7
Progesteronrezeptor-Status	negative (IRS ^d 0-2)	107	56,3
	positive (IRS ^d 3-12)	51	26,8
	unknown	32	16,9
HER2-Status^e	negativ (0; 1+; 2+)	132	69,5
	positiv (3+)	30	15,8
	unbekannt	28	14,7

^aWeibliche Patienten mit primären, unilateralen, invasiven Mammakarzinomen. ^bGemäß der TNM-Klassifikation nach Sobin and Wittekind [20] ^cNach Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [19]. ^dImmunreaktiver *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^eDie Überexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-*Score*-System diagnostiziert.

Tabelle 6-3: Klinisch-pathologische Parameter des Serumkollektivs

Parameter	Kategorisierung	n^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 59,5 Jahre Spanne: 39-81 Jahre		
	<59,5 Jahre	24	50,0
	≥59,5 Jahre	24	50,0
Tumorgroße^b			
	pT1	28	58,3
	pT2	17	35,4
	pT3	3	6,3
	pT4	0	0
Lymphknoten-Status^b			
	pN0	39	81,3
	pN1-3	9	18,7
Histologischer Grad^c			
	G1	4	8,3
	G2	39	81,3
	G3	4	8,3
	unbekannt	1	2,1
Histologischer Typ			
	invasiv-dukta	39	81,3
	invasiv-lobulär	5	10,4
	andere	2	4,2
	unbekannt	2	4,2
Östrogenrezeptor-Status			
	negativ (IRS ^d 0-2)	8	16,7
	positiv (IRS ^d 3-12)	40	83,3
Progesteronrezeptor-Status			
	negativ (IRS ^d 0-2)	9	18,8
	positiv (IRS ^d 3-12)	39	81,3
HER2-Status^e			
	negativ	35	72,9
	positiv	12	25,0
	unbekannt	1	2,1

^aWeibliche Patienten mit invasivem Mammakarzinom. ^bGemäß der TNM-Klassifikation nach Sobin und Wittekind [20]. ^cNach Bloom und Richardson, modifiziert nach Elston und Ellis [19]. ^dImmunreaktiver *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^eDie Überexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-*Score*-System diagnostiziert. Zweifelhafte (DAKO-IHC: 2+) Fälle wurden zusätzlich mittels FISH-Analyse auf Amplifikation des Gens hin analysiert.

Tabelle 6-4: Klinisch-pathologische Parameter des TCGA-*in silico*-Mammakarzinom-Kollektivs

Parameter	Kategorisierung	n^a	%
Alter bei Diagnosestellung	Median: 58 Jahre Spanne: 26-90 Jahre < 58 Jahre ≥ 58 Jahre unbekannt	500 483 14	50,2 48,4 1,4
Tumorgroße^b	pT1 pT2 pT3 pT4 unbekannt	254 559 113 35 36	25,5 56,1 11,3 3,5 3,6
Lymphknoten-Status^b	pN0 pN1-3 unbekannt	453 495 49	45,4 49,6 4,9
Fernmetastasen^b	pM0 pM1 unbekannt	841 15 141	84,4 1,5 14,1
Tumor-Stadium^b	Stadium I Stadium II Stadium III Stadium IV unbekannt	162 768 0 15 52	16,2 77,0 0,0 1,5 5,2
Östrogenrezeptor-Status	negativ (IRS ^c 0-2) positiv (IRS ^c 3-12) unbekannt	176 595 226	17,7 59,7 22,7
Progesteronrezeptor-Status	negativ (IRS ^c 0-2) positiv (IRS ^c 3-12) unbekannt	252 516 229	25,3 51,8 23,0
HER2-Status^d	negativ positiv unbekannt	642 114 241	64,4 11,4 24,2

^aWeibliche Patienten mit Mammakarzinom. ^bGemäß der TNM-Klassifikation nach Sobin and Wittekind [20]. ^cImmunreaktiver *Score* (IRS) nach Remmele und Stegner [272]. ^dDie Überexpression des *HER2/NEU*-Gens wurde gemäß IHC-basiertem DAKO-*Score*-System diagnostiziert. Zweifelhafte (DAKO-IHC: 2+) Fälle wurden zusätzlich mittels FISH-Analyse auf Amplifikation des Gens hin analysiert.

6.2 Klassifizierung maligner Tumoren der Brust

6.2.1 Staging des humanen Mammakarzinoms

Die Stadieneinteilung (*Staging*) des Mammakarzinoms erfolgt gemäß der UICC nach Bewertung der Ausdehnung des Primärtumors (**pT**), des Befalls regionärer Lymphknoten (**pN**) sowie des Vorliegens einer Fernmetastasierung (**pM**). Siehe Tabelle 6-5 und Tabelle 6-6.

Tabelle 6-5: pTNM-Klassifikation des humanen Mammakarzinoms (nach [333])

pT-Klassifikation (Primärtumor)	
pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
pT1	Tumor bis 2 cm in größter Ausdehnung
pT1mic	Mikroinvasion bis 0,1 cm in größter Ausdehnung
pT1a	Tumor > 0,1 bis 0,5 cm in größter Ausdehnung
pT1b	Tumor > 0,5 bis 1 cm in größter Ausdehnung
pT1c	Tumor > 1 bis 2 cm in größter Ausdehnung
pT2	Tumor > 2 cm bis maximal 5 cm im größten Durchmesser
pT3	Tumor > 5 cm im größten Durchmesser
pT4	Tumor jeder Größe mit Befall der Thoraxwand oder der Haut
pT4a	mit Befall der Thoraxwand
pT4b	mit Ödem, Ulzeration der Haut oder Satellitenknoten der Haut der gleichen Brust
pT4c	Vorliegen der Kriterien T4a und T4b
pT4d	Inflammatorisches Karzinom
pN-Klassifikation (regionäre Lymphknoten)	
pNx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1mi	Mikrometastasen (> 0,2 mm und/oder mehr als 200 Tumorzellen; nicht größer 0,2 cm)
pN1	Metastasen in 1 bis 3 ipsilateralen Lymphknoten und/oder mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der ipsilateralen A. mammaria interna
pN1a	1 bis 3 axilläre Lymphknotenmetastasen, mindestens eine > 2 mm
pN1b	Mikroskopische Metastasen in Sentinel-Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, klinisch nicht erkennbar
pN1c	pN1a und pN1b
pN2	Metastasen in 4 bis 9 ipsilateralen axillären Lymphknoten oder in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Metastasen
pN2a	Metastasen in 4 bis 9 axillären Lymphknoten, darunter mindestens eine > 2 mm
pN2b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3a	Metastasen in ≥10 ipsilateralen axillären Lymphknoten (wenigstens eine > 2 mm) oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase oder Lymphknotenmetastasen in mehr als 2 axillären Lymphknoten und in Lymphknoten entlang der A. mammaria interna, nachgewiesen durch Untersuchung des/der Sentinel-Lymphknoten(s), aber nicht klinisch erkennbar
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
pM-Klassifikation (Fernmetastasierung)	
pM0	keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 6-6: UICC-Stadieneinteilung für das humane Mammakarzinom (nach [333])

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1mic, T1	N0	M0
IB	T0, T1mic, T1	N1mi	M0
IIA	T0, T1mic, T1	N1	M0
	T2	N0	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T0, T1mic, T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
IIIC	Alle T	N3	M0
IV	Alle T	Alle N	M1

6.2.2 Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms

Invasive Mammakarzinome können hinsichtlich ihres histologischen Grades, als Maß für die Aggressivität (Malignität) des Tumors, stratifiziert werden (engl. *Grading*). Dieser ergibt sich aus der Untersuchung der Differenzierung der Zellen (Tubulusausbildung und Kernpolymorphie) und ihrer proliferativen Aktivität (Mitose-Rate) [19]. Die Bildung eines *Summenscores* führt schließlich zur Einteilung der Karzinome in die prognostisch relevanten Klassen Grad 1 bis 3, wobei Grad 1 einen gut differenzierten, minder malignen Tumor repräsentiert, hingegen Grad 3 ein Mammakarzinom mit schlechter Differenzierung und hohem Malignitätsgrad beschreibt [19]. Siehe Tabelle 6-7 und Tabelle 6-8.

Tabelle 6-7: Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms

Merkmal	Kriterium	Wert
Tubulusausbildung	75%	1
	10-75%	2
	< 10%	3
Kernpolymorphie	gering	1
	mittelgradig	2
	stark	3
Mitose-Rate	0-5/10 HPF ^a	1
	6-11/10 HPF ^a	2
	≥ 12/10 HPF ^a	3
Summenscore		3-9

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

Tabelle 6-8: Auswertesystem des histologischen Summenscores

Summenscore	Malignitätsgrad	G-Gruppe	Definition
3, 4, 5	gering	G1	gut differenziert
6, 7	mäßig	G2	mäßig differenziert
8, 9	hoch	G3	entdifferenziert

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Verteilung der häufigsten Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2010.	1
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der Anatomie der weiblichen Brust.	2
Abbildung 1-3: Modell der neoplastischen Progression des humanen Mammakarzinoms.	7
Abbildung 1-4: Darstellung essentieller Tumor-Eigenschaften.	8
Abbildung 1-5: Vorteile und Risiken der Screening-Mammographie.	14
Abbildung 1-6: Modell des WNT-Signalweges.	22
Abbildung 1-7: Der PCP-Signalweg.	23
Abbildung 1-8: Domänen-Architektur von CELSR1.....	25
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des pT-REx-DEST30-Vektors.	45
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung des Vektors pMS-L-SNAP-mut 2715 IV.....	46
Abbildung 2-3: Schematische Darstellung des pGeneClip™ Neomycin-Vektors.....	47
Abbildung 2-4: Prinzip des Sandwich-ELISA.	70
Abbildung 2-5: Wundheilungstest mit Ibidi-Zellkultureinsätzen.	79
Abbildung 2-6: Prinzip des Boyden Chamber-Migrationstests.	81
Abbildung 3-1: Identifizierung aufregulierter Biomarker-Kandidaten in malignen Mammakarzinom-Zelllinien.....	86
Abbildung 3-2: Detektion von CELSR1-Protein in konditioniertem Medium der Zelllinie MCF7.	89
Abbildung 3-3: Aufregulation der AGR3-mRNA-Expression in G1/G2- und luminalen Brusttumoren.	91
Abbildung 3-4: Aufregulation der AGR3-Proteinexpression in G1/G2- und luminalen Tumoren der Brust.	95
Abbildung 3-5: Graduelle Zunahme der AGR3-Proteinexpression vom Brust-Normalgewebe bis zum invasiven Mammakarzinom.....	97

Abbildung 3-6: Charakterisierung der Proteinexpression der Biomarker-Kandidaten ASPN, CTHRC1 und NMU in humanem Normal- und Tumorgewebe der Brust.	103
Abbildung 3-7: Proteinexpression von ASPN und CTHRC1 in humanem Normal- und Tumorgewebe der Brust.	104
Abbildung 3-8: Protein-Konzentrationen der Biomarker-Kandidaten ASPN und CTHRC1 im Blutserum von Brustkrebs-Patientinnen und gesunden Spenderinnen.....	104
Abbildung 3-9: Evaluierung der Biomarker-Effizienz für den Kandidaten AGR3.	105
Abbildung 3-10: Evaluierung der Effizienz des Biomarker-Kandidaten AGR2 und des AGR2-AGR3-Biomarker-Dupletts.	106
Abbildung 3-11: Eine erhöhte AGR3-Proteinexpression in Grad 1/2-Brustkrebs-Fällen ist mit einem verringerten Tumor-spezifischen Überleben assoziiert.	109
Abbildung 3-12: Einfluss der AGR3-Expression auf das Koloniewachstum der humanen Brustkrebs-Zelllinien MCF7 und BT549.	112
Abbildung 3-13: Genexpressionsänderung von AGR2, AGR3 und DDIT3 nach Tunicamycin-induziertem Stress des endoplasmatischen Retikulums.	114
Abbildung 3-14: Eine erhöhte CELSR1-mRNA-Expression im humanen Mammakarzinom ist mit einem längeren Rezidiv-freien Überleben assoziiert.	116
Abbildung 3-15: CELSR1-Expression nach induziertem transienten Knockdown in MCF7-Brustkrebszellen.	117
Abbildung 3-16: Der Einfluss von CELSR1 auf das Zellwachstum der luminalen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7.	118
Abbildung 3-17: Einfluss von CELSR1 auf das Koloniewachstum der humanen Brustkrebs-Zelllinie MCF7.	119
Abbildung 3-18: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests nach siRNA-induziertem CELSR1-Knockdown in MCF7-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle.	121
Abbildung 3-19: Der Einfluss von CELSR1 auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7.	122
Abbildung 3-20: Der Einfluss von CELSR1 auf die Matrigel-basierte Zell-Matrix-Adhäsion der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF7.	123
Abbildung 3-21: Der Einfluss der CTHRC1-Expression auf das Gesamt- und Rezidiv-freie Überleben von Brustkrebspatientinnen.	125

Abbildung 3-22: siRNA-induzierter Expressionsverlust von CTHRC1 in BT549-Brustkrebszellen.	126
Abbildung 3-23: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests mit BT549-Zellen nach transientem CTHRC1-Expressionsverlust im Vergleich zur Negativkontrolle.	128
Abbildung 3-24: Der Einfluss von CTHRC1 auf den Wundschluss von BT549-Brustkrebszellen.	129
Abbildung 3-25: Der Einfluss von CTHRC1 auf das Migrationsverhalten humaner BT549-Brustkrebszellen.	130
Abbildung 3-26: NMU-mRNA-Expression im Brust-Normalgewebe und PAM50-klassifizierten Brustkrebs-Fällen.	132
Abbildung 3-27: NMU-mRNA-Expression in Abhängigkeit von der Brusttumor-Größe. ...	133
Abbildung 3-28: Eine erhöhte NMU-mRNA-Expression in Brusttumoren des luminalen Subtyps ist mit einem verringerten Rezidiv-freien Überleben (RFÜ) assoziiert.	134
Abbildung 3-29: Eine erhöhte NMU-mRNA-Expression in Brusttumoren des luminalen Subtyps ist mit einem verringerten Fernmetastasen-freien Überleben (FMFÜ) assoziiert.	135
Abbildung 3-30: NMU-Expression auf mRNA- und Proteinebene in humanen Mammakarzinom-Zelllinien.	136
Abbildung 3-31: NMU-mRNA und Protein-Expression in den stabil transfizierten humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T.	137
Abbildung 3-32: Der Einfluss von NMU auf das Zellwachstum der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T.	139
Abbildung 3-33: Der Einfluss von NMU auf das Koloniewachstum der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T.	140
Abbildung 3-34: Der Einfluss von NMU auf die Apoptose in der humanen Mammakarzinom-Zelllinie SKBR3.	142
Abbildung 3-35: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests für den Leervektor-Klon #6 und den NMU-Klon #38 des SKBR3-Modells.	143
Abbildung 3-36: Repräsentative Darstellung eines Wundheilungstests für den Leervektor-Klon #17 und den NMU-Klon #12 des Hs578T-Modells.	144
Abbildung 3-37: Der Einfluss von NMU auf die Migrationsfähigkeit der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T.	145

Abbildung 3-38: Der Einfluss von NMU auf die Matrigel-basierte Zell-Matrix-Adhäsion der humanen Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T.....	147
Abbildung 3-39: Expression potentieller Rezeptoren für Neuromedin U in den beiden Mammakarzinom-Zelllinien SKBR3 und Hs578T.	148
Abbildung 3-40: NMUR1- und NMUR2-mRNA-Expression in den molekularen Mammakarzinom-Subtypen.	149
Abbildung 3-41: Real-Time PCR-basierte mRNA-Expressionsanalyse ausgewählter WNT-Signalwegs-Komponenten im luminalen SKBR3 NMU-Tumormodell.	152
Abbildung 3-42: Western Blot-Analyse ausgewählter WNT-Signalwegs-Komponenten im luminalen SKBR3 NMU-Tumormodell.....	153
Abbildung 3-43: Densitometrische Auswertung der Western Blot-Proteinexpression ausgewählter WNT-Signalwegs-Komponenten im luminalen SKBR3 NMU-Modell.	154
Abbildung 3-44: Mögliches Modell der NMU-vermittelten Modulation des WNT-Rezeptor-Signalweges in luminalen SKBR3-Brustkrebszellen.	155

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Definition molekularer Brustkrebs-Subtypen.	5
Tabelle 1-2: Wichtige Eigenschaften von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen.	9
Tabelle 2-1: Verwendete humane Mammakarzinom-Zelllinien und deren Ursprung	36
Tabelle 2-2: Verwendete Geräte.....	37
Tabelle 2-3: Software und Datenbanken	38
Tabelle 2-4: Chemikalien	38
Tabelle 2-5: Lösungsmittel.....	39
Tabelle 2-6: Verwendete Puffer und Lösungen	40
Tabelle 2-7: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien	41
Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Medien für die Bakterienkultivierung.....	41
Tabelle 2-9: Verwendete Primärantikörper und Blocking-Peptide.....	41
Tabelle 2-10: Verwendete Sekundärantikörper.....	42
Tabelle 2-11: Verwendete molekularbiologische Kits.....	42
Tabelle 2-12: Verwendete Enzyme für die Plasmid-Klonierung	43
Tabelle 2-13: Kommerzielles verwendetes rekombinantes Protein	43
Tabelle 2-14: Oligonukleotide für die Real-Time PCR	43
Tabelle 2-15: Oligonukleotide für die Plasmid-Klonierung.....	44
Tabelle 2-16: Oligonukleotide für die Sanger-Sequenzierung.....	44
Tabelle 2-17: Oligonukleotide zum Nachweis der stabilen genomischen Plasmid-Integration	45
Tabelle 2-18: shRNA-Sequenzen.....	48
Tabelle 2-19: Sequenzen verwendeter CELSR1- und CTHRC1-siRNA.....	48
Tabelle 2-20: Zusammensetzung Mastermix cDNA-Synthese für 1×Ansatz	50
Tabelle 2-21: Ansatz für Standard-PCR.....	51
Tabelle 2-22: Temperaturprofil einer Standard-PCR.....	51

Tabelle 2-23: Zusammensetzung eines RT-PCR-Reaktionsansatzes.....	53
Tabelle 2-24: Temperaturprofil eines typischen RT-PCR-Ansatzes.....	53
Tabelle 2-25: Zusammensetzung einer Standard-Sequenzierungs-PCR.....	55
Tabelle 2-26: Temperaturprofil einer Sequenzierungs-PCR.....	55
Tabelle 2-27: Zusammensetzung der PCR mit Linker-Primern.....	56
Tabelle 2-28: Restriktionsverdau der AGR2- und AGR3-Amplifikate	57
Tabelle 2-29: Restriktionsverdau und Dephosphorylierung des Vektors pMS-L-SNAP-mut 2715 IV	57
Tabelle 2-30: Ligationsansatz	58
Tabelle 2-31: Absteigende Alkoholreihe für die IHC	61
Tabelle 2-32: Hitze-Vorbehandlung zur Antigen-Demaskierung	61
Tabelle 2-33: Primärantikörper-Verdünnungen für die IHC.....	62
Tabelle 2-34: Aufsteigende Alkoholreihe für die IHC.....	62
Tabelle 2-35: Primärantikörper für die Immunodetektion im Western Blot.....	68
Tabelle 2-36: Letale G418-Konzentrationen.....	73
Tabelle 2-37: Transfektions-Schema	74
Tabelle 2-38: Verdünnungsschema für Einzelklon-Isolierung	75
Tabelle 2-39: Zusammensetzung Ansatz für siRNA-Transfektion.....	76
Tabelle 3-1: Identifizierter Kandidaten-Pool	85
Tabelle 3-2: Übersicht über mRNA-Expressionsänderungen analysierter Kandidatengene in humanen Mammakarzinom-Zelllinien.	87
Tabelle 3-3: Korrelation klinisch-pathologischer Parameter des Kryogewebe-Kollektivs mit der AGR3-mRNA-Expression	92
Tabelle 3-4: Korrelation klinisch-pathologischer Parameter des in silico-Datensatzes mit der AGR3-mRNA-Expression	93
Tabelle 3-5: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des TMA mit der AGR3- Proteinexpression	96
Tabelle 3-6: Medianer FC der Kandidatengen-mRNA-Expression über alle Tumoren und in IHC-klassifizierten Brustkrebs-Subtypen in Relation zur Normalgewebe-Expression	98

Tabelle 3-7: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des Kryogewebe-Kollektivs ^a mit mRNA-Expressionsdaten für die Kandidatengene ASPN, CELSR1, CTHRC1, GREM1 und NMU.....	100
Tabelle 3-8: Korrelation der klinisch-pathologischen Parameter des in silico-Datensatzes ^a mit mRNA-Expressionsdaten für die Kandidatengene ASPN, CELSR1, CTHRC1 und NMU ..	101
Tabelle 3-9: Univariate Analyse klinisch-pathologischer Parameter in Grad ^a 1/2-Brusttumoren im Hinblick auf das Tumor-spezifische Überleben.....	109
Tabelle 3-10: Multivariates Cox-Regressionsmodell mit allen potentiell das Tumor-spezifische Überleben von Grad ^a 1/2-Brusttumoren beeinflussenden Faktoren	110
Tabelle 3-11: Ausgewählte, über NMU aufregulierte GO-Kategorien im SKBR3-Tumormodell	151
Tabelle 3-12: Ausgewählte, über NMU herabregulierte GO-Kategorien im SKBR3-Tumormodell	151
Tabelle 3-13: Ausgewählte, deregulierte Gene des WNT-Rezeptor-Signalweges im SKBR3 NMU-Modell.....	152
Tabelle 6-1: Klinisch-pathologische Parameter des Mamma-Kryogewebe-Kollektivs.....	205
Tabelle 6-2: Klinisch-pathologische Parameter des TMA für die AGR3-Proteinexpressions-Studie.....	206
Tabelle 6-3: Klinisch-pathologische Parameter des Serumkollektivs.....	207
Tabelle 6-4: Klinisch-pathologische Parameter des TCGA-in silico-Mammakarzinom-Kollektivs	208
Tabelle 6-5: pTNM-Klassifikation des humanen Mammakarzinoms	209
Tabelle 6-6: UICC-Stadieneinteilung für das humane Mammakarzinom	210
Tabelle 6-7: Histologische Graduierung des humanen Mammakarzinoms	210
Tabelle 6-8: Auswertesystem des histologischen Summenscores	210

6.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Aachen, den 21. September 2015

Stefan Garczyk

6.6 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Edgar Dahl (Institut für Pathologie, UK Aachen) danke ich für das spannende Thema meiner Arbeit, eine konstruktive Zusammenarbeit sowie eine engagierte fachliche und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Björn Usadel (Institut für Biologie I, RWTH Aachen) danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates.

Frau Prof. Dr. Ruth Knüchel-Clarke (Institut für Pathologie, UK Aachen) danke ich sehr für die Möglichkeit, am Institut für Pathologie meine Promotion absolvieren zu können sowie die Schaffung einer stets motivierenden und positiven Atmosphäre am Institut.

Ich möchte mich bei allen Kooperationspartnern der AG Molekulare Onkologie bedanken. Den Partnern des EU-geförderten, interdisziplinären MicroBioMed-Projektes danke ich für eine konstruktive und interessante Zusammenarbeit, zudem für die wertvolle Gelegenheit einen Einblick in zum Teil eher „ferner liegende“ wissenschaftliche Disziplinen erhalten zu können. Ich bedanke mich bei Herrn Dr. Tobias Anzeneder und Frau Ulla Ohlms (Stiftung PATH) für die Bereitstellung der Serumproben und eine erfolgreiche Kooperation.

Bei Frau Dr. Wiebke Antonopoulos (Institut für Pathologie, MH-Hannover), Frau Dr. Saskia von Stillfried und Frau Dr. Dr. Nadine Gaisa (Institut für Pathologie, UK Aachen) möchte ich mich herzlich für die geduldige Begutachtung zahlreicher Gewebeschnitte sowie die Beantwortung so einiger histopathologischer Fragen bedanken.

Ein liebes Dankeschön auch an die Master- (Natalie Klotz, Sabrina Szczepanski) und Bachelor-Studenten (Florian Schüller, Rebekka Heinen) der AG Molekulare Onkologie für ihre Mithilfe.

Ich danke besonders Herrn Dr. Michael Rose für seine kompetente fachliche Beratung und eine konstruktive, erfolgreiche Zusammenarbeit. Darüber hinaus aber auch für seine freundschaftlich-kollegiale und motivierende Art im Laboralltag.

Ich möchte mich auch herzlich bei Herrn Dr. Jürgen Veeck für ein stets offenes Ohr bei fachlichen Problemen und eine uneigennützig, engagierte und kompetente Unterstützung bedanken.

Ich danke den Technischen Assistentinnen für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft: Sonja von Serényi, Jennifer Wipperfurth, Inge Losen und Roswitha Davtalab.

Ein herzlicher Dank gilt dem gesamten Team der Molekularen Onkologie. Danke für die hervorragende, freundschaftlich-geprägte Arbeitsatmosphäre im Labor, aber auch für die schöne Zeit in Aachen darüber hinaus.

Mein großer, herzlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden.