

E. Noetzel¹ · J. Veeck¹ · F. Horn² · A. Hartmann³ · R. Knüchel¹ · E. Dahl¹

¹ Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Aachen

² Klinik für Frauenheilkunde, Universität Regensburg

³ Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Erlangen

Promotormethylierung von *ID4*

Ein Marker für die Rezidivbildung des humanen Mammakarzinoms

Abkürzungen	
<i>bHLH-Protein</i>	Basisches Helix-Loop-Helix-Protein
<i>BRCA</i>	„breast cancer, early onset“
<i>CDH1</i>	E-Cadherin
<i>CT</i>	„cycle threshold“
<i>DAC</i>	5-Aza-2'-Deoxycytidin
<i>DAPK</i>	„death-associated protein kinase“
<i>ER</i>	Östrogenrezeptor
<i>ESR1</i>	Östrogenrezeptor 1
<i>FC</i>	„fold change“
<i>GAPDH</i>	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<i>ID</i>	„inhibitor of DNA-binding“/ „inhibitor of differentiation“
<i>IRS</i>	Immunreaktiver Score
<i>HE-Färbung</i>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<i>HLH-Protein</i>	Helix-Loop-Helix-Protein
<i>MGMT</i>	O-6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
<i>M-Reaktion</i>	Primerreaktion mit methylierter DNA
<i>MSP</i>	Methylierungsspezifische PCR
<i>OS</i>	Gesamtüberleben
<i>PAX</i>	„paired box“
<i>PCR</i>	Polymerasekettenreaktion
<i>PGR</i>	Progesteronrezeptor
<i>RB</i>	Retinoblastom
<i>RFS</i>	Rezidivfreies Überleben
<i>TIMP</i>	„tissue inhibitor of metalloproteinase“
<i>TIMP3</i>	„TIMP metalloproteinase inhibitor 3“
<i>TNM</i>	Abkürzung für Tumor (Beschreibung von Ausdehnung und Verhalten des Primärtumors), „nodes“ (Lymphknoten, Fehlen bzw. Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen) und Metastasen (Fehlen bzw. Vorhandensein von Fernmetastasen)
<i>TSA</i>	Trichostatin A
<i>TSP</i>	Transkriptionsstartpunkt
<i>U-Reaktion</i>	Primerreaktion mit unmethylierter DNA

Die ID-Protein-Familie besteht aus 4 Mitgliedern. *ID4* zeichnet sich wie alle ID-Proteine durch ein Helix-Loop-Helix-Motiv aus, mittels welchem es mit anderen basischen Helix-Loop-Helix-Proteinen dimerisieren kann. Unter ihren Bindungspartnern finden sich auch Nicht-bHLH-Proteine. Dazu gehören Transkriptionsfaktoren, wie das Retinoblastomprotein oder die Gruppe der Pax-Proteine [1, 8]. Die Formation der ID-bHLH-Heterodimere führt zu einer dominant-negativen Kontrolle der Gentranskription und reguliert so die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, welche für die Regulierung der Zellproliferation in der Entwicklung und der Differenzierung verschiedenster Zelltypen verantwortlich sind [33]. Es ist daher nicht überraschend, dass ein Zusammenhang zwischen der Deregulierung der *ID*-Gen-Expression und der humanen Krebsentstehung gezeigt werden konnte. In Karzinomen des Pankreas [15] und des Dickdarms [15, 29] ist die Genexpression von *ID1*, *ID2* und *ID3* deutlich aufreguliert; folglich wurde diesen Genen primär ein onkogener Charakter zugeschrieben. *ID4* hingegen scheint als Tumorsuppressor zu fungieren, da seine RNA-Expression in Prostatakarzinomen [1], humanen Leukämien [32], kolorektalen Karzinomen [25] und Adenokarzinomen des Magens [4] deutlich niedriger ist als in den entsprechenden Normalgeweben.

Aberrante epigenetische Modifikationen der DNA, z. B. Promotorhyper-

methylierung, stellen zentrale Mechanismen der Genderegulierung in humanen Tumoren dar [14]. Die Hypermethylierung von CpG-reichen Regionen (CpG-Inseln) innerhalb von Genpromotoren ist eine wichtige Voraussetzung für die Inaktivierung von wichtigen Tumorsuppressoren, wie *p16^{INKa}*, *p15^{INK4b}*, *p14^{ARF}*, *DAPK* und *MGMT* [9]. Für das humane Mammakarzinom wurde bereits die epigenetische Inaktivierung durch eine Hypermethylierung für *BRCA1*, *14-3-3σ*, *TIMP3*, *ESR1*, *PGR* und *CDH1* beschrieben [10]. Die Promotorregion von *ID4* enthält ebenfalls CpG-Inseln, welche in Adenokarzinomen des Magens als hypermethyliert gefunden wurden und mit dem Verlust der *ID4*-Gen-Expression assoziiert sind [4]. Verschiedene Studien postulierten eine mögliche Korrelation zwischen *ID4*-Promotor-Methylierung und Tumorinitiation bzw. -progression, z. B. in kolorektalen Karzinomen [25], humaner Leukämie [32] und Prostatakarzinom [1]. In normalen epithelialen Brustzellen wurde *ID4* als konstitutiv exprimiert gefunden, die Expression geht jedoch bereits in präneoplastischen Läsionen verloren [7]. Eine andere Studie beschrieb *ID4* als einen negativen Regulator des zentralen Brustkrebstumorsuppressors *BRCA1* [2, 24]. Darüber hinaus konnte ein Verlust der *ID4*-Expression in *BRCA1/ER*-positiven Brustkrebspatientinnen gezeigt werden, sodass angenommen wird, dass *ID4* an der Regulie-

nung der *ER*- und *BRCA1*-Expression beteiligt ist [21]. Neben diesen Ergebnissen wird die Rolle von *ID4* als putativem Tumorsuppressor kontrovers diskutiert und blieb bis jetzt ungeklärt. Im Widerspruch zum häufigen Verlust der *ID4*-Expression in humanen Tumorentitäten zeigte eine Studie die Aufregulierung von *ID4* in der Brustdrüse der Ratte, verbunden mit einer gesteigerten Proliferation und Invasivität der Tumorzelllinien [22]. Eine andere Studie postulierte *ID4* als Tumorsuppressor für die Subgruppe der T1-Mammakarzinome und zeigte, dass die aberrante Hypermethylierung des *ID4*-Gens mit einem erhöhten Risiko für Lymphknotenmetastasen assoziiert ist [26].

Die hier vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Klärung der Rolle der *ID4*-Promotor-Methylierung für die humane Brustkrebsentwicklung. Zu diesem Zweck analysierten wir eine klinisch-relevante Kohorte von kryokonservierten Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen (n=170). Dabei wurde besonderer Wert auf eine repräsentative Zusammenstellung bezüglich Tumorgröße und histologischem Grading gelegt. Mittels In-vitro-DNA-Demethylierung [3] von humanen, malignen Brustkrebszelllinien wollten wir feststellen, inwiefern die *ID4*-Promotor-Methylierung die *ID4*-mRNA-Expression beeinflussen kann. Ein weiteres Ziel war es, eine klare Beziehung zwischen *ID4*-Promotor-Methylierung, *ID4*-mRNA-Expression und *ID4*-Protein-Expression in Mammakarzinomproben nachzuweisen. Eine derartige Korrelation wurde bis jetzt in keiner Studie gezeigt. Abschließend korrelierten wir die *ID4*-Promotor-Methylierung mit klinisch-pathologischen Parametern sowie der *ID4*-Expression von Brustkrebspatientinnen.

Material und Methoden

Kryokonservierte Patientenproben

Die Brustgewebeproben für die Methylierungs- und Expressionsanalysen stammen von Patientinnen (n=170) mit primären Mammakarzinomen, die an den Universitätskliniken in Aachen, Jena, Regensburg und Düsseldorf (Deutschland) behandelt wurden. Alle Patientinnen gaben ihre Einverständniserklärung für die

Einbehaltung und Analyse von Gewebe für Forschungszwecke. Das Gewebematerial wurde sofort nach der Resektion in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Anteil an Tumorzellen in den Proben wurde mittels HE-Färbung bestimmt, nur solche Proben mit einem Anteil an Tumorzellen >70% wurden für die weitere Analysen verwendet. Für Normalgewebe war ein Epithelanteil >30% erforderlich.

Zelllinien

Die verwendeten humanen Brustzelllinien BT20, MDA-MB231, MCF7 und T47D wurden von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) bezogen und den Herstellerangaben entsprechend kultiviert.

Nukleinsäureextraktionen

DNA-Präparationen aus Zelllinien und humanem Gewebe wurde unter Verwendung des QiAmp®-DNA-Kit (Qiagen, Hilden) und den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gewonnen. RNA-Präparationen wurden entsprechend dem TRIzol®-Verfahren nach Herstellerangaben durchgeführt (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Reverse Transkription

1 µg Gesamt-RNA wurde mit dem Promega-Reverse-Transcription-System (Promega, Madison, WI) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

Semiquantitative Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR wurde mit dem Light-Cycler®-System (Roche Diagnostics, Mannheim) unter Verwendung Intron überspannender Primer nach Herstellerangaben wie beschrieben durchgeführt und mittels komparativer CT-Methode im Vergleich zur *GAPDH*-Expression ausgewertet [11, 17, 27].

Bisulfitmodifikation und methylierungsspezifische PCR

Sie wurden wie in der Literatur beschrieben durchgeführt [5, 12, 17, 27].

In-vitro-Demethylierung von DNA

Tumorzelllinien wurden in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/cm² am Tag 0 in einer 6-Loch-Schale ausgesät. Die In-vitro-Demethylierung wurde mit dem Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Sigma-Aldrich, Deisenheim) und dem Histondeazetylaseinhibitor Trichostatin A (Sigma-Aldrich, Deisenheim) wie beschrieben durchgeführt [17].

Immunhistochemie

Für die *ID4*-Protein-Färbung wurden 3 µm dicke, formalinfixierte, paraffineingebettete Gewebeschnitte für 30 min bei 72°C getrocknet, in Xylen entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Anschließend wurden die Schnitte für 35 min in Tris-EDTA-Puffer (pH 9,0) zwecks Antigendemaskierung bei 95°C inkubiert. Es wurde ein polyklonaler *ID4*-Antikörper (Verdünnung 1:150; Inkubation für 90 min; Kaninchen-anti-Human; Sc291, Santa Cruz, CA) verwendet. Der immunhistochemische Nachweis erfolgte unter Verwendung des ChemMate™ EnVision™ Kit (DAKO, Hamburg). Die Schnitte wurden mit Mayer's Hemaotoxylin gegengefärbt und mit Entellan®-Einbettmedium (EMS Diatome, Fort Washington, PA) fixiert. Normal- und Tumorgewebe des Dickdarms dienten als Positivkontrollen für die *ID4*-Protein-Färbung [25]. Die Färbungsintensität wurde von erfahrenen Pathologen nach dem System von Remmele u. Stegner [20] bewertet.

Statistische Methoden

Die statistische Analyse wurde mit der Software SPSS 14.0 durchgeführt (SPSS Software GmbH, München). Eine statistische Signifikanz wurde ab einem $p < 0,05$ angenommen. Ein zweiseitiger Kruskal-Wallis-Test wurde verwendet, um die Expressionsunterschiede zwischen unmethylierten Tumoren, methylierten Tumoren und Normalgeweben zu analysieren. Assoziationen zwischen klinisch-pathologischen Faktoren und molekularen Parametern wurden mittels Fisher's-Exakt-Test untersucht. Das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberlebensintervall

in Relation zu klinisch-pathologischen und molekularen Parametern wurden mittels univariatem Log-rank-Test nach der Methode von Kaplan-Meier sowie mittels multivariater Cox-Regression berechnet.

Ergebnisse

IID4-Methylierung und ID4-Reexpression durch In-vitro-Demethylierung in humanen Brustzelllinien

Initial wurde eine methylierungsspezifische PCR für die Promotoranalyse des *ID4*-Gens etabliert. Hierfür wurden MSP-Primer verwendet, welche komplementär zu einer Sequenz innerhalb der zentralen CpG-Insel (-615 bis +139) nahe des TSP des *ID4*-Promoters sind (■ **Abb. 1a**) und einen Sequenzabschnitt, der etwa 30 bp stromaufwärts des TSP beginnt, amplifizieren. Das PCR-Amplikon des unmethylierten *ID4*-Promoters war 161 bp groß, das des methylierten *ID4*-Promoters 157 bp. Die für die Reaktion mit unmethylierter DNA verwendeten Primer sind komplementär zu den Basen -194 bis -166 und -60 bis -33. Entsprechend binden die für die Reaktion mit methylierter DNA eingesetzten Primer die Basen -192 bis -166 und -60 bis -35 (alle Positionen relativ zum TSP).

Um eine direkte Assoziation zwischen der *ID4*-Promotor-Methylierung und der *ID4*-Gen-Expression nachzuweisen, wurde eine In-vitro-Demethylierungsanalyse an 4 humanen, malignen Brustkrebszelllinien durchgeführt (MDA-MB231, BT20, MCF7 und T47D). Dazu wurden diese Zelllinien mit dem Demethylierungsmittel DAC (72 h) und dem Histondeazetylaseinhibitor TSA (24 h) inkubiert. Die *ID4*-Expression wurde anschließend mittels semiquantitativer Echtzeit-PCR bestimmt (■ **Abb. 1b**). Alle methylierten Zelllinien wiesen nach der Behandlung eine gesteigerte *ID4*-Expression auf, T47D 119-fach, MCF7 38-fach und BT20 19-fach. Die unmethylierte Zelllinie MDA-MB231 dagegen zeigte nur eine marginale Alteration in ihrer *ID4*-mRNA-Expression.

Zusammenfassung · Abstract

Pathologe 2008 · [Suppl 2] 29:319–327 DOI 10.1007/s00292-008-1038-7
© Springer Medizin Verlag 2008

E. Noetzel · J. Veeck · F. Horn · A. Hartmann · R. Knüchel · E. Dahl Promotormethylierung von *ID4*. Ein Marker für die Rezidivbildung des humanen Mammakarzinoms

Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie sollte die Rolle des Transkriptionsfaktors „inhibitor of DNA binding 4“ (*ID4*) in der humanen Brustkrebsentwicklung detaillierter untersucht werden, insbesondere die Bedeutung von aberranter *ID4*-Promotor-Methylierung für den Krankheitsprozess. *ID4*-Gen-Methylierung zeigte sich in 68,9% (117/170) der untersuchten Mammakarzinompräparate und korrelierte hochsignifikant mit dem *ID4*-mRNA-Expressionsverlust ($p < 0,001$). Erstmals konnte eine direkte Korrelation zwischen der *ID4*-Promotor-Methylierung, einer *ID4*-mRNA-Herabregulierung und dem Verlust der *ID4*-Protein-Expression nachgewiesen werden. Interessanterweise erwies sich die *ID4*-Promotor-Methylierung als Marker für ein ungünstiges rezidivfreies Überleben ($p = 0,036$) und zeigte

ein erhöhtes Risiko für Lymphknotenmetastasen ($p < 0,030$) an. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass *ID4* ein neues Tumorsuppressorgen des humanen Brustgewebes darstellen könnte. Es wird im Zuge der Tumorentstehung frequent epigenetisch abgeschaltet, die entsprechenden Mammakarzinome haben möglicherweise ein erhöhtes Rezidivrisiko. *ID4*-Promotor-Methylierung könnte daher als prognostischer Biomarker für das humane Mammakarzinom genutzt werden.

Schlüsselwörter

ID4-Promotor-Methylierung · Brustkrebs · Rezidivfreies Überleben · Lymphknotenmetastasen · Tumorsuppressorgen

Promoter methylation of *ID4*. A marker for recurrence-free survival in human breast cancer

Abstract

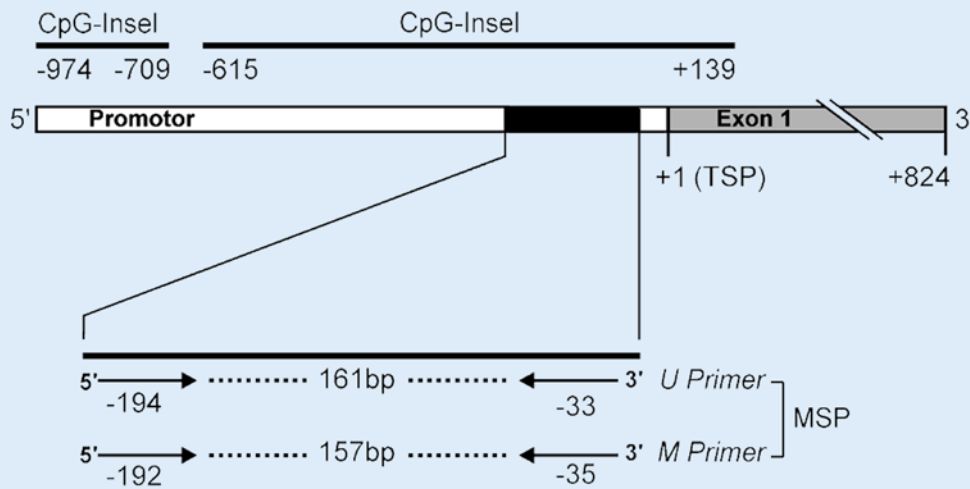
The aim of this study was to unravel the role of the transcription factor inhibitor of DNA binding 4 (*ID4*) in human breast carcinogenesis in more detail, especially the impact of *ID4* promoter methylation on disease progression. Demethylating treatment of breast cancer cell lines was associated with *ID4* re-expression. *ID4* promoter methylation was frequently observed in primary breast cancer samples (68.9%, 117/170). We found a very tight correlation ($p < 0.001$) between *ID4* promoter methylation and loss of *ID4* mRNA expression in these specimens. For breast tissue as the first tumour entity analyzed in detail, we could show a direct correlation between *ID4* promoter methylation and loss of *ID4* expression on both the mRNA and pro-

tein level.

Interestingly, *ID4* promoter methylation was a factor for unfavourable recurrence-free survival ($p = 0.036$) and increased the patient's risk for lymph node metastases ($p = 0.030$). Our data suggest that *ID4* is a potential tumour suppressor gene in human breast tissues that undergoes epigenetic silencing during carcinogenesis, leading to an increased risk for tumour relapse. Thus, *ID4* methylation status could serve as a prognostic biomarker in human breast cancer.

Keywords

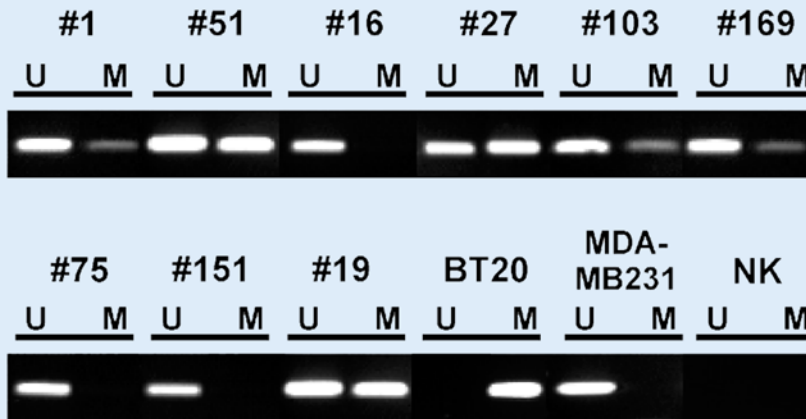
ID4 promoter methylation · Breast cancer · Recurrence free survival · Lymph node metastases · Tumour suppressor gene



a

	MDA-MB231		BT20		MCF7		T47D	
	Kontrolle	DAC TSA	Kontrolle	DAC TSA	Kontrolle	DAC TSA	Kontrolle	DAC TSA
MSP	U M	U M	U M	U M	U M	U M	U M	U M
Echt Zeit PCR FC	1	1.8	1	19.4	1	37.5	1	119.3

b



c

Abb. 1 a Illustration der *ID4*-Gen-Promotor-Region und MSP-Primer-Topologie, Lokalisation von 2 CpG-Inseln innerhalb der *ID4*-Promotor-Region stromaufwärts des TSP, schwarzer Balken Amplicon, U-Primer Bindung an unmethylierte, M-Primer Bindung an methylierte DNA, b In-vitro-Demethylierungsanalyse des *ID4*-Promotors bei 4 humanen Brustkrebszelllinien (*MDA-MB231*, *BT20*, *MCF7*, *T47D*), *ID4*-Methylierungsstatus und FC der *ID4*-mRNA-Reexpression, DAC 5-Aza-2'-Deoxycytidin, TSA Trichostatin A, c *ID4*-Promotor-Methylierungsanalyse primärer, humaner Mammakarzinome mittels MSP-Technologie, *BT20*, *MDA-MB231* Positivkontrollen, *NK* Negativkontrolle. (Mit Genehmigung aus [17]), U unmethylierte, M methylierte DNA, Erläuterung s. Text

ID4-Promotor-Methylierung in primären, humanen Mammakarzinomen

Wir konnten bereits demonstrieren, dass die *ID4*-mRNA-Expression in 78% (39/50) aller humanen, primären Mammakarzinomen signifikant herabreguliert ist [25]. Umetani et al. [26, 25] implizierten in einer Studie, dass die Promotorhypermethylierung ein effektiver Mechanismus der *ID4*-Inaktivierung im humanen Brustkrebs

darstelle, wobei sich ihre Untersuchungen auf die Subgruppe von T1-Mammakarzinomen beschränkten [19]. Ein Ziel dieser Studie war es daher, die exakte Methylierungsfrequenz des *ID4*-Promotors beim humanen Mammakarzinom anhand eines klinisch relevanten Spektrums von Brustkrebspatientinnen zu bestimmen. Hierzu analysierten wir genomische DNA von 170 Patientinnen mit primären Mammakarzinomen mittels MSP-Technologie. Repräsentative Ergebnisse von 9 Patien-

tinnen sind in **Abb. 1c** zusammengefasst. Zur Analyse wurden sowohl Primer, welche für unmethylierte Allele des *ID4*-Promotors spezifisch sind (U-Banden in **Abb. 1c**), als auch Primer, welche für methylierte Allele des *ID4*-Promotors spezifisch sind (M-Banden in **Abb. 1c**), verwendet. Die humanen Brustkrebszelllinien *BT20* und *MDA-MB231* dienten als Positivkontrollen für methylierte bzw. unmethylierte *ID4*-Promotor-Sequenzen [19], Wasser als Template für die Negativ-

kontrolle der MSP. Insgesamt konnte eine *ID4*-Promotor-Methylierung in 68,9% (117/170) der Patientinnen nachgewiesen werden. Dementsprechend zeigten 31,1% (53/170) keine *ID4*-Promotor-Methylierung.

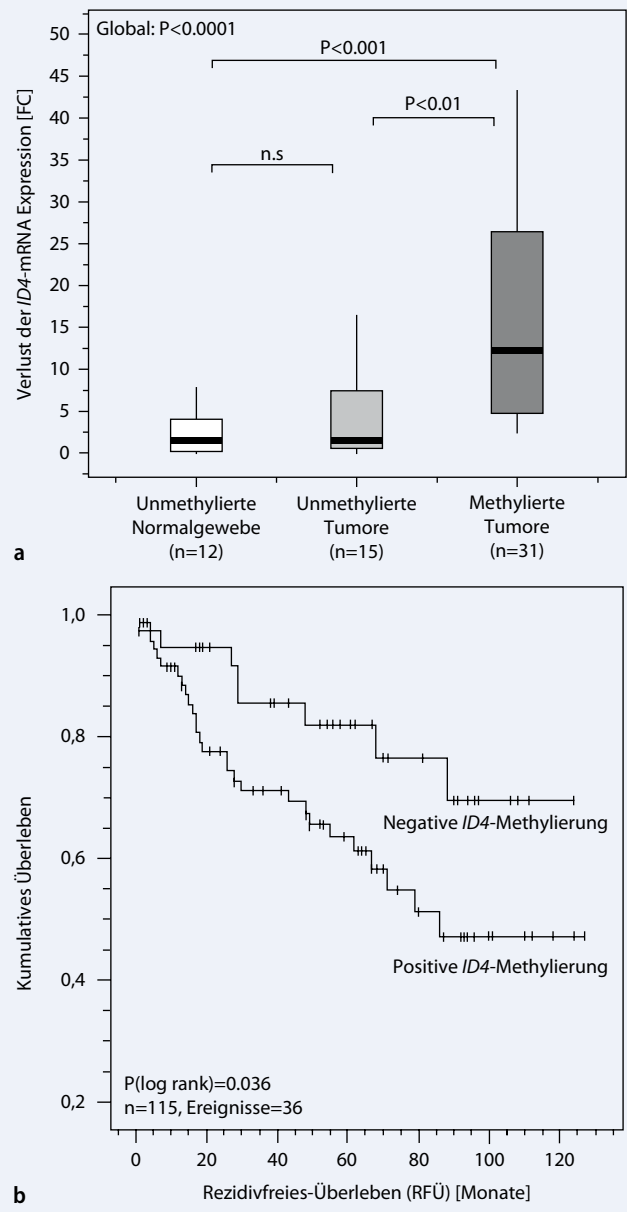
Zusätzlich wurden 13 Normalgewebe getestet, von denen keine einzige Probe eine *ID4*-Methylierung zeigte. Somit konnten wir zeigen, dass es sich bei der aberanten Hypermethylierung des *ID4*-Promotors um einen tumorspezifischen Mechanismus handelt.

Korrelation zwischen *ID4*-Promotor-Methylierung und *ID4*-Expression im humanen Mammakarzinom

Unser nächstes Ziel war es, zu analysieren, inwiefern *ID4*-Promotor-Methylierung zwangsläufig auch zu einer Inaktivierung des *ID4*-Promotors führt. Zu diesem Zweck wurde für einen Teil der Kohorte (n=46), für die der *ID4*-Promotor-Methylierungsstatus bestimmt wurde, auch die *ID4*-mRNA-Expressionsstärke ermittelt (Abb. 2a). Im direkten Vergleich zu einem Standard aus 12 gepoolten Brustnormalgeweben (N) erwies sich der *ID4*-mRNA-Verlust in den unmethylierten Tumoren (T) als marginal (FC=N/T=1,3). Im Gegensatz dazu wiesen *ID4*-methylierte Mammakarzinome einen hochsignifikanten Verlust ($p < 0,001$) der *ID4*-Expression mit einem FC=12,3 auf. Diese Daten zeigen eindeutig, dass die *ID4*-Promotor-Methylierung mit der *ID4*-Gen-Inaktivierung assoziiert ist. Die Analyse der *ID4*-mRNA-Expression in Mammakarzinomen und entsprechenden Mamma-normalgeweben bestätigte einen Verlust der *ID4*-mRNA in 82% der Tumoren (bei einem FC ≥ 2).

Um nachzuweisen, dass die *ID4*-Promotor-Methylierung ebenfalls zu einem Verlust des *ID4*-Proteins führt, wurden parallel der *ID4*-Methylierungs-Status, die *ID4*-mRNA-Expression und die *ID4*-Protein-Expression bei 3 Patientinnen bestimmt, von denen jeweils Tumor- (T) und korrespondierendes Brustnormalgewebe (N) verfügbar waren (Abb. 3). Brustkrebspatientinnen mit einem unmethylierten *ID4*-Promotor wiesen nur einen marginalen Unterschied (FC=1,1, über den

Abb. 2 ▶ **a** Box-Plot-Darstellung des Verlusts der *ID4*-Expression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus des *ID4*-Promotors bei Brustkrebspatientinnen, Y-Achse Faktor der *ID4*-mRNA-Herabregulierung in Brustkrebspatientinnen (n=46) relativ zum Normalgewebestandard (FC), horizontale Linien Mediane der Gruppen; Kästen 25- bis 75%-Quartile; vertikale Linien Spannweite, Minimum und Maximum, **b** Kaplan-Meier-Analyse des rezidivfreien Überlebens (RFS) von Brustkrebspatientinnen in Abhängigkeit der *ID4*-Promotor-Methylierung, Zeitverlauf (Monate) und RFS von 115 Brustkrebspatientinnen mit positiver (untere Kurve) und negativer (obere Kurve) *ID4*-Promotor-Methylierung, Details s. Text. (Mit Genehmigung aus [17])



Quotienten der Expression von N und T berechnet) in ihrer *ID4*-mRNA Expression verglichen mit dem entsprechenden Normalgewebe auf. Dementsprechend zeigte sich auf der Proteinebene ebenfalls kein Unterschied der *ID4*-Expression zwischen Normal- und Tumorgewebe. Mammakarzinompatientinnen mit einem methylierten *ID4*-Promotor hingegen wiesen einen starken Verlust der *ID4*-mRNA auf (16-fach bis 71-fach), verglichen mit den entsprechenden Normalgeweben. Diese methylierten Tumoren zeigten ebenfalls einen fast vollständigen Verlust der *ID4*-Protein-Expression (Abb. 3b,c).

Klinische Relevanz der *ID4*-Promotor-Methylierung für das humane Mammakarzinom

Korrelationsanalysen der *ID4*-Promotor-Methylierung mit klinisch-pathologischen Parametern von Mammakarzinompatientinnen wurden mit dem Fischer's-Exakt-Test durchgeführt (Tab. 1). Ein hypermethylierter *ID4*-Promotor war hierbei signifikant mit einem positiven Lymphknotenstatus ($p = 0,030$) und einem Verlust der *ID4*-mRNA-Expression ($p < 0,001$) assoziiert. Es wurden keine Korrelationen zwischen rezidivfreiem Überleben und Gesamtüberleben mit dem Alter, der Tumorgroße, dem histologischen Grading/Typ

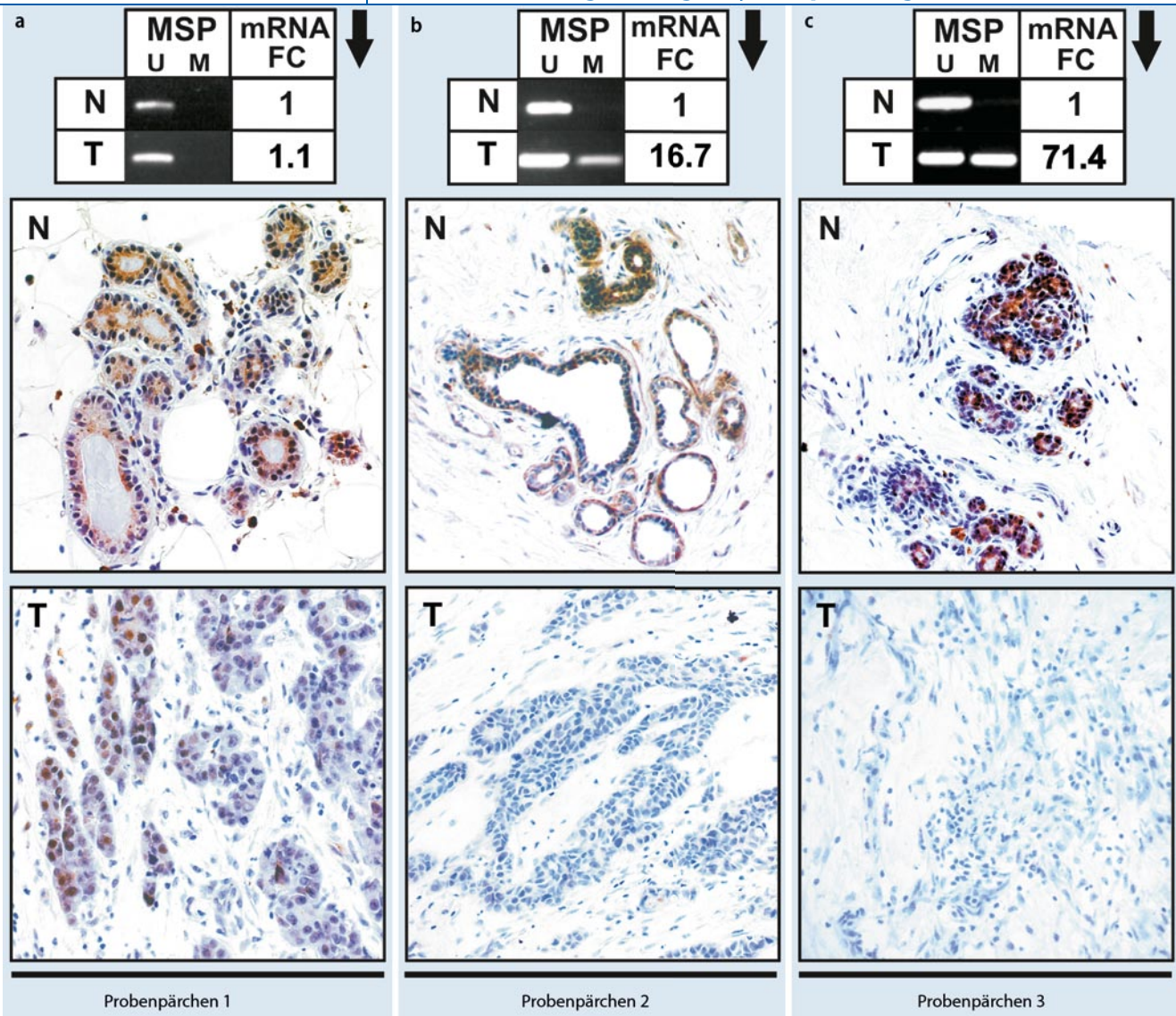


Abb. 3 ▲ Kohärenz der *ID4*-Promotor-Methylierung und der *ID4*-Expression in 3 repräsentativen Proben von primären Mammakarzinomen (T) und ihren korrespondierenden Normalgeweben (N), MSP: *ID4*-Methylierungsstatus, mRNA-FC: *ID4*-mRNA-Expression, Gewebeprobe: immunohistochemische Färbung mit einem *ID4*-Antikörper, Vergr. 400:1, **a** unmethylierter Tumor, im direkten Vergleich zu korrespondierendem Normalgewebe, nur marginal veränderte *ID4*-mRNA- und *ID4*-Protein-Expression. **b, c** methylierte Tumoren, deutlicher Verlust der *ID4*-mRNA- und *ID4*-Protein-Expression im Vergleich zu entsprechendem Normalgewebe, Details im Text. (Mit Genehmigung aus [17])

bzw. dem Östrogen-/Progesteronrezeptorstatus gefunden. Der direkte Vergleich des RFS, des OS und des *ID4*-Methylierungsstatus ist in **Tab. 2** zusammengefasst. Wir fanden ein erhöhtes Risiko für die Rezidivbildung bei Mammakarzinompatientinnen mit positiver *ID4*-Promotor-Methylierung ($p=0,036$), verglichen mit Patientinnen ohne *ID4*-Methylierung: Ersteere hatten eine geschätzte mittlere RFS-Zeit von 80 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 67–93 Monate) verglichen mit 101 Monaten (95%-Konfidenzintervall: 87–115 Mo-

nate) bei Patientinnen ohne *ID4*-Methylierung (**Abb. 2b**, [17]).

Die statistische Abschätzung erfolgte mittels Kaplan-Meier-Methode. Die *ID4*-Promotor-Methylierung war hierbei mit einer niedrigeren 10-Jahres-RFS-Rate von 47% assoziiert, während Patientinnen ohne *ID4*-Promotor-Methylierung eine 10-Jahres-RFS von 71% aufwiesen. Der *ID4*-Promotor-Methylierungsstatus erwies sich in einem multivariaten Cox-Regressionsmodell inklusive der Faktoren, welche das RFS beeinflussen könnten, als nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

Ein Grund hierfür könnte die starke Assoziation zwischen der *ID4*-Methylierung und dem Risiko für Lymphknotenmetastasen sein.

Diskussion

Es ist bekannt, dass der HLH-Transkriptionsfaktor *ID4* funktionell mit fundamentalen Prozessen von Zellen wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose und Angiogenese verknüpft ist [33] und mit Zellzyklusfaktoren wie dem RB1-Protein oder PAX-Proteinen interagiert [31]. Aus die-

sem Grund ist es nicht verwunderlich, dass eine Deregulierung von ID-Proteinen in verschiedenen Tumorentitäten gefunden wurde [18]. Die epigenetische Inaktivierung des *ID4*-Gens durch aberrante Promotorhypermethylierung konnte bereits für diverse humane Tumorentitäten gezeigt werden, wie für Karzinome des Magens [4] und des Dickdarms [25]. Für das humane Mammakarzinom wurde eine solche epigenetische Regulierung der *ID4*-Expression in 67% (16/24) der nodal-positiven Tumoren demonstriert, wobei sich die Analyse auf eine Subgruppe von T1-Tumoren beschränkte [26]. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung einer aberranten *ID4*-Promotor-Methylierung anhand einer klinisch-relevanten Kohorte von Patientinnen mit primären humanen Mammakarzinomen sowie in verschiedenen humanen Brustkrebszelllinien analysiert werden.

Wir konnten durch ein In-vitro-De-methylierungsexperiment in humanen Brustkrebszelllinien zeigen, dass die *ID4*-Expression nach der *ID4*-Promotor-De-methylierung wiederhergestellt wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die *ID4*-Promotor-Methylierung ein zentraler Mechanismus für die Abschaltung des *ID4*-Gens in humanen Mammakarzinomen ist. Dieser Befund ist eine elementare Voraussetzung für eine mögliche tumorsuppressive Funktion des unmethylierten *ID4*-Gens in der humanen Brust. Bis jetzt konnte eine epigenetische Inaktivierung von *ID4* nur für Karzinome des Magens [4] und des Dickdarms [25] gezeigt werden. In dieser Arbeit konnten wir belegen, dass auch ein hoher Prozentsatz von Mammakarzinomen (69%) eine aberrante *ID4*-Promotor-Methylierung aufweist. Ferner konnten wir zeigen, dass es zu einem hochsignifikanten Verlust der *ID4*-mRNA durch eine *ID4*-Promotor-Methylierung in 83% aller Brustkrebspatientinnen kommt. Diese Frequenz ist vergleichbar zu der bereits beschriebenen der *ID4*-mRNA-Herabregulierung in 78% der Fälle auf einer cDNA-Dot-Blot-Analyse [6]. Allerdings stehen unsere Ergebnisse im Widerspruch zu einer bereits berichteten *ID4*-mRNA-Heraufregulierung in Brustkrebszellen der Ratte [22].

Tab. 1 Klinisch-pathologische Parameter in Relation zur *ID4*-Promotor-Methylierung

Variable	<i>ID4</i> -Methylierung	<i>ID4</i> -Methylierung			p-Wert ^d
		Anzahl (n) ^a	Positiv	Negativ	
<i>Total</i>		170	117	53	
<i>Klinisch-pathologische Parameter</i>					
Alter bei Diagnose	<50 Jahre	51	34	17	0,821
	≥50 Jahre	111	76	35	
Tumorgroße ^b	pT1	62	24	44	0,247
	pT2-4	91	27	7	
Lymphknotenstatus ^b	pN0	74	43	31	0,030
	pN1-3	62	47	15	
Histologisches Grading	G1	14	10	4	0,944
	G2	79	52	27	
	G3	61	42	19	
Histologischer Tumortyp	Invasiv duktal	129	87	42	0,940
	Invasiv lobulär	18	12	6	
	Andere	12	8	4	
Östrogenrezeptorstatus	Negativ (IRS ^c =0-2)	52	35	17	0,900
	Positiv (IRS=3-12)	101	69	32	
Progesteronrezeptorstatus	Negativ (IRS=0-2)	57	39	18	0,920
	Positiv (IRS=3-12)	96	65	31	
<i>ID4</i> -mRNA-Expression	FC<2	8	0	8	<0,001
	FC≥2	38	31	7	

^aPatientinnen mit primären, unilateralen, invasiven Mammakarzinomen, kursiv signifikante p-Werte

^bEntsprechend der TMN-Klassifikation von Sobin u. Wittekind [23]

^cIRS Immunreaktiver Score nach [20]

^dFischer's-Exakt-Test

Unsere statistischen Analysen verdeutlichen, dass es sich bei der *ID4*-Promotor-Methylierung um einen neuen, negativ-prognostischen Faktor handeln könnte. Brustkrebspatientinnen mit einem methylierten *ID4*-Promotor zeigten ein verkürztes RFS im direkten Vergleich zu Patientinnen ohne *ID4*-Promotor-Methylierung. Dieser Befund stützt wiederum unsere Hypothese, dass ein funktionelles *ID4*-Gen eine tumorsuppressive Funktion im humanen Brustgewebe ausübt. Somit könnte *ID4* eine gegensätzliche zelluläre Funktion im Bezug zu *ID1* und *ID2* besitzen, denen eine onkogene Rolle in der humanen Brust zugesprochen wird [13, 16, 19]. Die statistische Auswertung unserer Kohorte von Brustkrebspatientinnen (n=170) zeigte eine enge Korrelation zwischen *ID4*-Promotor-Methylierung und dem Risiko für Lymphknotenmetastasen. Dieser Zusammenhang wurde ebenfalls für eine kleine Subgruppe von T1-Tumoren in der Studie von Umetani et al. [26] gefunden und weist auf eine metastasierungssuppressive Funktion von *ID4* hin. Darüber hinaus wurden kei-

ne signifikanten Korrelationen zwischen der *ID4*-Promotor-Methylierung und anderen klinisch-pathologischen Parametern festgestellt.

Unserem Wissensstand nach ist die vorliegende Arbeit die erste Studie, welche einen deutlichen Verlust der *ID4*-Protein-Expression und der *ID4*-mRNA-Expression in Assoziation mit der *ID4*-Promotor-Hypermethylierung für das humane Mammakarzinom nachweisen konnte. Der Nachweis des Proteinverlusts, welcher letztendlich die Aktivität von Zielgenen moduliert, stellt ein wichtiges Ergebnis für die Validierung von *ID4* als einem neuen Tumorsuppressorgen der humanen Mamma dar. Zuvor konnte zwar bereits ein *ID4*-Protein-Verlust in Mamma- [28] und kolorektalen Karzinomen [25] gezeigt werden, diese Studien wiesen aber nicht den Zusammenhang des Proteinverlusts zur Methylierung des *ID4*-Promotors nach.

Tab. 2 Einfluss klinisch-pathologischer Parameter auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen

Variable	Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben			
	Anzahl (n) ^a	Ereignisse	p-Wert ^d	Anzahl (n) ^a	Ereignisse	p-Wert ^d	
<i>Klinisch-pathologische Parameter</i>							
Tumorgröße ^b	pT1	44	14	0,142	45	7	0,396
	pT2-4	77	35		79	16	
Lymphknotenstatus ^b	pN0	55	11	<i>0,021</i>	54	6	<i>0,033</i>
	pN1-3	59	24		59	15	
Histologisches Grading	G1	11	3	<i>0,018</i>	10	1	<i>0,019</i>
	G2	60	15		58	7	
	G3	60	30		54	17	
Histologischer Tumortyp	Invasiv duktal	107	33	<i>0,006</i>	106	23	<i>0,877</i>
	Invasiv lobulär	18	9		18	2	
	Andere	9	7		9	2	
Östrogenrezeptorstatus	Negativ (IRS ^c =0-2)	46	15	0,701	45	12	<i>0,027</i>
	Positiv (IRS=3-12)	82	32		82	14	
Progesteronrezeptorstatus	Negativ (IRS=0-2)	43	18	0,240	43	11	0,059
	Positiv (IRS=3-12)	85	29		84	15	
ID4-Promotor-Methylierung	Negativ	39	8	<i>0,036</i>	39	5	0,169
	Positiv	76	28		75	16	

Univariate Analyse des Einflusses von klinisch-pathologischen Parametern ^aPatientinnen mit primären, unilateralen, invasiven Mammakarzinomen, **kursiv** signifikante p-Werte

^bEntsprechend der TMN-Klassifikation von Sobin u. Wittekind [23]

^cIRS Immunreaktiver Score nach [20]

^dFischer's-Exakt-Test

Fazit für die Praxis

Unsere Daten sprechen dafür, dass *ID4* ein neues putatives Tumorsuppressorgen der humanen Brust darstellen könnte, welches während der Kanzerogenese durch aberrante Promotorhypermethylierung inaktiviert wird. Positive *ID4*-Promotor-Methylierung stellt ferner einen möglichen prognostischen Marker für eine frühe Rezidivbildung des Mammakarzinoms dar und könnte somit als neuer Biomarker in der Behandlung von Brustkrebspatientinnen Verwendung finden. Unsere Untersuchungen bilden eine solide Basis für weiterführende funktionelle Analysen, mit dem Ziel, die Rolle von *ID4* für die Progression und Metastasierung des humanen Mammakarzinoms weiter aufzuklären. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen durch aberrante Promotormethylierung bietet neue Möglichkeiten für die Identifizierung von DNA-basierten Biomarkern für

humane Krebserkrankungen. So könnten DNA-Methylierungsmarkerpanels zukünftig eine verbesserte Krebsfrüherkennung, Risikoabschätzung, Chemoprädiktion und Kontrolle der Rezidivbildung ermöglichen, z. B. nach erfolgtem Nachweis dieser Biomarker in Körperflüssigkeiten wie Blut oder in archivierten Gewebeproben. Schließlich können solche Biomarker, aufgrund der Reversibilität von Methylierungsprozessen, möglicherweise in naher Zukunft auch als neue Zielmoleküle für effiziente Therapien dienen [10, 30].

Korrespondenzadresse

PD Dr. E. Dahl
Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie,
Institut für Pathologie,
Universitätsklinikum Aachen
Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen
edahl@ukaachen.de

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Asirvatham AJ, Schmidt MA, Chaudhary J (2006) Non-redundant inhibitor of differentiation (Id) gene expression and function in human prostate epithelial cells. *Prostate* 66: 921-935
- Beger C, Pierce LN, Kruger M et al. (2001) Identification of *Id4* as a regulator of *BRCA1* expression by using a ribozyme-library-based inverse genomics approach. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 130-135
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S et al. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21: 103-107
- Chan AS, Tsui WY, Chen X et al. (2003) Downregulation of *ID4* by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* 22: 6946-6953
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL et al. (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 22: 2990-2997
- Dahl E, Kristiansen G, Gottlob K et al. (2006) 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* 12: 3950-3960
- De Candia P, Akram M, Benezra R et al. (2006) *Id4* messenger RNA and estrogen receptor expression: inverse correlation in human normal breast epithelium and carcinoma. *Hum Pathol* 37: 1032-1041
- Desprez PY, Sumida T, Coppe JP (2003) Helix-loop-helix proteins in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 225-239
- Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440
- Esteller M, Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196: 1-7
- Fink L, Seeger W, Ermert L et al. (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4: 1329-1333
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S et al. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-9826
- Itahana Y, Singh J, Sumida T et al. (2003) Role of Id-2 in the maintenance of a differentiated and non-invasive phenotype in breast cancer cells. *Cancer Res* 63: 7098-7105
- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-692
- Kleeff J, Ishiwata T, Friess H et al. (1998) The helix-loop-helix protein Id2 is overexpressed in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 58: 3769-3772
- Lin CQ, Singh J, Murata K et al. (2000) A role for Id-1 in the aggressive phenotype and steroid hormone response of human breast cancer cells. *Cancer Res* 60: 1332-1340
- Noetzel E, Veeck J, Niederacher D et al. (2008) Promoter methylation-associated loss of *ID4* expression is a marker of tumour recurrence in human breast cancer. *BMC Cancer* 8: 154
- Norton JD (2000) ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113: 3897-3905
- Perk J, Gil-Bazo I, Chin Y et al. (2006) Reassessment of Id1 protein expression in human mammary, prostate, and bladder cancers using a monospecific rabbit monoclonal anti-id1 antibody. *Cancer Res* 66: 10870-10877

20. Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathology* 8: 138–140
21. Roldan G, Delgado L, Muse IM (2006) Tumoral expression of BRCA1, estrogen receptor alpha and *ID4* protein in patients with sporadic breast cancer. *Cancer Biol Ther* 5: 505–510
22. Shan L, Yu M, Qiu C et al. (2003) *Id4* regulates mammary epithelial cell growth and differentiation and is overexpressed in rat mammary gland carcinomas. *Am J Pathol* 163: 2495–2502
23. Sobin LH, Wittekind C (1997) TNM classification of malignant tumours. Wiley, New York
24. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM et al. (2007) BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 26: 2126–2132
25. Umetani N, Takeuchi H, Fujimoto A et al. (2004) Epigenetic inactivation of *ID4* in colorectal carcinomas correlates with poor differentiation and unfavorable prognosis. *Clin Cancer Res* 10: 7475–7483
26. Umetani N, Mori T, Koyanagi K et al. (2005) Aberrant hypermethylation of *ID4* gene promoter region increases risk of lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Oncogene* 24: 4721–4727
27. Veeck J, Niederacher D, An H et al. (2006) Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene* 25: 3479–3488
28. Welch PL, Lee MK, Gonzalez-Hernandez RM et al. (2002) BRCA1 transcriptionally regulates genes involved in breast tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 7560–7565
29. Wilson JW, Deed RW, Inoue T et al. (2001) Expression of Id helix-loop-helix proteins in colorectal adenocarcinoma correlates with p53 expression and mitotic index. *Cancer Res* 61: 8803–8810
30. Yang X, Yan L, Davidson NE (2001) DNA methylation in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8: 115–127
31. Yokota Y, Mori S (2002) Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* 190: 21–28
32. Yu L, Liu C, Vandeusen J et al. (2005) Global assessment of promoter methylation in a mouse model of cancer identifies *ID4* as a putative tumor-suppressor gene in human leukemia. *Nat Genet* 37: 265–274
33. Zebedee Z, Hara E (2001) Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* 20: 8317–8325