

J. Veeck¹ · E. Breuer¹ · M. Rose¹ · M. Chorovicer¹ · A. Naami¹ · N. Bektas¹ · S. Alkaya¹ · S. von Serényi¹ · F. Horn² · A. Hartmann³ · R. Knüchel¹ · E. Dahl¹

¹ Institut für Pathologie, Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie, Universitätsklinikum Aachen

² Klinik für Frauenheilkunde, Universität Regensburg

³ Pathologisches Institut, Universitätsklinikum Erlangen

Neuer Prognosemarker beim invasiven Mammakarzinom

ITIH5-Expression wird über aberrante Promotormethylierung inaktiviert

Die Bedeutung von Inter- α -Trypsin-Inhibitoren (ITI) in der Karzinogenese epithelialer Tumoren wird zunehmend erkannt. Der ITI-Proteinkomplex, funktionell der Gruppe der Serin-Protease-Inhibitoren vom Kunitz-Typ zugehörig [21], besteht aus einer leichten Kette (Bikunin) sowie einer oder zwei homologen schweren Ketten („heavy chains“, ITIH), die über ein Chondroitinrückgrat kovalent miteinander verknüpft sind [7, 26]. Bikunin stellt eine inhibitorische Komponente für Plasmaproteasen wie Trypsin und Plasmin dar [17], wohingegen die schweren Ketten über eine Veresterung mit Hyaluronsäure zur Integrität und Stabilität der Extrazellulärmatrix (ECM) beitragen [13]. Dabei bewirkt die Bindung von ITIH an Hyaluronsäure, dass diese zu stabilen Fibrillen vernetzen, den sog. „cable-like structures“.

Es wurde bereits herausgefunden, dass eine Bikunin-Überexpression die Tumorzell-Invasion und Metastasierung beim Ovarialkarzinom hemmen kann [16, 17]. Dieser Effekt wird wahrscheinlich durch die direkte Inhibierung von zellassoziierter Plasminaktivität und Suppression von metastasierungsassoziierten Molekülen wie Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren (uPA) und dessen Rezeptor (uPAR)

vermittelt [15]. Neben Bikunin werden auch für die ITIH-Moleküle metastasierungsreprimierende Eigenschaften postuliert. So konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von bestimmten ITIHs die Anzahl der Metastasen in einem Lungenkarzinom-Mausmodell reduziert und des Weiteren die In-vitro-Zelladhäsion erhöht [19].

Bislang waren 4 homologe Gene der ITIH-Familie bekannt (*ITIH1–4*), welche auf Chromosom 3p21 (*ITIH1*, *ITIH3* und *ITIH4*) bzw. Chromosom 10p15 (*ITIH2*) kartieren [6]. *ITIH5* wurde von unserer Gruppe mittels eines bioinformatischen Verfahrens zur Analyse von EST-Datenbanken [22] als neues Mitglied dieser Genfamilie identifiziert. Das *ITIH5*-Gen, lokalisiert auf Chromosom 10p15, kodiert für ein Polypeptid bestehend aus 942 Aminosäuren (AS) und enthält als ITIH-typische Proteindomäne eine „Vault-Protein-Inter- α -Trypsin- (VIT-)Sequenz“. Außerdem enthält es eine konservierte Protease-Spaltstelle (D\PHFVV) im C-terminalen Segment und ein 18 AS langes N-terminales Signalpeptid, welches die Sekretion in den Extrazellulärraum ermöglicht [12]. Wir konnten *ITIH5* aus humanem Brustnormalgewebe klonieren und seine Be-

deutung im humanen Mammakarzinom erstmals charakterisieren [12].

In vorangegangenen Untersuchungen fanden wir, dass *ITIH5*-mRNA in Plazentagewebe und normalen Brustgeweben stark exprimiert, in einer hohen Anzahl primärer Mammakarzinome jedoch deutlich herabreguliert wird. Eine darauf aufbauende systematische Expressionsanalyse aller 5 ITIH-Gene in verschiedenen humanen Tumorentitäten bestätigte den hohen Expressionsverlust von *ITIH5*-mRNA im Mammakarzinom (52%) und zeigte darüber hinaus einen vergleichbar hohen Verlust anderer Mitglieder der ITIH-Familie, insbesondere *ITIH2* und *ITIH3* im Mammakarzinom, sowie *ITIH2*, *ITIH3* und *ITIH4* im Kolon-, Magen- und Lungenkarzinom [11]. Somit stellt diese Genfamilie eine interessante Targetklasse für tiefere Untersuchungen der humanen Tumorgenese dar.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Rolle von *ITIH5* im humanen Mammakarzinom weiter aufzudecken. Dazu sollte zum einen die *ITIH5*-Proteinexpression quantifiziert und zum anderen die molekulare Ursache für den Expressionsverlust entschlüsselt werden. Parallel dazu wurde die biologische Funktion des Moleküls in zellkultur-basierten Experimenten un-

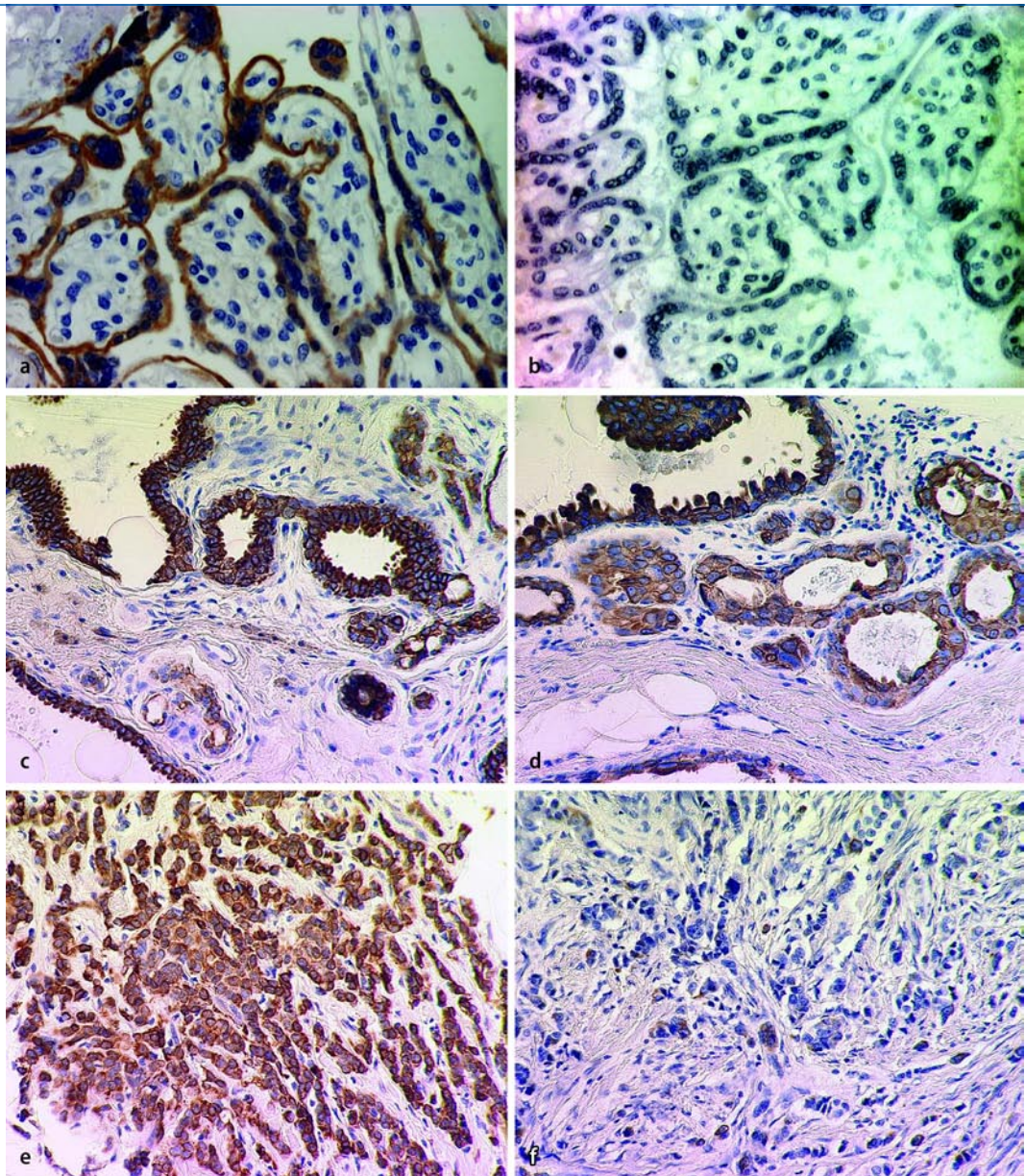


Abb. 1 ▶ *ITIH5*-Expression in verschiedenen Geweben. **a** Positivkontrolle, humane Plazenta, **b** Negativkontrolle, humane Plazenta. **c** Normales Brustgewebe zeigt eine starke *ITIH5*-Färbung in luminalen Epithelien. Starke *ITIH5*-Expression in duktalem In-situ-Karzinom (**d**) sowie in invasiv-duktalem Karzinom (**e**). **f** Invasiv-duktales Karzinom ohne detektierbare *ITIH5*-Expression (**a–f** Vergr. 400:1)

tersucht. Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse den Schluss zu, dass *ITIH5* ein für die Tumorforschung diagnostisch und therapeutisch äußerst interessantes Molekül darstellt, welches an der Metastasierung des Mammakarzinoms maßgeblich beteiligt sein könnte.

Methoden

Tissue-Microarray (TMA)

Die *ITIH5*-Proteinexpression wurde mittels eines TMA bestimmt, der aus 217 invasiv-duktalem Karzinomen, 10 duktalem In-situ-Karzinomen und 15 Brust-Normalgeweben konstruiert war [5]. Klinische Da-

ten waren für alle 217 Fälle vorhanden und enthielten eine mediane Nachbeobachtungszeit von 78 Monaten (0–148 Monate).

Immunhistochemie

Für die *ITIH5*-Proteinfärbung des TMA wurde das Envision-System nach Herstellerangaben verwendet (Fa. DAKO, Hamburg). Die Antigendemaskierung erfolgte durch eine Vorbehandlung in Zitratpuffer (pH 6) in einem Mikrowellenofen für 30 min (700 W). Der TMA wurde 1 h mit einem proprietären, polyklonalen *ITIH5*-Primärantikörper inkubiert (1:200; Fa. Eurogentec, Herstal, Belgien), gewa-

schen und dann für 10 min mit einem Sekundärantikörper inkubiert (Biotinylated Polylink; Fa. Biocarta, Hamburg). AEC-Chromogen-Substrat (Fa. Biocarta, Hamburg) wurde für die Antikörperdetektion verwendet. Die Färbungsintensität wurde von erfahrenen Mammopathologen (A.N. und N.B.) nach dem System von Remmele u. Stegner [20] bewertet. Plazentales Gewebe weist eine starke *ITIH5*-Expression auf [12] und diente als Positivkontrolle (■ **Abb. 1a**). In Negativkontrollen wurde der *ITIH5*-Antikörper nicht appliziert. Als Negativkontrolle wurde humane Plazenta verwendet (■ **Abb. 1b**).

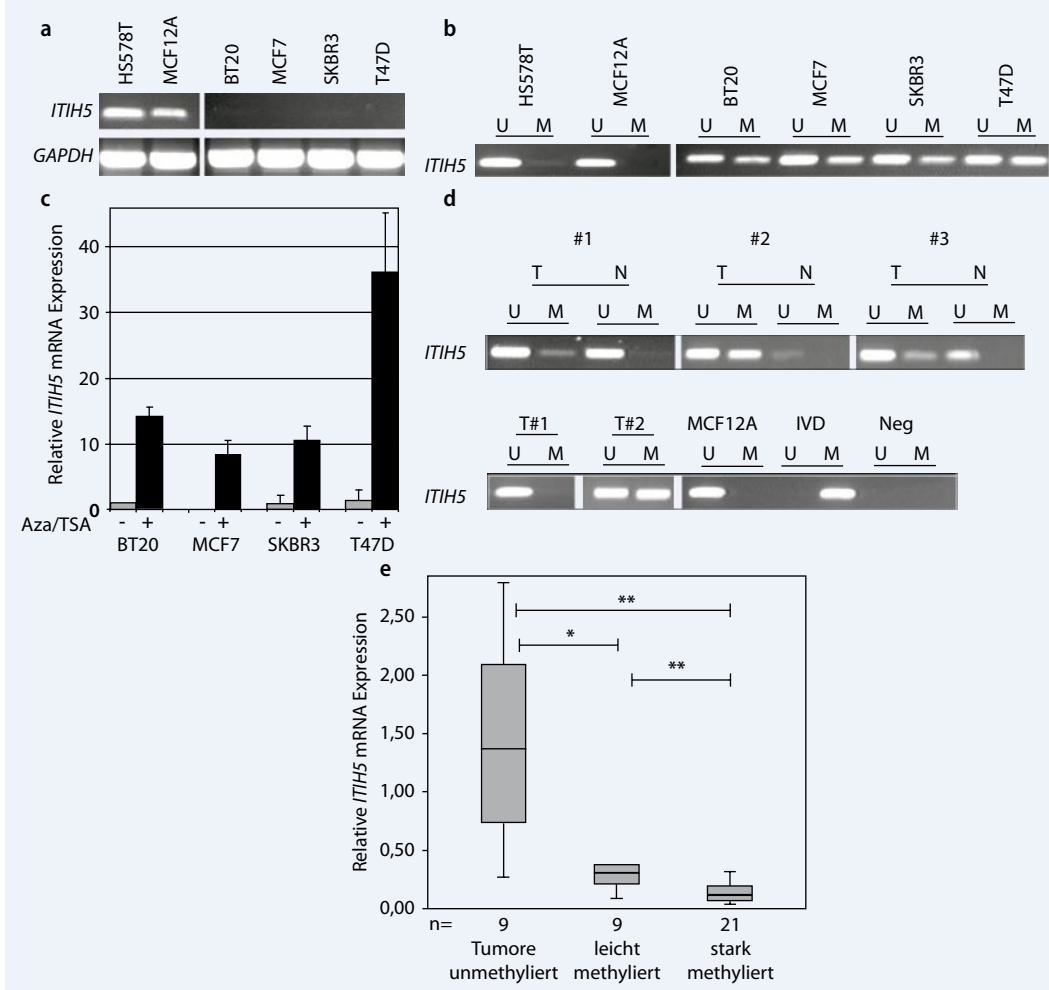


Abb. 2 ▲ *ITIH5*-mRNA-Expression wird durch Promotormethylierung reprimiert. **a** *ITIH5*-mRNA-Expression in Brust-Zelllinien: in Hs578T und MCF12A nachweisbar, nicht jedoch in den malignen BT20, MCF7, SKBR3 und T47D. **b** MSP-Ergebnisse: Zelllinien ohne *ITIH5*-Expression weisen eine Methylierung im *ITIH5*-Promotor auf (M-Bande, M Methylierung), während *ITIH5* exprimierende Zelllinien eine unmethylierte Promotorsequenz tragen (U-Bande, U Unmethylierung). **c** Nach In-vitro-DNA-Demethylierungs-Behandlung starke Reexpression (schwarze Balken) von *ITIH5*-mRNA in Zelllinien, welche *ITIH5* vorher nicht exprimierten (graue Balken). **d** Repräsentative *ITIH5*-MSP-Ergebnisse primärer Mammakarzinome. Brust-Normalgewebe (N): ausschließlich unmethylierte *ITIH5*-Promotorsequenz, primäre Brust-Tumoren (T): zumeist methylierter *ITIH5*-Promotor. IVD in vitro methylierte DNA (Positivkontrolle); Neg Wasserkontrolle. **e** Gruppierung von 39 Tumoren mit verschieden stark methyliertem *ITIH5*-Promotor mit korrespondierender *ITIH5*-mRNA-Expression. Signifikante Korrelation zwischen Stärke der *ITIH5*-Methylierung und Stärke des Expressionsverlusts. Schwarze Horizontalen Mediane der jeweiligen Gruppen. (Mit freundl. Genehmigung aus [24])

Kryokonservierte Patientenproben

Für *ITIH5*-Methylierungs- und -mRNA-Expressionsanalysen wurden 171 Mammakarzinomproben aus verschiedenen Kliniken für Gynäkologie (Aachen, Jena und Regensburg) sowie 10 gepaarte Brust-Normalgewebe zur Verfügung gestellt. In jedem Fall lag eine Einverständniserklärung der Patientin über die Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke vor („informed consent“). Das Gewebematerial wurde sofort nach Resektion in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der An-

teil an Tumorzellen in den Proben wurde mittels HE-Färbung bestimmt, nur solche Proben mit einem Anteil von über 70% Tumorzellen wurden weiter verwendet. Für Normalgewebe war ein Epithelanteil von über 30% erforderlich.

Nukleinsäure-Extraktionen

DNA-Präparationen aus Brust-Zelllinien und humanem Gewebe wurde unter Verwendung des QiAmp-DNA-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) und den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen gewon-

nen. RNA-Präparationen wurden entsprechend dem TRIzol-Verfahren nach Herstellerangaben durchgeführt (Fa. Invitrogen, Carlsbad/CA).

Reverse Transkription und PCR (RT-PCR)

Hierbei wurde 1 µg Gesamt-RNA mit dem Promega-Reverse-Transcription-System (Fa. Promega, Madison/WI) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Um die cDNA-Ausbeute zu erhöhen, wurden Oligo-dT und Hexamer-Zufallspr-

mer (pdN₆) im Verhältnis 1:2 gemischt. 1 µl cDNA (20 ng) wurden in die PCR-Reaktion eingesetzt. Dabei kamen folgende Primer zum Einsatz: *GAPDH* 5'-sense: 5'-TGG TCA CCA GGG CTG CTT-3'; 3'-antisense: 5'-GTCTTC TGG GTG GCA GTG AT-3' mit einer Produktgröße von 510 bp. *ITIH5* 5'-sense: 5'-GCA ACG ACG TGG ACT TCA-3'; 3'-antisense: 5'-GGG GTC CTG ATT TCA TCG TA-3' mit einer Produktgröße von 107 bp. Die PCR-Reaktion wurde als Hotstart-PCR durchgeführt. Die Hybridisierungstemperatur für beide Primer-Sets betrug 60°C, die Zyklenanzahl der PCR betrug 35.

Semiquantitative Echtzeit-PCR

Die Echtzeit-PCR wurde mit dem Light-Cycler-System (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) unter Verwendung intronüberspannender Primer nach Herstellerangaben wie beschrieben durchgeführt [23]. Das Haushaltsgen *GAPDH* diente dabei als Referenzgen. Die verwendeten Primer waren wie folgt: *GAPDH* 5'-sense: 5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT CA-3'; 3'-antisense: 5'-AAT GAA GGG CTC ATT GAT GG-3' mit einer Produktgröße von 108 bp. *ITIH5* 5'-sense: 5'-GGG TGC CCC AAT TAA CTC TC-3'; 3'-antisense: 5'-TCA CCG TGT GCT TCA ACA TT-3' mit einer Produktgröße von 87 bp. Die Hybridisierungstemperatur für beide Primer-Sets betrug 60°C. Die relative mRNA-Quantifizierung erfolgte mittels komparativer C_T-Methode im Vergleich zur *GAPDH*-Expression [8].

Bisulfit-Modifikation und Methylierungsspezifische PCR (MSP)

Es wurde 1 µg genomischer Zelllinien-, Tumor- und Mamma-Normalgewebe-DNA mittels des EZ-DNA-Methylierungs-Kit bisulfitmodifiziert (Fa. Zymo Research, Orange/CA). Das DNA-Präzipitat wurde in 20 µl TE-Puffer eluiert. Für die MSP wurde 1 µl modifizierte DNA eingesetzt und unter Verwendung eines optimierten PCR-Puffers [9] amplifiziert. MSP-Primer, die spezifisch die unmethylierte *ITIH5*-Promotorsequenz erkennen, waren 5'-TTG GTG ATA GAA ATT AAG TAA GTT TGT-3' (sense) und 5'-AAA ACC ACC TAT ATT AAC CCC ACA-3'

Pathologe 2008 · [Suppl 2] 29:338–346 DOI 10.1007/s00292-008-1044-9
© Springer Medizin Verlag 2008

J. Veeck · E. Breuer · M. Rose · M. Chorovicer · A. Naami · N. Bektas · S. Alkaya · S. von Serényi · F. Horn · A. Hartmann · R. Knüchel · E. Dahl

Neuer Prognosemarker beim invasiven Mammakarzinom. *ITIH5*-Expression wird über aberrante Promotormethylierung inaktiviert

Zusammenfassung

ITIH5 ist ein kürzlich von uns neu charakterisiertes Extrazellulärmatrix-Protein, dessen Expression in einer Vielzahl von humanen Tumorentitäten, wie z. B. dem Mammakarzinom, deutlich herabreguliert wird. Ziel der vorliegenden Studie war es, die molekulare Ursache des *ITIH5*-Expressionsverlusts beim Brustkrebs zu entschlüsseln und mehr über die Rolle dieses Moleküls bei Tumorerkrankungen zu lernen. Wir zeigen, dass das *ITIH5*-Protein bei 42% aller invasiven Mammakarzinome herabreguliert wird und dieses signifikant mit einem verkürzten Überleben der Patientinnen assoziiert ist. Sowohl in Brust-Zelllinien als auch in primären Mammakarzinomen (40%) konnten wir eine frequente Methylierung des *ITIH5*-Promotors detektieren,

welche funktionell mit einem *ITIH5*-mRNA-Verlust assoziiert war. Daneben zeigte auch die *ITIH5*-Promotormethylierung ein signifikant verkürztes Überleben der Patientinnen an und war zusätzlich assoziiert mit Eigenschaften der Lymphknoten- und Fernmetastasierung. Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass *ITIH5* einen neuen Metastasierungsrepressor des Mammakarzinoms darstellt, dessen Proteinverlust und Promotormethylierung zukünftig als prognostische Biomarker genutzt werden könnten.

Schlüsselwörter

Inter- α -Trypsin-Inhibitor-5 Heavy Chain (*ITIH5*) · Mammakarzinom · Metastasierungsrepressor · Epigenetik · Prognostischer Marker

Novel prognostic marker in invasive breast cancer. *ITIH5* expression is abrogated by aberrant promoter methylation

Abstract

We have recently characterized *ITIH5* as a new extracellular matrix protein that exhibits clear expression loss in a variety of human tumour entities, including breast cancer. The aim of the present study was to decipher the molecular cause of *ITIH5* expression loss in breast cancer and to learn more about the possible role of this molecule in cancer diseases. *ITIH5* protein expression was found to be strongly reduced in 42% of invasive breast carcinomas—interestingly, with significant association with poor patient outcome. *ITIH5* promoter methylation was frequently detected in breast cell lines and in primary carcinomas (40%), and it was functionally correlated with loss of *ITIH5* mRNA expression. More-

over, *ITIH5* promoter methylation was also significantly associated with poor clinical patient outcome and also with the occurrence of lymph node and distant metastases. In conclusion, we propose that *ITIH5* may represent a novel metastasis repressor in human breast cancer. Both *ITIH5* protein expression and *ITIH5* promoter methylation may serve as prognostic biomarkers, thereby helping improve clinical patient outcome.

Keywords

Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 5 (*ITIH5*) · Breast cancer · Metastasis repressor · Epigenetics · Prognostic marker

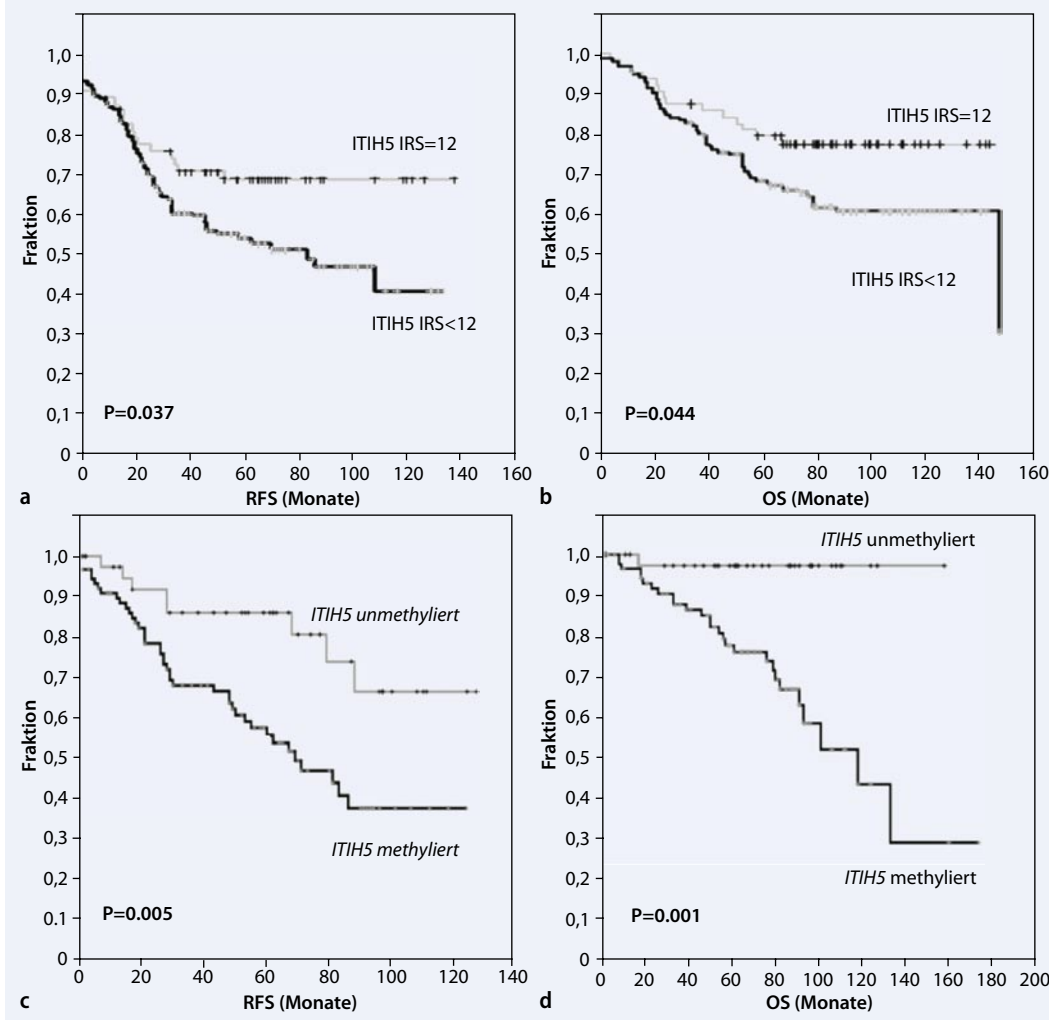


Abb. 3 ◀ Klinische Relevanz der *ITIH5*-Proteinexpression und *ITIH5*-Promotormethylierung im Mammakarzinom. **a, b** Univariate Kaplan-Meier Analyse: Patientinnen mit starker *ITIH5*-Expression (*graue Kurve*) haben ein signifikant längeres rezidivfreies (RFS, **a**) und Gesamtüberlebensintervall (OS, **b**) als Patientinnen mit reduzierter *ITIH5*-Expression (*schwarze Kurve*). Schlechtere Prognose des RFS (**c**) und OS (**d**) bei *ITIH5*-Promotormethylierung in einem anderen Kollektiv primärer Mammakarzinome. (Mit freundl. Genehmigung aus [24])

(*antisense*) mit einem 220-bp-Produkt. Spezifische Primer für die methylierte *ITIH5*-Promotorsequenz waren 5'-TTG GCG ATA GAA ATT AAG TAA GTT C-3' (*sense*) und 5'-AAC CAC CTA TAT TAA CCC CAC G-3' (*antisense*) und ergeben ein 218-bp-Produkt. Die Reaktion enthielt jeweils 400 nM des spezifischen Primerpaars und 1,25 mM der einzelnen dNTPs. Die PCR wurde als Hotstart-PCR durchgeführt und bei 80°C bis zur Zugabe von 1,25 Einheiten *Taq*-DNA-Polymerase (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim) gehalten. Die PCR-Bedingungen waren: 95°C für 5 min, 35 Zyklen von 95°C für 30 s, 56°C für 30 s, 72°C für 30 s und 72°C für 5 min. PCR-Amplifikate wurden auf 3% Low-range-ultra-Agarose (Fa. Bio-Rad Laboratories, Hercules/CA) mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert.

In-vitro-Demethylierung genomischer DNA

Tumor-Zelllinien wurden in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/cm² am Tag 0 in einer 6-Well-Schale ausgesät. Das demethylierende Agens 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza, Fa. Sigma-Aldrich, Deisenheim) wurde in einer finalen Konzentration von 1 µM am Tag 1, 2 und 3 hinzugeben. Zusätzlich wurde 300 nM des Histon-Deacetylase-Inhibitors Trichostatin A (TSA) an Tag 3 hinzugegeben. Die Zellen wurden nach jeder Behandlung mit frischem Medium kultiviert und am Tag 4 für die RNA-Extraktion geerntet.

Stabile Transfektion

Auf Basis des pBK-CMV-Vektors wurde ein Expressionsplasmid konstruiert, welches die kodierende Sequenz des *ITIH5*-Gens trägt (kloniert aus humanem

Brustgewebe, Genbank-Zugangs-Nr: AY2384379). Die Transfektion von Mammakarzinom-Zelllinien erfolgte mittels des jetPEI-Reagenz (Fa. Biomol GmbH, Hamburg) wie beschrieben [12].

Funktionelle Experimente

Zur Proliferationsbestimmung wurden stabil transfizierte MDA-MB231-Zellen, welche keine endogene *ITIH5*-Expression aufweisen, und mit Leervektor transfizierte Kontrollzellen in 96-Well-Schalen ausgesät (1×10^3 Zellen/Well), und an 4 aufeinander folgenden Tagen ein XTT-Assay durchgeführt (Fa. Biological Industries, Frankfurt).

Statistische Methoden

Für statistische Analysen wurde die Software SPSS 14.0 verwendet (SPSS Software GmbH, München). Statistische Signifi-

kanz war ab einem p-Wert <0,05 gegeben. Alle statistischen Tests wurden 2-seitig durchgeführt. Ein nichtparametrischer Mann-Whitney-U-Test wurde für die Unterschiedlichkeit in Expressionsstärken zwischen 2 Gruppen angewendet. Unterschiede in mehr als 2 Gruppen wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests untersucht. Assoziationen zwischen klinikopathologischen Faktoren und molekularen Parametern wurden mittels des deskriptiven Fisher-Exakt-Tests untersucht. Rezidivfreies („recurrence-free survival“, RFS) und Gesamtüberleben („overall survival“, OS) in Beziehung zu pathologischen oder molekularen Parametern wurden univariat nach der Methode von Kaplan-Meier (Log-Rank-Test) und multivariat mittels Cox-Regression analysiert.

Ergebnisse

Verlust der *ITIH5*-Proteinexpression im humanen Mammakarzinom

Das *ITIH5*-Protein war deutlich exprimiert in 11 von 15 (73%) Brust-Normalgewebe mit einer membranär-zytoplasmatischen Färbung luminal-epithelialer Zellen. In Myoepithelien, Endothelien, Fibroblasten und Adipozyten war das Protein nicht exprimiert (■ **Abb. 1c**). Duktale In-situ-Karzinome zeigten in allen Fällen (n=10) eine ähnlich starke *ITIH5*-Expression wie Brust-Normalgewebe (■ **Abb. 1d**). 64 invasive Tumoren (30%) zeigten eine starke *ITIH5*-Expression (IRS=12; ■ **Abb. 1e**), welche median über der Expression der Normalgewebe lag. In weiteren 61 Fällen (28%) war die *ITIH5*-Proteinexpression moderat reduziert (IRS=3–9). Bei der 92 von 217 invasiven Karzinomen (42%) war die *ITIH5*-Expression jedoch stark reduziert bzw. gänzlich verloren (IRS≤2; ■ **Abb. 1f**).

Methylierung des *ITIH5*-Promotors in Brust-Zelllinien und primären Brusttumoren

Um die Frage zu klären, ob epigenetische Mechanismen, wie z. B. aberrante Promotormethylierung, für den Verlust der *ITIH5*-Expression im Mammakarzinom verantwortlich sind, wurden zuerst Brust-Zelllinien auf ihre *ITIH5*-mRNA-Expres-

Tab. 1 Multivariate Cox-Regressionsanalyse von rezidivfreiem und Gesamtüberleben im Verhältnis zur *ITIH5*-Proteinexpression

Kollektiv 1 n=217	Rezidivfreies Überleben				Gesamtüberleben			
	p-Wert	HR	95%-Konfidenzintervall		p-Wert	HR	95%-Konfidenzintervall	
			Untere	Obere			Untere	Obere
<i>ITIH5</i> -Protein	0,192	0,66	0,35	1,24	0,407	0,75	0,38	1,48
pT	0,020	2,01	1,11	3,62	0,015	2,13	1,16	3,93
G	0,012	2,08	1,17	3,67	0,057	1,76	0,98	3,13
pN	0,001	2,91	1,56	5,45	0,003	2,98	1,46	6,05
ER/PR	0,080	0,61	0,35	1,06	0,025	0,50	0,27	0,92

pT Tumorgroße pT1/pT2 vs. pT3/pT4; G Grad 1/2 vs. Grad 3; pN nodal-negativ vs. nodal-positiv; ER/PR Östrogen-/Progesteronrezeptor beide negativ (immunreaktiver Score ≤2; [20]) vs. einer/beide positiv. HR Hazard-Ratio, **Fettdruck** signifikante Werte.

Tab. 2 Multivariate Cox-Regressionsanalyse von rezidivfreiem und Gesamtüberleben im Verhältnis zur *ITIH5*-Promotormethylierung

Kollektiv 2 n=171	Rezidivfreies Überleben				Gesamtüberleben			
	p-Wert	HR	95%-Konfidenzintervall		p-Wert	HR	95%-Konfidenzintervall	
			Untere	Obere			Untere	Obere
<i>ITIH5</i> -Methylierung	0,132	1,89	0,82	4,34	0,035	9,02	1,17	69,46
pT	0,321	1,51	0,67	3,42	0,713	1,25	0,37	4,22
G	0,019	2,28	1,14	4,54	0,005	5,26	1,66	16,61
pN	0,432	1,36	0,63	2,91	0,487	1,48	0,49	4,49
ER/PR	0,643	0,85	0,44	1,66	0,041	0,37	0,14	0,96

pT Tumorgroße pT1/pT2 vs. pT3/pT4; G Grad 1/2 vs. Grad 3; pN nodal-negativ vs. nodal-positiv; ER/PR Östrogen-/Progesteronrezeptor beide negativ (immunreaktiver Score ≤2; [20]) vs. einer/beide positiv. HR Hazard-Ratio, **Fettdruck** signifikante Werte.

sion und ihre epigenetische Konfiguration des *ITIH5*-Promotors hin untersucht. Ein RT-PCR-Experiment zeigt, dass die malignen Zelllinien BT20, MCF7, SKBR3 und T47D *ITIH5*-mRNA nicht exprimieren, die Expression in Hs578T und MCF12A jedoch nachweisbar ist (■ **Abb. 2a**). Die Ergebnisse der korrespondierenden MSP zeigen, dass solche Zelllinien ohne *ITIH5*-Expression eine Methylierung im *ITIH5*-Promotor aufweisen (M-Bande, ■ **Abb. 2b**). Diese Bande ist spezifisch für Methylierung und bei den malignen Zelllinien BT20, MCF7, SKBR3, T47D und MDA-MB231 mit ihren methylierten *ITIH5*-Allelen erkennbar. Hs578T- und MCF12A-Zellen weisen eine exklusive Bande in der Reaktion mit Primern auf, die spezifisch für unmethylierte DNA ist. Demnach liegt in diesen Zellen keine Methylierung des *ITIH5*-Promotors vor, und es ergibt sich eine Kohärenz von *ITIH5*-

Methylierung und mRNA-Expressionsverlust.

Um diesen Zusammenhang auch funktionell nachzuweisen, wurden 4 Zelllinien einer In-vitro-DNA-Demethylierungs-Behandlung mit AZA/TSA unterzogen und anschließend die *ITIH5*-Expression bestimmt. In ■ **Abb. 2c** ist zu erkennen, dass nach der Demethylierung des *ITIH5*-Promotors die mRNA-Expression des Gens signifikant anstieg (p=0,014). Bei insgesamt 171 untersuchten primären Mammakarzinomen fanden wir einen stark methylierten *ITIH5*-Promotor in 68 Fällen (40%), leichte Methylierungssignale waren in weiteren 48 Fällen (28%) detektierbar (■ **Abb. 2d**). Lediglich 55 Patientinnen (32%) wiesen einen unmethylierten *ITIH5*-Promotor auf. Mit einer Ausnahme war in allen gepaarten Brust-Normalgeweben der *ITIH5*-Promotor unmethyliert.

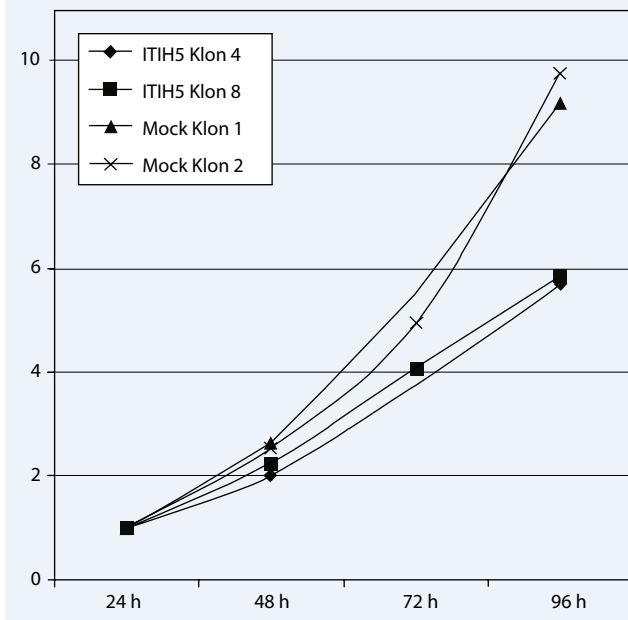


Abb. 4 ◀ *ITIH5*-Verlust bedingt einen progressiven Phänotyp in MDA-MB231-Brustkrebszellen. Die Proliferationsrate von stabil transfizierten MDA-MB231-Zellen wird durch *ITIH5*-Expression um etwa 40% gesenkt (Klon 4, 8) im Vergleich zu Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden (Mock-Klon 1, 2). (Mod. nach [24])

Korrelation der *ITIH5*-mRNA-Expression mit der *ITIH5*-Promotormethylierung

Um einen direkten Zusammenhang von *ITIH5*-mRNA-Expression und *ITIH5*-Promotormethylierung auf Basis primärer Tumoren nachzuweisen, wurde eine parallele Analyse durchgeführt. Für 39 zufällig ausgewählte Mammakarzinomfälle des Kollektivs wurde die *ITIH5*-mRNA-Expression mittels Echtzeit-PCR bestimmt und mit dem Methylierungsstatus verglichen. In **Abb. 2e** ist erkennbar, dass die *ITIH5*-Expressionsstärke in den 3 Gruppen „unmethyliert“, „leicht methyliert“ und „stark methyliert“ deutlich unterschiedlich vorliegt. Vergleicht man den Unterschied der Mediane der 3 Gruppen, so zeigt sich statistische Signifikanz und somit eine starke Assoziation von *ITIH5*-Promotormethylierung mit *ITIH5*-mRNA-Expressionsverlust. Anders formuliert: Die Gruppierung von 39 Tumoren mit unmethyliertem, leicht methyliertem und stark methyliertem *ITIH5*-Promotor mit der korrespondierenden *ITIH5*-mRNA-Expression zeigt, dass eine signifikante Korrelation zwischen der Stärke der Methylierung und der Stärke des Expressionsverlusts besteht.

Korrelation mit klinikopathologischen Faktoren und Patientenüberleben

ITIH5-Proteinexpression

Die *ITIH5*-Proteinexpression war signifikant assoziiert mit der Östrogenrezeptor- (ER-)Positivität ($p=0,008$) und niedriggradigem Tumor ($p=0,024$). Darüber hinaus lag keine Assoziation mit Tumorgöße, Nodal-Status, Progesteronrezeptor- (PR-)Positivität, p53-Positivität oder Her2-Status vor. Rezidivfreies (RFS) und Gesamtüberleben (OS) wurde univariat verglichen zwischen Patientinnen mit starker *ITIH5*-Expression (IRS=12) und solchen mit *ITIH5*-Expressionsverlust (IRS=0–9). Demnach war ein Expressionsverlust signifikant sowohl mit verkürztem RFS assoziiert [starke Expression: mittleres RFS 102 Monate; 95%-Konfidenzintervall (KI) 88–116; Expressionsverlust: 78 Monate; 95%-KI 68–88; $p=0,037$] als auch mit verkürztem OS assoziiert (starke Expression: 120 Monate; 95%-KI 108–132; Expressionsverlust: 105 Monate; 95%-KI 96–114; $p=0,044$) (**Abb. 3a, b**). In einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse für RFS und OS erreichte die *ITIH5*-Expression als unabhängiger prognostischer Marker jedoch nicht statistische Signifikanz (**Tab. 1**).

ITIH5-Promotormethylierung

Analog zur Proteinexpression wurde die Promotormethylierung auf klinisch relevante Assoziationen hin untersucht. Ein methylierter *ITIH5*-Promotor war signifikant mit positivem Nodal-Status ($p=0,003$), positivem Fernmetastasen-Status ($p=0,047$), sowie höherer Anzahl befallener Lymphknoten ($p=0,006$) assoziiert, darüber hinaus aber nicht mit Tumorgöße, histologischem Grad, ER- oder PR-Status. In der univariaten Überlebensanalyse war die *ITIH5*-Promotormethylierung sowohl mit verkürztem RFS (unmethyliert: 100 Monate; 95%-KI 86–115; methyliert: 72 Monate; 95%-KI 61–83; $p=0,005$) als auch mit verkürztem OS (unmethyliert: 154 Monate; 95%-KI 147–162; methyliert: 111 Monate; 95%-KI 93–129; $p=0,001$) signifikant assoziiert (**Abb. 3c, d**). Neben der reduzierten Proteinexpression (**Abb. 3a, b**) konnte also auch im Falle der *ITIH5*-Promotormethylierung in einem weiteren, unabhängigen Kollektiv primärer Mammakarzinome eine schlechtere Prognose des RFS und OS gezeigt werden (**Abb. 3c, d**). Multivariat war die *ITIH5*-Methylierung ein unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben (Hazard-Ratio: 9,0; $p=0,035$; **Tab. 2**).

Funktionelle In-vitro-Experimente zur *ITIH5*-Biologie

Abschließend sollten erste funktionelle Experimente die Frage beantworten, ob ein Verlust von *ITIH5*-Expression einen progressiven Phänotyp bedingen kann. Versuche zur Proliferation zeigten, dass die forcierte Expression von *ITIH5* in MDA-MB231-Zellen, welche keine endogene *ITIH5*-Expression aufweisen, die Wachstumsrate um etwa 40% senkt (**Abb. 4**). Die spezifische *ITIH5-w*Proteinexpression der stabil transfizierten Zellen wurde vor Versuchsbeginn mittels Immunoblot, immunzytochemischer und immunfluoreszenter Färbung überprüft [24]. Diese Versuche wurden mit einer weiteren transient transfizierten Brust-Zelllinie wiederholt, welche *ITIH5* bereits basal exprimiert (Hs578T), und sie erbrachten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Diskussion

Bereits seit einigen Jahren ist eine Beteiligung von extrazellulären ITI-Molekülen an verschiedenen pathologischen Prozessen bekannt. Diese reicht von der Entstehung von Nierensteinen [1] und Atherosklerose [18] über weibliche Infertilität [27] und Gewebe-Inflammation [3] bis hin zur Tumorgenese, wo diese Korrelation insbesondere in Metastasierungsprozessen und der Tumorprogression gezeigt werden konnte [4, 14, 15, 19, 25]. In vorangegangenen Arbeiten haben wir *ITIH5* als neues Mitglied der Gen-Familie der ITI mit schweren Ketten (ITIHs) identifiziert und gezeigt, dass die *ITIH5*-mRNA-Expression im humanen Mammakarzinom häufig herabreguliert wird [11, 12]. In der vorliegenden Studie mit mehr als 200 Tumoren konnten wir diese differenzielle *ITIH5*-mRNA-Expression auf Proteinebene bestätigen.

Darüber hinaus stellten wir fest, dass der Verlust der Expression erst nach der Stufe des duktales In-situ-Karzinoms stattfindet. Demnach könnte der Verlust von ITIH5 eine Rolle in der Tumorprogression des humanen Mammakarzinoms tragen, indem dieser die Transition von nichtinvasiven zu invasiven Tumoren begünstigt. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass Patientinnen, die ITIH5 verloren haben, ein signifikant verkürztes rezidivfreies- und Gesamtüberleben aufzeigen. Somit könnte die ITIH5-Proteinexpression beim Mammakarzinom als prognostischer Biomarker dienen, der möglicherweise Hochrisiko-Patientinnen von solchen mit sehr guter Prognose (ITIH5-positive) unterscheiden hilft.

Von den 5 bekannten ITIH-Genen trägt *ITIH5* als einziges Gen einen Promotor mit hoher CpG-Dichte, somit vermuteten wir aberrante Promotormethylierung als möglichen molekularen Mechanismus für den Expressionsverlust im Mammakarzinom. Sowohl in malignen Brust-Zelllinien als auch in einer hohen Anzahl primärer Tumoren detektierten wir tatsächlich eine *ITIH5*-Promotormethylierung mit statistischer und funktioneller Assoziation zu einem *ITIH5*-mRNA-Expressionsverlust. Interessanterweise war die *ITIH5*-Methylierung im Tumor signifikant häufiger bei Patientinnen mit regi-

onärer Lymphknoteninvasion und distaler Metastasierung zu finden. Zusätzlich zum Verlust der Proteinexpression trägt auch die Methylierung des *ITIH5*-Promotors starke negative prognostische Kraft, was zusammen genommen die Hypothese unterstützt, ITIH5 als neuen Metastasierungsrepressor beim Mammakarzinom anzusehen.

Eine epigenetische Inaktivierung von Adhäsions- und Zell-Matrix-Molekülen in der Tumorgenese ist erst für wenige Beispiele bekannt, so. z. B. für E-Cadherin [10] oder TIMP3 [2]. ITIH5 kann funktionell zu dieser Gruppe gezählt werden, in welcher Proteinverluste maßgeblich die Zelladhäsion, Migration und proteolytische Aktivität von ECM-Komponenten beeinflussen, so dass die Entstehung eines invasiven Karzinoms aus nichtinvasiven Präkanzerosen begünstigt wird. Unsere funktionellen Experimente untermauern diese Annahme: Ein Verlust von ITIH5 fördert einen schnell proliferierenden Phänotyp in malignen Brust-Zelllinien. Dies spricht zusammen mit der starken prognostischen Kraft des Moleküls sowohl auf Expressions- als auch auf Promotormethylierungsebene und der Assoziation zu klinischen Parametern wie Metastasierung stark für die Funktion eines Tumorsuppressorgens bzw. eines Metastasierungsrepressors.

Fazit für die Praxis

Zusammenfassend deuten unsere Studien darauf hin, dass ITIH5 einen neuen, äußerst interessanten prognostischen Biomarker des Mammakarzinoms darstellt, dessen diagnostisches und therapeutisches Potenzial wir in den nächsten Jahren aufklären werden.

Korrespondenzadresse

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

Interessenkonflikt. Alle Autoren erklären hiermit, dass keine Interessenkonflikte bezüglich des vorliegenden Manuskripts bestehen.

Literatur

1. Atmani F, Khan SR (1999) Role of inter-alpha-inhibitor and its related proteins in urolithiasis. Purification of an inter-alpha inhibitor related protein from the bovine kidney. *Urol Res* 27: 57–61
2. Bachman KE, Herman JG, Corn PG et al. (1999) Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 59: 798–802
3. Balduyck M, Albani D, Jourdain M et al. (2000) Inflammation-induced systemic proteolysis of inter-alpha-inhibitor in plasma from patients with sepsis. *J Lab Clin Med* 135: 188–198
4. Bourguignon J, Borghi H, Sesboue R et al. (1999) Immunohistochemical distribution of inter-alpha-trypsin inhibitor chains in normal and malignant human lung tissue. *J Histochem Cytochem* 47: 1625–1632
5. 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
6. Diarra-Mehrpour M, Bourguignon J, Sesboué R et al. (1989) Human plasma inter-alpha-trypsin inhibitor is encoded by four genes on three chromosomes. *Eur J Biochem* 179: 147–154
7. Enghild JJ, Salvesen G, Hefta SA et al. (1991) Chondroitin 4-sulfate covalently cross-links the chains of the human blood protein pre-alpha-inhibitor. *J Biol Chem* 266: 747–751
8. Fink L, Seeger W, Erment L et al. (1998) Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* 4: 1329–1333
9. Galm O, Herman JG (2005) Methylation-specific polymerase chain reaction. *Methods Mol Med* 113: 279–291
10. Graff JR, Herman JG, Lapidus RG et al. (1995) E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res* 55: 5195–5199
11. Hamm A, Veeck J, Bektas N et al. (2008) Frequent expression loss of Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain (ITIH) genes in multiple human solid tumors: a systematic expression analysis. *BMC Cancer* 8: 25
12. Himmelfarb M, Klopocki E, Grube S et al. (2004) ITIH5, a novel member of the inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Lett* 204: 69–77
13. Huang L, Yoneda M, Kimata K (1993) A serum-derived hyaluronan-associated protein (SHAP) is the heavy chain of the inter alpha-trypsin inhibitor. *J Biol Chem* 268: 26725–26730
14. Kobayashi H, Gotoh J, Hirashima Y et al. (1995) Inhibitory effect of a conjugate between human urokinase and urinary trypsin inhibitor on tumor cell invasion in vitro. *J Biol Chem* 270: 8361–8366
15. Kobayashi H, Shinohara H, Fujie M et al. (1995) Inhibition of metastasis of Lewis lung carcinoma by urinary trypsin inhibitor in experimental and spontaneous metastasis models. *Int J Cancer* 63: 455–462
16. Kobayashi H, Sugino D, She MY et al. (1998) A bifunctional hybrid molecule of the amino-terminal fragment of urokinase and domain II of bikunin efficiently inhibits tumor cell invasion and metastasis. *Eur J Biochem* 253: 817–826

17. Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T (2004) Genetic down-regulation of phosphoinositide 3-kinase by bikunin correlates with suppression of invasion and metastasis in human ovarian cancer HRA cells. *J Biol Chem* 279: 6371–6379
18. Onda H, Kasuya H, Takakura K et al. (1999) Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1279–1288
19. Paris S, Sesboué R, Delpech B et al. (2002) Inhibition of tumor growth and metastatic spreading by overexpression of inter-alpha-trypsin inhibitor family chains. *Int J Cancer* 97: 615–620
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. Salier JP, Rouet P, Raguenez G, Daveau M (1996) The inter-alpha-inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem J* 315: 1–9
22. Schmitt AO, Specht T, Beckmann G et al. (1999) Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues. *Nucleic Acids Res* 27: 4251–4260
23. 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
24. Veeck J, Chorovicer M, Naami A et al. (2008) The extracellular matrix protein ITIH5 is a novel prognostic marker in invasive node-negative breast cancer and its aberrant expression is caused by promoter hypermethylation. *Oncogene* 27: 865–876
25. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y et al. (2004) Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 64: 5882–5890
26. Zhuo L, Hascall VC, Kimata K (2004) Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem* 279: 38079–38082
27. Zhuo L, Yoneda M, Zhao M et al. (2001) Defect in SHAP hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem* 276: 7693–7696