

Technische Universität München
TUM School of Medicine and Health

Die prognostische Relevanz von miR-7, miR-16, miR-27a, uPA und PAI-1 im triple-negativen Brustkrebs

Thirza Singer-Cornelius

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Viktor Magdolen

2. Prof. Dr. Marion B.Kiechle

Die Dissertation wurde am 06.03.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 10.10.2023 angenommen.

Für meine Mutter

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	4
2. Einleitung.....	6
2.1 Brustkrebs	6
2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren	6
2.1.2 Klassifikation und Subtypen.....	8
2.1.3 Diagnose und prognostische Faktoren	10
2.2 Triple-negativer Brustkrebs (TNBC).....	11
2.2.1 Molekulare Grundlagen und Subtypen des TNBC	13
2.2.2 Therapie.....	15
2.3 miRNAs.....	20
2.3.1 Biogenese der miRNAs.....	21
2.3.2 miRNAs in Karzinomen	23
2.4 Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), uPA-Rezeptor (uPAR) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1).....	24
2.5 miR-7, miR-16, miR-27a	26
3. Ziel der Studie.....	31
4. Material und Methoden.....	33
4.1 Patientenkollektiv	33
4.2 Reagenzien und Materialien	33
4.3 Vorversuche mit Zelllinien	36
4.3.1 Auswahl der Zelllinien.....	36
4.3.2 Kultivierung von Mamma- und Ovarialkarzinomzellen	37
4.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
4.3.4 Einbettung von Zellen in Fibrin	38
4.3.5 RNA/DNA Extraktion	38
4.3.6 Synthese von cDNA.....	43
4.3.7 Standardverdünnungsreihe	46
4.3.8 Quantitative Polymerasekettenreaktion	48
4.3.9 ELISA-Bestimmung von uPA und PAI-1 Expressionsniveaus	54
4.3.10 Statistische Analysen	54
5. Ergebnisse	56
5.1 Patientenkollektiv	56
5.2 Cut-off Bestimmung von miR-7, miR-16 und miR-27a Expressionsniveaus	57
5.3 Cut-off Bestimmung von uPA und PAI-1	60
5.4 Analyse der Korrelation der miRNAs und uPA, PAI-1 untereinander.....	61
5.1 Assoziation der miRNAs mit klinikopathologischen Faktoren: Chi-Square-Tests.....	64

5.2	Assoziation von miR-7, miR-16, miR-27a und klinikopathologischen Faktoren zu Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Univariate Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier-Überlebenskurven.....	68
5.3	Assoziation von miR-7- und miR-16- und miR-27a-Expressionsniveaus mit Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Multivariate Cox-Regressionsanalysen	71
5.4	Assoziation uPA und PAI-1 zu Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Univariate Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier- Überlebenskurven	74
5.5	Assoziation von uPA-Expressionsniveaus mit Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Multivariate Cox-Regressionsanalysen.....	76
5.6	Klinikopathologische Faktoren in Assoziation zum Gesamt- und krankheitsfreien Überleben: Kaplan-Meier-Überlebenskurven und Log-Rank-Tests	77
6.	<i>Diskussion</i>	84
6.1	Patientencharakteristika und klinikopathologische Faktoren.....	84
6.2	uPA und PAI-1 und deren prognostische Relevanz.....	86
6.3	miR-7, -16, -27a und deren prognostische Relevanz.....	89
7.	<i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	95
8.	<i>Quellenverzeichnis</i>	96
9.	<i>Danksagung</i>	114

1. Abkürzungsverzeichnis

BET	Brust-erhaltende Therapie
BIRADS	Breast Imaging Reporting and Data System of the American College of Radiology
BL1 TNBC	Basal-like 1
BL2 TNBC	Basal-like 2 (BL2)
BLBC	Basal like breast cancer
CI	Konfidenzintervall
CISH	Chromogen-in-situ-Hybridisierung
DCIS	Ductal carcinoma in situ
DFS60	Disease free survival after 60 months
DGCR8	Di George Gene Critical Region 8
ECM	Extracellular matrix
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMT	Epithelial mesenchymal transition
ESAM	Endothelial cell-selective adhesion molecule
FAK	Focal adhesion kinase
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HGF	Hepatocyte growth factor
HoxB3	Homeobox B 3
HR	Hazard ratio
IM TNBC	Immunomodulatorisches TNBC
LAR TNBC	Luminal androgen receptor TNBC
LN	Lobular neoplasia
M TNBC	Mesenchymales TNBC
MSL TNBC	Mesenchymal stem-like TNBC
OS60	Overall survival after 60 months

PAK1	P21 activated kinase 1
PARP	Poly- (ADP-Ribose) Polymerasen
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerasen
PFS	Persistent free survival
Raf1A	Ras association domain family
RISC	RNA-induced Silencing Complex
SET8	SET domain-containing (lysine methyltransferase) 8
TRBP	HIV-1 TAR RNA binding protein
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vascular endothelial growth factor

2. Einleitung

2.1 Brustkrebs

2.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren

Das Mammakarzinom ist die häufigste diagnostizierte Krebsart (11,7% aller registrierten Krebsfälle) und zugleich ursächlich für die meisten krebsbedingten Todesfälle bei Frauen weltweit. Im Laufe ihres Lebens erkrankt nahezu jede achte Frau an Brustkrebs. Im Jahr 2020 wurden 2,3 Millionen Brustkrebsfälle weltweit diagnostiziert, wobei 685.000 Menschen verstarben (Sung et al., 2021). Interessanterweise werden circa 50 % der Erkrankungsfälle in den höherentwickelten Ländern registriert. Gründe für die hohe Diskrepanz zwischen Entwicklungs- und Industrienationen liegen einerseits an einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Menschen, die in Industrienationen leben und andererseits an signifikant besseren diagnostischen Möglichkeiten wie beispielsweise flächendeckenden Früherkennungsmaßnahmen in den höherentwickelten Ländern (Torre et al., 2015). Die Verbesserung von Screening-Methoden, frühzeitiger Diagnosestellung und Therapie über die Jahre resultiert in steigenden Überlebensraten, wenn auch mit geographischen Unterschieden (Breen et al., 2011). Obwohl das Mammakarzinom die am häufigsten beforschte Malignität ist, gibt es Tumorentitäten, bei denen die aktuell üblichen Therapien nicht nachhaltig genug sind. Somit besteht auch weiterhin eine große Wichtigkeit in der wissenschaftlichen Erforschung möglicher Risikofaktoren, pathophysiologischer Prozesse, Therapieoptionen und prognostischer Parameter (Woolston, 2015).

Bis zum heutigen Tag ist die Mehrzahl der pathophysiologischen Zusammenhänge, die zur Entwicklung von Brustkrebs führen unbekannt. Die Forschung konnte jedoch einige Risikofaktoren, die zur Entstehung beitragen, identifizieren. Der wohl wichtigste Faktor ist das Alter. In der Zeit bis zur Menopause verdoppelt sich die Brustkrebsinzidenzrate alle 10 Jahre und verringert sich im Anschluss daran wieder (Howlader et al., 2019; Siegel et al., 2021). Daher ist die Vermutung naheliegend, dass Reproduktionshormone, wie beispielsweise Östrogen, einen Einfluss auf die Tumorgenese haben. Weiterhin konnte in den letzten Jahren eine deutliche Verlängerung des Reproduktionszyklus, verursacht durch endokrine Faktoren wie frühe

Menstruation, späte Menopause, Nulliparität, späte Erstgeburt und Hormonersatztherapie in der weiblichen Bevölkerung beobachtet werden. Diese protrahierte Östrogenstimulation gepaart mit hohen Östrogenspiegeln korreliert mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in späteren Jahren (Sun et al., 2022; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 2019; Ritte et al., 2013). Patientinnen haben nach chirurgisch herbeigeführter Menopause vor dem 35. Lebensjahr (durch Ovariectomie und Hysterektomie) ein um 60 % vermindertes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Frauen, die die natürliche Menopause in höherem Alter durchlaufen (McPherson et al., 2000). Darüber hinaus konnten einige prospektive Studien belegen, dass eine prophylaktische, selektive Östrogen-Rezeptor-Modulation (wie beispielweise mittels Tamoxifen oder Raloxifen) das Risiko an Brustkrebs zu erkranken um 31 % senkt (Nazarali et al., 2014). Ernährungsweise, Alkoholkonsum, Fettleibigkeit und Sport sind weitere wichtige Einflussfaktoren. Ein hoher BMI postmenopausal (= *Body Mass Index*) oder eine starke Gewichtszunahme perimenopausal konnte mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken assoziiert werden (Eliassen et al., 2006). Dieser Zusammenhang wird dadurch erklärt, dass Fettzellen Östrogen produzieren und der daraus resultierende erhöhte Östrogenspiegel wiederum mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einhergeht (Neuhouser et al., 2015). Ein weiterer Risikofaktor stellt eine hohe Brustdichte dar (Wong et al., 2011). Obwohl die Brustdichte eine zum großen Teil vererbte Eigenschaft ist, so kann sie dennoch durch sportliche Aktivität sowie fettreduzierte und Kohlenhydrat-reiche Kost verringert und damit das Brustkrebsrisiko gesenkt werden (Vachon et al., 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass bei Personen, die moderater sportlicher Aktivität nachgehen, das Brustkrebsrisiko geringer ist als bei Personen, die keiner sportlichen Aktivität nachgehen (Pizot et al., 2016).

Das genetische Setting hat ebenso einen Einfluss auf die Entstehung von Brustkrebs. Circa 10% der Brustkrebsfälle sind auf eine genetische Mutation zurückzuführen (The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Das durchschnittliche Erkrankungsalter dieser sogenannten Hochrisiko-Patienten ist 45 Jahre. Dahingegen liegt das mediane Erkrankungsalter bei Nicht-Hochrisiko-Patienten in Deutschland bei 65 Jahren (Kreienberg et al., 2010).

BRCA1 und BRCA2 sind die wohl bekanntesten Tumorsuppressorgene in der Tumorgenese des Mammakarzinoms. Sie spielen eine wichtige Rolle in DNA-Reparaturmechanismen. Mutationen

in diesen Genen treten in 50 % aller hereditären Brustkrebsfälle auf und werden neben dem Mammakarzinom auch bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom und weiteren Krebsarten beobachtet. Das Vererbungsmuster ist autosomal-dominant (Castera et al, 2014; Meindl et al., 2011; Kreienberg et al., 2010). Als BRCA1-Mutationsträger liegt die Wahrscheinlichkeit bis zu einem Alter von 80 Jahren am Mammakarzinom zu erkranken bei 72 %, bei BRCA2-Mutationsträgern 69 %. Die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms liegt bei BRCA1-Mutationsträgern bei 44 %, bei BRCA2-Mutationsträgern 17 % (Kuchenbaecker et al., 2017).

Nichtsdestotrotz sind nicht alle hereditären Mammakarzinome auf BRCA1 und BRCA2 zurückzuführen. Brustkrebs kann auch im Rahmen des seltenen Li-Fraumeni-Syndroms (Mutation im Tumorsuppressorgen TP53), Cowden-Syndrom (Mutation in PTEN) und Peutz-Jeghers-Syndrom (Mutation im STK11-Gen) auftreten (Kreienberg et al., 2010). Des Weiteren konnten in einer Studie von De Jong et al. (2002) andere Polymorphismen in 13 verschiedenen Genen entdeckt werden, welche die Entstehung des Mammakarzinoms signifikant begünstigen. Hierzu zählen Polymorphismen in HRAS1, GSTM1, GSTP1, CAP1B1 (Codon 119), CYP2D6, CYP19 und VDR (de Jong et al., 2002). Meindl et al. (2010) konnten erstmals Mutationen des Gens RAD51C mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung bringen.

2.1.2 Klassifikation und Subtypen

Die standardisierten Klassifikationen des Mammakarzinoms beziehen sich auf das Grading, Staging, den Rezeptor-Status und die Genexpression. Die WHO klassifiziert Brusttumoren anhand des morphologischen Phänotyps der Histopathologie. Grob können die Neoplasien in duktales oder lobuläres Karzinom und invasive und nicht-invasive/in situ Karzinome unterteilt werden. Nicht-invasive Karzinome wachsen vom Epithelium der duktales-lobulären Drüsen. Invasive Karzinome brechen zusätzlich durch die Basalmembran (Kreienberg et al., 2010).

Nicht-invasive Tumoren können in DCIS (*ductal carcinoma in situ*) und LN (lobuläre Neoplasie) unterteilt werden. DCIS ist eine präkanzeröse Läsion und wird in Mammographie-Screenings

häufig anhand dessen Mikrokalzifikation erkannt. Die Therapie beinhaltet eine BET (brusterhaltende Therapie) gefolgt von einer Strahlentherapie oder in seltenen Fällen einer Mastektomie. Die LN stellt eine Subsummierung von atypischer lobulärer Hyperplasie (ALH) und lobulärem Carcinoma in situ (LCIS) dar und kann nach prognostischer und therapeutischer Relevanz in 3 Subtypen (LN I, II, III) unterteilt werden. Sie wird operativ therapiert. Im Falle eines LN I oder II und einem betroffenen Resektionsrand ist ein *Follow-up* mit oder ohne Gabe von Tamoxifen indiziert. Bei einem LN III sollte eine Re-Exzision bei betroffenem Resektionsrand erfolgen. Invasiv-lobuläre Karzinome machen 10 % aller Mammakarzinome aus, invasiv-duktales Karzinome 70 - 80 %. Andere seltenere Subtypen sind das medulläre, muzinöse, tubuläre, papilläre und inflammatorische Mammakarzinom (Kiechle, 2011).

Darüber hinaus kann das Mammakarzinom in fünf molekulare Untergruppen eingeteilt werden: Luminal A, Luminal B/HER2-positiv, Luminal B/HER2-negativ, HER2-positiv/nicht-luminal sowie das TNBC (KrebsligaSchweiz, 2014) (**Tab. 1**).

Tab. 1 Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms nach dem St. Gallen Konsensus

Das Mammakarzinom kann anhand des molekularen Status in 5 Subtypen unterschieden werden (Luminal A, Luminal B/HER2-positiv, Luminal B/HER2-niedrig, HER2-positiv/nicht-luminal, TNBC) (Falck et al., 2016).

	Luminal A	Luminal B und HER2^c-positiv	Luminal B und HER2^c-niedrig	HER2^c-positiv und nicht-luminal	TNBC
ER^a	positiv	Positiv und/oder	positiv	negativ	negativ
PR^b	PR ^b > 20 %	PR ^b positiv	PR ^b ≤ 20 %	PR ^b negativ	PR ^b negativ
HER2^c	negativ	positiv	negativ	positiv	negativ
Ki-67^d	niedrig	Ki-67 ^d , unabhängig der Konzentration	± hohes Ki-67 ^d	Ki-67 ^d , unabhängig der Konzentration	Ki-67 ^d , unabhängig der Konzentration

^aER = *estrogen receptor*

^cHER2 = *human epidermal growth factor receptor 2*

^bPR = *progesteron receptor*

^dKi-67 = ein Proliferationsmarker

2.1.3 Diagnose und prognostische Faktoren

Ein relevanter Faktor für die Prognose von Brustkrebs ist die frühe Detektion. In Deutschland übernehmen die Krankenkassen bei Frauen im Alter von 30 bis 49 Jahren und ab 70 Jahren den manuellen Brust-Scan beim Gynäkologen einmal im Jahr. Dieser umfasst eine Inspektion und Palpation der Brust sowie der assoziierten Lymphknoten. Circa 70 % aller Fälle werden durch manuelle Selbstpalpation der Patienten bemerkt (Kiechle, 2011).

Frauen im Alter zwischen 50 und 69 Jahren werden zusätzlich alle zwei Jahre zum Mammographie-Screening eingeladen. Die Mammographie ist heutzutage die wichtigste Screening Methode in der Detektion von Brustkrebs, da diese Untersuchung die Mortalität der 50 bis 69-jährigen Brustkrebspatientinnen um 41 % senken konnte (Duffy et al., 2020 ; Kiechle, 2011). Liegt bei einer Patientin eine hereditäre Erkrankung in der Familie vor, so sind jährliche Mammographie-Screenings indiziert. Das Röntgenbild wird durch die sogenannte BIRADS-Klassifikation (**B**reast **I**maging **R**eporting and **D**ata **S**ystem of the American College of Radiology) evaluiert. Sollte bei Patienten unter 40 Jahren ein suspekter Befund im manuellen Scan auftreten, kann dieser mittels Sonographie zunächst weiter beurteilt werden. Die Sonographie hilft dabei, palpable Knoten in zystisch oder solide einzuteilen und ist aufgrund der absenten Strahlenbelastung Screening-Methode Nummer eins bei schwangeren Frauen. Sollte nach der Sonographie weiterhin ein unklarer Befund vorliegen, so ist ein MRT indiziert (Kiechle, 2011).

Mithilfe einer sonographisch oder mammographisch assistierten Biopsie sollte im Vorfeld jeder Operation eine histopathologische Sicherung des Tumorverdachts erfolgen. Die derzeit angewendeten Standard-Verfahren sind hierfür die Vakuum-assistierte Brustbiopsie und die Stanzbiopsie (Breckwoldt, 2008; Stauber, 2007).

In der Histopathologie werden Tumor-Subtyp, Grading, Lymphknoten- und Rezeptorstatus bestimmt. Dies sind entscheidende Faktoren, welche die Prognose beeinflussen. Das Staging wird durch die TNM-Klassifikation der UICC beschrieben. In dieser Klassifikation werden die Tumorgröße (=T), die regionalen Lymphknoten (=N) und Fernmetastasen (=M) evaluiert. Der wichtigste Faktor ist die Zahl der von Tumor befallenen Lymphknoten. Das Grading spiegelt die Differenzierung der Zelle und ihre Abweichung von einer normalen Zelle wieder (Böcker, 2012).

Der Rezeptorstatus des Mamakarzinoms ist vor allem in Hinblick auf die therapeutische Vorgehensweise klinisch relevant. Östrogen-, Progesteron- und HER2-Rezeptoren können mithilfe einer Hormon- bzw. Antikörpertherapie gezielt beeinflusst werden. Somit sollte der Rezeptorstatus, wenn möglich, bereits aus der Stanzbiopsie ermittelt werden. Die Bestimmung erfolgt immunhistochemisch und soll sowohl den Prozentsatz positiver Tumorzellkerne als auch die durchschnittliche Farbtintensität angeben (Hammond et al., 2010).

Die Konzentrationen der Biomarker Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) können mithilfe von ELISAs bestimmt werden. Im nodal-negativen Brustkrebs sind diese proteolytischen Faktoren prognostische Marker und haben Einfluss auf das zu favorisierende therapeutische Verfahren (Harbeck et al., 2013). Zusätzlich kann der Expressionsstatus des Proteins Ki-67 in jedem molekularen Subtyp bestimmt werden. Da Ki-67 in inaktiven Zellen nicht exprimiert wird, ist er ein etablierter Proliferationsmarker. Die Relevanz dieses Markers bezogen auf Prognose und Therapie ist jedoch umstritten und somit in einer leitliniengerechten Therapie nicht zwingend zu bestimmen. Eine positive Korrelation zwischen hohem Ki-67 und gutem Ansprechen auf Chemotherapie konnte jedoch belegt werden (Ács et al., 2017; Melcher et al., 2012; Scholzen et al. 2000).

2.2 Triple-negativer Brustkrebs (TNBC)

Der TNBC ist laut der *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists* definiert als Mammakarzinom, welches weder Östrogen- noch Progesteronrezeptoren (< 1 % positive invasive Tumor-Nuclei) exprimiert und eine fehlende Überexpression von HER2 aufweist. Die Sicherung des negativen HER2-Status kann entweder immunhistochemisch über eine Proteinüberexpression von einem Score 0 und 1+ nachgewiesen werden oder aber bei Score 2+ durch eine Genamplifikation mithilfe einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung oder einer Chromogenen-in-situ-Hybridisierung (CISH) (Hammond et al., 2010; King et al., 2001). Histopathologisch kennzeichnend sind bei diesem Tumor eine hohe Mitoserate, ein nukleärer Polymorphismus und unterschiedliche tubuläre Formationen. Mikroskopisch können eine

zentrale Nekrose, lymphatische Infiltrate und verschwimmende Grenzen beobachtet werden (Borri et al., 2020; Colleoni et al., 2002).

Als Risikofaktoren gelten ein junges Alter bei Beginn der Menarche, eine hohe Zahl an Paritäten, ein junges Alter bei der ersten Schwangerschaft sowie abdominelle Adipositas. Im Gegensatz dazu werden eine lange Stillzeit und eine hohe Anzahl an gestillten Kindern sowie ein niedriger BMI mit einem verringerten Risiko in Verbindung gebracht (Millikan et al., 2008).

Obwohl TNBCs nur 15-20 % aller Brustkrebsfälle ausmachen, ist die Erforschung dieses Karzinoms von besonderem Interesse. Das TNBC ist eine Tumorentität mit hoher Aggressivität und derzeit nur limitierten Therapieoptionen. Im Vergleich zu Rezeptor-positiven Brustkrebstypen ist die Ausdehnung des Tumors meist größer, der histopathologische Status von höherem Grading und die meisten TNBC-Patienten zeigen bei Diagnose bereits Lymphknotenmetastasen (Haffty et al., 2006). Insgesamt handelt es sich bei ca. 38 % bereits um ein Karzinom im Spätstadium. Fernmetastasen liegen bereits in ca. 6,6 % der Fälle vor (Scott et al., 2019). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit neuer therapeutischer Verfahren, welche zielgerichtet auf den Tumor wirken.

Besonders die Gruppe von Frauen < 40 Jahre ist häufiger von TNBC (7,7 %) als von anderen Brustkrebsentitäten (3,8 %) betroffen (Scott et al., 2019). Das mittlere Alter bei Diagnosestellung eines TNBC liegt bei 54 Jahren und ist demnach signifikant niedriger als bei anderen Mammakarzinomtypen (Median 65 Jahre) (Bauer et al., 2007). Nur 37 % der TNBC-Patientinnen sind über 50 Jahre alt (versus 55% bei rezeptorpositiven Mammakarzinomen) (Haffty et al., 2006). Darüber hinaus ist die Prognose schlechter als bei anderen Brustkrebstypen. Die 5-Jahres-Überlebensrate einer TNBC-Patientin liegt bei 77 %, bei Nicht-TNBC-Typen bei 82,7 – 92,5 %. Familienanamnesen mit zumindest einem Verwandten ersten Grades, der an TNBC erkrankt ist, sind ebenfalls sehr häufig (Wu et al., 2021).

Die Inzidenz des TNBC ist abhängig von der ethnischen Zugehörigkeit. In US-amerikanischen Studien konnte eine höhere Inzidenz von TNBC bei Afro-Amerikanerinnen verglichen zu Kaukasierinnen, hispanischen Frauen oder Asiatinnen gezeigt werden (Prakash et al., 2020; Tao et al., 2015). Zudem zeigte sich, dass Afro-Amerikanerinnen mit TNBC bei Diagnosestellung jünger sind, ein höheres Tumorstadium und eine größere Wahrscheinlichkeit für eine

Fernmetastasierung aufweisen als Kaukasierinnen (Tao et al., 2015). Diese Faktoren spiegeln sich auch in der Prognose wider. In einer Studie von Cho et al. (2021) hatten afro-amerikanische Frauen eine 5-Jahres-Überlebensrate von 76,9%. Dahingegen hatten kaukasische Frauen ein Gesamtüberleben von 82,9 %. Eine Studie von Sugita et al. (2016) untersuchte die miRNA-Expression bei TNBC Patientinnen afro-amerikanischer und kaukasischer Herkunft. Hier konnten signifikante Unterschiede im miRNA-Expressionsmuster zwischen den Ethnizitäten festgestellt werden.

2.2.1 Molekulare Grundlagen und Subtypen des TNBC

Der triple-negative Brustkrebs bezeichnet keine homogene Gruppe, vielmehr können diverse Subgruppen mithilfe von Genexpressionsmustern unterschieden werden. In mehreren Studien zeigten sich in Genexpressionsanalysen mithilfe von *Microarrays* eine Überlappung vom TNBC mit dem *basal-like* Karzinom (BLBC) und Karzinomen, welche eine Mutation im BRCA1/2 aufweisen (Gonzalez-Angulo et al., 2011; van 't Veer et al., 2002). Obwohl beide in der Literatur häufig synonym verwendet werden, handelt es sich beim triple-negativen Brustkrebs und dem *basal-like* Brustkrebs um zwei verschiedene Entitäten. Zwar zeigen beide einerseits eine hohe Konkordanz von circa 71 % in mindestens einem basalen Marker (Rakha et al., 2009), andererseits exprimieren 15 – 45 % der basal-like Tumoren Östrogen-, Progesteron- oder überexprimieren HER2-Rezeptoren, womit sie nicht als triple-negativ klassifiziert werden können (**Abb. 1**) (Carey et al., 2010; Rouzier et al., 2005; Sorlie et al., 2001).

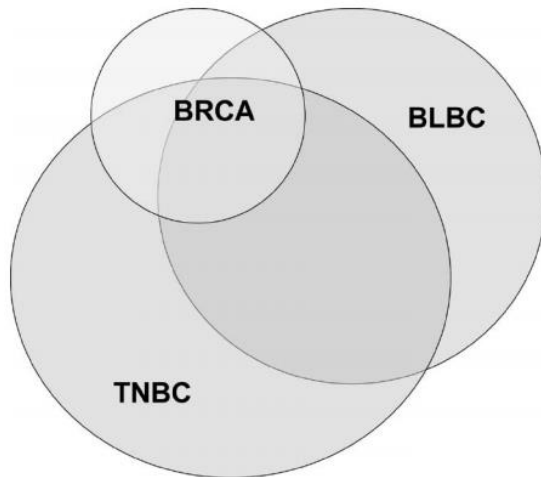


Abb. 1 Überlappung von BRCA, TNBC und BLBC

Die 3 Entitäten BRCA, TNBC und BLBC zeigen auf molekularer Ebene Überlappungen (aus Liedtke and Kiesel 2011). BRCA = Patienten mit BRCA 1 oder 2 Mutationen. TNBC = Triple negative breast cancer. BLBC = Basal like breast cancer.

Lehmann et al. (2011) identifizierten 6 stabile Subtypen des TNBC durch einen *K-Means*-Algorithmus und *Konsensus-Clustering* in Genexpressionsprofilen: *basal-like 1 (BL1)*, *basal-like 2 (BL2)*, *immunomodulatory (IM)*, *mesenchymal (M)*, *mesenchymal stem-like (MSL)* und *luminal androgen receptor (LAR)* TNBC. Diese Klassifizierung ermöglicht eine standardisierte Anwendung einer dem Subtyp entsprechenden Therapie (Lehmann et al., 2011).

Die BRCA-Proteine sind normalerweise an der Reparatur doppelsträngiger DNA beteiligt. Spezifische Mutationen in einem BRCA-Gen führen zu einem Funktionsverlust der BRCA-Proteine und damit wiederum zur Promotion der Tumorgenese. Daher entwickeln Patienten mit BRCA1 oder BRCA2-Mutationen auch disproportional häufig TNBC. Bei BRCA1-Mutationsträgern tritt das TNBC in 57 % der Fälle auf. Bei BRCA2-Trägern ist die Häufigkeit mit 23 % niedriger (Atchley et al., 2008). Zudem zeigte eine Studie von Gonzalez-Angulo et al. (2011), dass in einer unselektierten Kohorte von TNBC-Patientinnen bei 19,5 % eine BRCA-Mutation gefunden werden konnte (**Abb. 1**). Interessanterweise zeigten BRCA1/2-Mutationsträger ein längeres krankheitsfreies Überleben verglichen zu BRCA-freien TNBC-Patienten nach chirurgischer und

chemotherapeutischer Therapie. Ein signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtüberlebens konnte nicht festgestellt werden (Gonzalez-Angulo et al., 2011).

Moderne Studien des „*The Cancer Genome Atlas Research Network*“ halfen dabei unser Verständnis über das TNBC zu verbessern (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>) ("The Cancer Genome Atlas Program"). Diverse *loss-of-function* Mutationen wie TP53, RB1 und BRCA1 spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung des TNBC. Auch *gain-of-function* Mutationen wie beispielsweise die Aktivierung des PI3K-Weges haben eine pathophysiologische Relevanz in der Tumorgenese des TNBC (Beelen et al., 2014; Lalloo et al., 2006).

Verschiedene Biomarker werden derzeit erforscht, um die Diagnostik und zielgerichtete Therapie für TNBC Patientinnen und Patienten zu verbessern. Hierzu zählen beispielsweise EGFR (spielt entscheidende Rolle in Zellproliferation, Angiogenese, Metastasierung und Inhibition der Apoptose), VEGF (wichtiger Faktor für Neovaskularisation und Angiogenese), C-KIT (reguliert Induktion der Apoptose), P53 (reguliert Zellwachstum, Apoptose und Proliferation) und TOP-2A (Überexpression verringert Ansprechen auf Anthrazyklin-haltige Chemotherapie). Auch PARP-Inhibitoren, welche eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur durch Basenexzision, Promotion der Transkription von proinflammatorischen Genen sowie Zelldysfunktion und Nekrose spielen sind Gegenstand aktueller Forschung (Song et al., 2020; Bose et al, 2020; López-Mejía et al.,2022; Li e al., 2019; Eltohamy et al., 2018; Han et al., 2020).

2.2.2 Therapie

Therapie des Rezeptor-positiven Brustkrebses.

Der primäre Brustkrebs ist eine systemische Krankheit, welche multimodal therapiert werden muss. Lokal beinhaltet die Therapie eine Operation und Strahlentherapie, wohingegen die systemische Therapie Chemotherapeutika, endokrine Therapie und Antikörper beinhaltet.

Die neoadjuvante Chemotherapie ist definiert als Chemotherapie, die vor einer operativen Intervention stattfindet. Sie ist typischerweise Taxan- sowie Anthrazyklin- basiert und dauert 18-

24 Wochen. Bei HER2-positiven Tumoren werden zusätzlich Trastuzumab +/- Pertuzumab eingesetzt. Zwingend erforderlich ist die Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie bei inflammatorischen Mammakarzinomen, inoperablen oder sehr fortgeschrittenen Tumoren. Optional kann sie bei allen Patienten, für die eine adjuvante Chemotherapie vorgesehen ist, zur Tumorverkleinerung angewendet werden, um somit eine Brust-erhaltende Therapie möglich zu machen. Sollte die gleiche adjuvante Chemotherapie indiziert sein, wäre eine neoadjuvante Therapie zu bevorzugen. Bezüglich Gesamtüberleben sind jedoch die neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie gleichwertig (AGO, 2020; Kaufmann et al., 2007).

Die Operation kann entweder als eine Brust-erhaltende Therapie oder eine modifiziert radikale Mastektomie durchgeführt werden. So lange keine Kontraindikationen vorliegen ist die Brust-erhaltende Therapie (70 % der Fälle) als *state of the art* anzusehen. Zu den Kontraindikationen zählen: Multizentrität, inflammatorisches Mammakarzinom, keine Strahlentherapie nach BET möglich, inkomplette Entfernung des Tumors, kosmetisches Ergebnis nach BET nicht zufriedenstellend sowie Wunsch der Patientin (Voogd et al., 2001). Bei beiden Operationen entnimmt der Operateur zusätzlich die axillären Lymphknoten Level I und II in einem Paket von mindestens 10 zusammenhängenden Knoten. Ein modernerer Ansatz ist die Sentinel-Lymphonodektomie, wobei der Sentinel-Lymphknoten markiert wird. Falls dieser von Tumorzellen befallen ist, folgt eine Axilla-Dissektion von Level I und II. Bei pathologisch nachgewiesener Tumorfreiheit können die Lymphknoten *in situ* belassen werden. Nach einer BET ist immer eine postoperative Radiotherapie notwendig, um das Risiko eines Lokalrezidivs zu vermindern (Kiechle, 2011).

Bei den meisten Subtypen des Mammakarzinoms ist eine postoperative, adjuvante Chemotherapie zwingend erforderlich. Jedoch wird generell bei Indikation einer Chemotherapie die neoadjuvante Gabe bevorzugt. Ausgenommen werden können hiervon nur Patienten, die an einem Luminal A-Typ erkrankt sind, keine Lymphknotenmetastasen aufweisen, unter 35 Jahre alt sind, der Tumor unter 2 cm groß und als Grade 1 zu klassifizieren ist. Zusätzlich sollte der Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor positiv sein sowie HER2-negativ (Melcher et al., 2012). Wenn keine Kontraindikationen vorliegen, sollte ein Anthrazyklin-Taxan-haltiges Schema

angewendet werden. Übliche und einander gleichwertige Schemata sind der **Tabelle 2** zu entnehmen (Denduluri et al., 2020).

Tab. 2 Chemotherapie Behandlungsschemata des Mammakarzinoms

Aktuelle Chemotherapie-Behandlungsschemata gemäss ASCO Guidelines (Denduluri et al., 2020).

Fluoruracil-Epirubicin-Cyclophosphamid x 3	➡	Docetaxel x3
Doxorubicin-Cyclophosphamid x 4	➡	Docetaxel x 4
Docetaxel-Doxorubicin-Cyclophosphamid x 6		
Doxorubicin-Cyclophosphamid x 4	➡	Paclitaxel 1x/Woche
Doxorubicin-Cyclophosphamid hochdosiert	➡	Paclitaxel 1x/alle 2 Wochen
Hochdosiert Epirubicin-Cyclophosphamid alle 2 Wochen 4 Zyklen	➡	Paclitaxel alle 2 Wochen 4 Zyklen

Der humane epidermale Wachstumsfaktorrezeptor 2 (HER2, ErbB) ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die zu den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren gehört (EGF-Rezeptoren). 20 - 25 % aller invasiven Mammakarzinome weisen eine Überexpression dieses Rezeptors auf, der über den RAS-MAP-Kinase-Weg einerseits die Zellproliferation reguliert und andererseits über mTOR die Apoptose hemmt (Olayioye, 2001; Slamon et al., 1989). Trastuzumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper, der sich gegen HER2 richtet und damit eine zielgerichtete Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms darstellt. Er kann zusätzlich zur Chemotherapie oder nachfolgend eingesetzt werden. Beim fortgeschrittenen, metastasiertem HER2-positiven Mammakarzinom kann zudem T-DM1 (Trastuzumab-Emtansin) eingesetzt werden (Verma et al., 2012). Ein positiver HER2-Status liegt bei einem Score 3+ (starke Überexpression) oder aber bei einem Score 2+ und positiver FISH/CISH vor (Carlson et al., 2006). Neue Studien zeigen auch eine Wirksamkeit von *antibody drug conjugates* bei HER2-low Mammakarzinomen. Eine Therapie mit Trastuzumab-Deruxtecan geht mit einer Verlängerung des progressionsfreien und Gesamtüberlebens im Vergleich zur Chemotherapie einher (Modi et al., 2022).

Sind Östrogen- (ER) und/oder Progesteronrezeptor (PR) positiv (≥ 10 % PR-positive Zellkerne), sollte eine endokrine Therapie eingesetzt werden. Bei einer schwachen ER-Expression von 1-9 %

sollte zusätzlich eine adjuvante oder neoadjuvante Therapie evaluiert werden (AWMF, 2020). Die Art des eingesetzten Medikaments richtet sich nach dem prä- oder postmenopausalen Status sowie dem Rezidivrisiko und der Aggressivität des Tumors. Tamoxifen ist ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (SERM). Es dockt an den Östrogenrezeptor des Tumors an und besetzt diesen. Damit kann körpereigenes Östrogen nicht mehr proliferativ auf die Zellen wirken. Tamoxifen kann sowohl prä- als auch postmenopausal eingesetzt werden. Durch das Enzym Aromatase wird Östrogen vielerorts im Körper gebildet. Mithilfe eines Aromatasehemmers wie Anastrozol, Letrozol oder Exemestan kann die Produktion von Östrogen verhindert werden. Diese Medikation wird normalerweise postmenopausal angewandt. Ein weiteres Zielmolekül ist das *Gonadotropin Releasing Hormon* (GnRH), welches die Eierstöcke zur Produktion von Östrogen und Progesteron stimuliert. Das Einsetzen von Analoga signalisiert der Hypophyse einen negativen *Feedback*, sodass eine weitere Stimulation der Eierstöcke ausbleibt und die Hormone nicht mehr gebildet werden (AWMF, 2020; KrebsligaSchweiz, 2014).

Therapie des Triple-negativen Brustkrebses. Die Therapie des Rezeptor-positiven Brustkrebses und der des TNBC unterscheiden sich signifikant. Eine zielgerichtete Therapie, wie die endokrine Therapie beim Rezeptor-positiven Mammakarzinom, ist für den TNBC bislang nur eingeschränkt vorhanden. In Deutschland richtet sich die Therapie nach den Empfehlungen der S3-Leitlinie und der AGO-Kommission „Mamma“. Bei frühem, nicht-metastasierten TNBC sollte eine vorzugsweise neoadjuvante Anthrazyklin-/ Taxan-haltige Chemotherapie über die Dauer von 18-24 Wochen verabreicht werden. Bei Lymphknotenbefall sollte eine dosisdichte Gabe (alle 14 Tage) etabliert werden (EBCTCG, 2019; AGO, 2020).

Platin-Komplex-haltige Präparate sind Chemotherapeutika, die Brüche in doppelsträngiger DNA induzieren und vornehmlich für Tumoren mit BRCA1 und BRCA2 *loss of function* Phänotyp eingesetzt werden. Aufgrund der signifikanten Überschneidungen der Eigenschaften von TNBC und hereditärem Brustkrebs wird häufig von *BRCAness* gesprochen. Damit ist gemeint, dass sporadische TNBCs Eigenschaften von BRCA-Tumoren besitzen (Turner et al., 2004). Daher liegt die Annahme nahe, dass auch das TNBC auf eine platinhaltige Chemotherapie sensibel ist. In Studien konnte durch eine Ergänzung der Antrazyklin-/Taxan-haltigen Chemotherapie mit Carboplatin eine signifikante Verbesserung der pathologischen Komplettremissionsrate erreicht

werden. Zudem konnte eine Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens nach 3 Jahren verzeichnet werden. Auf das Gesamtüberleben hat die Hinzunahme von Carboplatin jedoch keinen signifikanten Einfluss (Stover et al., 2015; von Minckwitz et al., 2014).

Wenn möglich, sollte nach neoadjuvanter Chemotherapie eine brusterhaltende operative Therapie mit Sentinel-Lymphknoten-Dissektion angestrebt werden. Die Indikation zur Mastektomie ist dieselbe wie jene bei Rezeptor-positiven Mammakarzinomen (siehe oben). Liegt ein erhöhtes Rezidivrisiko vor, wie beispielweise bei Persistenz von invasivem Tumorrest in Mamma oder Axilla nach neoadjuvanter Chemotherapie, kann eine adjuvante Chemotherapie mit einem nicht kreuzresistenten Chemotherapeutikum (z.B. Capecitabin) evaluiert werden. Wurde keine neoadjuvante Chemotherapie gegeben, sollte als Adjuvans eine Anthrazyklin-/Taxan-haltige dosisdichte Chemotherapie erfolgen (AGO, 2020).

Bei Vorliegen eines isoliert lokoregionären Rezidivs, initial gutem Ansprechen auf eine Anthrazyklin-/Taxan-haltige Chemotherapie und eines krankheitsfreien Intervalls von > 1 Jahr kann erneut in kurativer Intention eine Taxan-haltige Chemotherapie und Operation durchgeführt werden. Aufgrund der Kardiotoxizität sollte auf die Anthrazyklin-Komponente verzichtet werden. Sind diese Voraussetzungen nicht erfüllt, sollte eine nicht kreuzresistente Chemotherapie gewählt werden (AGO, 2020).

Bei metastasiertem TNBC kann derzeit nicht in kurativer Absicht therapiert werden. Wurde der Patient im Vorfeld nicht mit einer Anthrazyklin-/Taxan-haltigen Chemotherapie therapiert oder zeigte sich bei letzter Anwendung ein gutes Therapieansprechen, so ist eine erneute Taxan-haltige Chemotherapie, vorzugsweise nab-Paclitaxel, indiziert. Bei hohem Remissionsdruck (=drohendem Organausfall) ist eine Kombination von nab-Paclitaxel mit Bevacizumab (= Anti-VEGF-Antikörper) und/oder Carboplatin in Erwägung zu ziehen. Bei Progression nach neo-/adjuvanter Therapie vor < 12 Monaten sollte eine Kombinationstherapie von nab-Paclitaxel und einem Platinsalz (Carboplatin, Cisplatin) erfolgen. Gibt es Kontraindikationen einer Kombinationstherapie, sollte eine Monotherapie mit Carboplatin, Vinorelbin, Capecitabin oder Eribulin evaluiert werden (AGO, 2020; Petrelli et al., 2014; Untch et al., 2016).

Bei metastasiertem TNBC konnten eine signifikante Verbesserung des progressionsfreien und des Gesamtüberlebens nach Therapie mit einer Kombination von nab-Paclitaxel mit dem PDL-1-Inhibitor Atezolizumab zeigen. Die Wirkung von Atezolizumab ist allerdings abhängig vom PDL-1-Status der Immunzellen, sodass dieser vorhergehend bestimmt werden muss. Bislang stellt diese Therapie zwar eine vielversprechende Option dar, ist aber derzeit noch nicht in Deutschland zugelassen (Schmid et al., 2020).

PARP-Inhibitoren sind eine vielversprechende Therapieoption bei TNBC mit hereditärem Hintergrund. Olaparib ist seit April 2019 in der Therapie von HER2-negativen Tumoren mit BRCA1/2-Mutation zugelassen. Die AGO 2020 empfiehlt als *second-line* Therapie bei HER2-negativen Tumoren mit BRCA1/2-Mutation und erfolgter Anthrazyklin-/ Taxan-haltigen Chemotherapie die Monotherapie mit Olaparib (AGO, 2020).

2.3 miRNAs

In den 90er Jahren wurde eine neue Klasse von RNAs entdeckt, welche die Genregulation beeinflussen. Die sogenannten micro-RNAs, miRNAs sind kleine, nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, die aus 18 bis 24 Nukleotiden bestehen. Sie entstehen aus längeren Vorläufer-RNAs und ihre Funktion beinhaltet die post-transkriptionelle Regulation der Genexpression sowie das Gen-*Silencing* (Weinberg, 2014).

Die erste miRNA, *lin-4*, wurde in *Caenorhabditis elegans*, einem Fadenwurm, im Jahr 1993 gefunden. Lee et al. (1993) konnten auf molekularer Ebene die Funktion von miRNAs in der Regulation der Genexpression beweisen, indem *lin-4* an der 3'UTR der Ziel-mRNA andockt und damit eine Reduktion der LIN-14 Proteinproduktion bewirkt. Seitdem sind miRNAs in den Fokus der Forschung getreten, sodass inzwischen über 2600 mature miRNAs im Menschen entdeckt werden konnten (Plotnikova et al., 2019). Diese Vielfalt an miRNAs wird inklusive deren genetischer Sequenz in einer Datenbank, miRBase (www.mirbase.org), gesammelt und steht der allgemeinen Forschung zur Verfügung. Bei den meisten dieser 2600 miRNAs ist die Funktion jedoch noch nicht bekannt und somit Teil einer Vielzahl an Forschungsprojekten (Griffiths-Jones

et al., 2006). Das enorme wissenschaftliche Potential der miRNAs spiegelt sich darin wider, dass eine miRNA im Stande ist mehrere hundert mRNAs zu regulieren und ein Gen von multiplen miRNAs kontrolliert werden kann. In 60 % aller humanen Protein-kodierenden Genen können miRNA-Bindungsstellen gefunden werden (Di Leva et al., 2014; Friedman et al., 2009).

Im Vergleich mit mRNAs weisen miRNAs einige Vorteile auf. miRNAs haben eine größere Stabilität gegenüber dem Abbau durch RNAsen. Zudem können sie auf einfache Weise aus FFPE, gefrorenem Gewebe oder Blut mit niedriger Degradationsrate extrahiert werden. Damit sind ideale Bedingungen für experimentelle oder diagnostische Analysen gegeben.

2.3.1 Biogenese der miRNAs

Vorläufer-miRNAs sind an unterschiedlichen Orten des Genoms vorzufinden, am häufigsten jedoch in den *intergenic regions* sowie den Introns Protein-kodierender Gene. Die Biogenese der miRNAs ist ein multimodaler Prozess. Ist die Vorläufer-miRNA in einer *intergenic region* lokalisiert, beginnt die Biogenese mit der Transkription der sogenannten pri-miRNAs durch die RNA-Polymerase II im Nukleus. Die RNase III Endonuklease Drosha sowie DGCR8, ein doppelsträngiges RNA-bindendes Protein, spalten das Produkt auf. Dieser, auch als Mikroprozessor bezeichnete Komplex, zerschneidet die *Stem-Loop*-Struktur der pri-miRNA und setzt eine aus 60-70 Nukleotiden bestehende *precursor (pre-)* miRNA in einer Haarnadelstruktur frei. Befindet sich die Lokalisation der miRNA in einem Intron, wird diese als Teil der pre-mRNA durch die Polymerase II transkribiert. Die miRNA-Sequenz wird von der pre-mRNA mithilfe von Spleißomen oder dem Mikroprozessor als pre-miRNA freigesetzt. Die pre-miRNA wird durch Exportin-5 ins Zytoplasma exportiert. Eine weitere Endonuklease, Dicer, schneidet die pre-miRNA in Nukleotid-Duplexe mit der Hilfe von TRBP, ein RNA-Bindeprotein (Beezhold et al., 2010; Calin et al., 2006; O'Day et al., 2010; Ying et al., 2008). Im nächsten Schritt wird der miRNA-Duplex in einen Silencing-Komplex namens RISC aufgeladen, welcher aus TRBP, Dicer und Argonaute 2 besteht. Mithilfe von HSP90, HSC70 und einer Helikase wird der miRNA-Duplex entwunden. Der pre-RISC wird in einen murenen RISC umgewandelt und die mature miRNA freigesetzt. Durch die Bindung des murenen RISC-Komplexes an der 3'UTR (= *untranslated region*) des Zielgens der mRNA kommt

es zu einer Inhibition des Ribosoms, was wiederum zu einem *Silencing* und einer verminderten Expression des Proteins führt (**Abb. 2**) (Winter et al., 2011; Ying et al., 2008). Findet bei der Bindung einer miRNA an ihre mRNA ein *incomplete pairing* (=partielle Komplementarität) der Basenpaare statt, führt dies zu einer Translationshemmung. Bei einem *perfect match* (= perfekte Basenpaarung) wird eine Degradation der Ziel-mRNA initiiert. Eine Translokation der Ziel-mRNA durch den miRNA-RISC-Komplex in sogenannte P-Bodies führt zum Abbau der mRNA. Dadurch regulieren miRNAs die Genexpression negativ (McDanel, 2009).

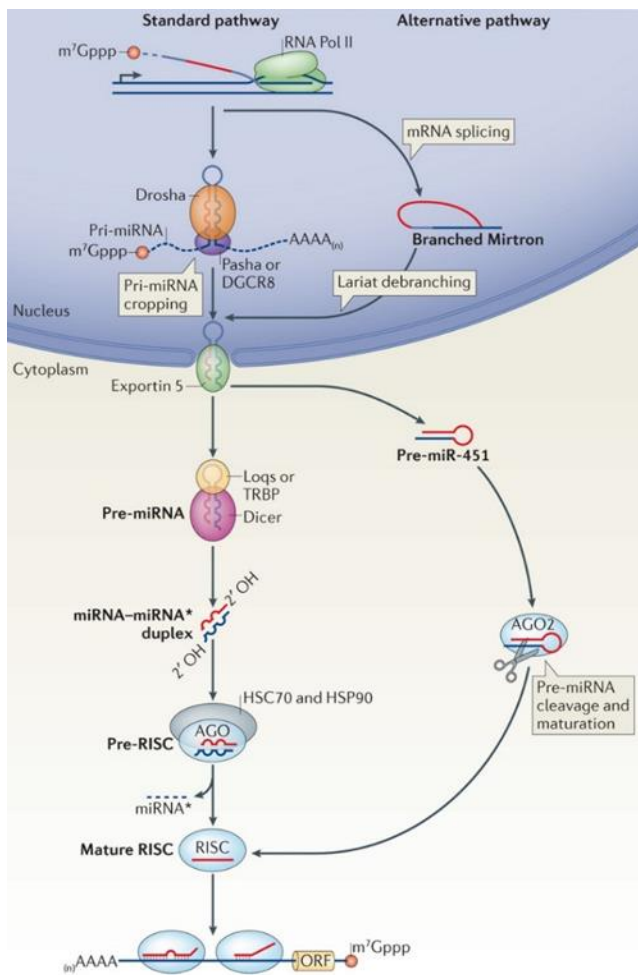


Abb. 2 miRNA Biogenese

Die Biogenese der miRNAs beginnt im Nucleus mit der Transkription der pri-miRNAs durch die Polymerase II im Nucleus. Durch die RNase III Endonuklease Drosha und DGCR8 wird die pre-miRNA aus der pri-miRNA freigesetzt. Es folgt ein Export in das Zytoplasma. DICER schneidet die pre-miRNA in 22 Nukleotid-Duplexe. Das Duplex wird in den

Silencing-Komplex pre-RISC aufgenommen, wo die Doppelhelix entwunden wird. Die pre-RISC wird in die mature RISC umgewandelt und die reife miRNA freigesetzt (Abbildung aus Ameres & Zamore, 2013).

2.3.2 miRNAs in Karzinomen

Ein Grund für das große wissenschaftliche Interesse an miRNAs ist, dass sie durch Ihre Vielzahl an Funktionen auch an pathophysiologischen Prozessen, wie der Karzinogenese, beteiligt sind. miRNAs können in OncomiRs sowie Tumorsuppressor-miRs unterteilt werden. OncomiRs sind bei der Karzinogenese meist hochreguliert. Sie entfalten ihr onkogenes Potential, indem sie Tumorsuppressorgene ansteuern. Durch Degradation der mRNA des Tumorsuppressors findet eine Induktion der Tumorgenese statt. Auf der anderen Seite ist die Expression von Onkogenen durch eine Herunterregulation von Tumorsuppressor-miRs weniger gehemmt, was zu einer Promotion der Karzinomentwicklung führen kann (Voorhoeve, 2010). In Brustkrebszellen wurde beispielsweise eine verminderte Expression der miRNA let-7 beobachtet. Diese miRNA unterdrückt normalerweise durch tumorsuppressive Eigenschaften den onkogenen Effekt von KRAS, CCND1, CK6 und MYC. Durch diese Minderexpression hat let-7 Einfluss auf die Entdifferenzierung der Zellen (Takahashi et al., 2015).

Bezüglich der Lokalisation der miRNA-Sequenzen auf der DNA berichteten Calin et al. (2004) erstmalig, dass 50 % der miRNAs auf krebssuspekten Loci oder *fragile sites* vorzufinden sind. Weiteres miRNA-Mapping bestätigte diese Annahme (Lagana et al., 2010).

miRNAs haben einen Einfluss in jedem Schritt der Tumorgenese, Progression und Metastasierung. Dementsprechend kann eine Dysregulation von miRNAs sowohl im Zellzyklus, der Apoptose, Angiogenese sowie Invasion beobachtet werden (Izumiya et al., 2011). Zu jedem Tumor gehört eine spezifische miRNA-Signatur, das miRNome. Es macht eine Qualifizierung der Tumorentität bezüglich der Malignität und klinikpathologischen Faktoren wie Progression, Prognose und Therapieansprechen möglich (Calin et al., 2006). Anhand der unterschiedlichen Expressionsmuster im miRNA-Profil kann der Ursprung der malignen Zellen detektiert werden (Lu et al., 2005; Rosenfeld et al., 2008; Volinia et al., 2006).

Lu et al. (2005) bewiesen einen globalen Verlust der miRNA-Expression in Krebszellen im Vergleich zu normalem Gewebe. Schlecht differenzierte Tumoren wiesen hierbei signifikant niedrigere miRNA-Niveaus auf als gut differenzierte Tumoren. Diese niedrigen miRNA-Niveaus resultieren aus einem genetischen Verlust, epigenetischem Silencing, Defekte im Biogenese-Pathway oder aus transkriptionaler Repression (Chang et al., 2008). Neben miRNA-Expressionsveränderungen wurden zudem Veränderungen eines weiteren Proteins der miRNA-Achse beobachtet. Sowohl DICER zeigte in verschiedenen Tumoren reduzierte Expressionsniveaus, als auch TARBP2, ein DICER stabilisierendes Protein, welches beim kolorektalen sowie Magenkarzinom *frame-shift* Mutationen aufweist (Smolarz et al., 2022; Karube et al., 2005; Melo et al., 2009).

2.4 Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA), uPA-Rezeptor (uPAR) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1)

Seit den späten 1980er Jahren ist eine Korrelation zwischen hohen uPA- (Urokinase-Plasminogen-Aktivator) und PAI-1-Konzentrationen (Plasminogen Aktivator-Inhibitor) und einer schlechteren Überlebensrate in nodal-negativen Brustkrebspatienten bekannt (Duffy et al., 1988; Jänicke et al., 1985). Beide Marker sind dabei Teil einer proteolytischen Kaskade, die wesentlich Einfluss auf die Entstehung und den Progress eines Tumors hat. uPA ist eine Serin-Protease, welche speziell auf das Proenzym Plasminogen wirkt und dieses in die aktive Serin-Protease Plasmin umwandelt (Dano et al., 2005; Duffy et al., 2004; Schmitt et al., 2010). Durch Degradation von Proteinen der Extrazellulärmatrix setzt Plasmin Wachstumsfaktoren wie den *fibroblast growth factor 2*, *transforming growth factor-beta* und *hepatocyte growth factor* frei. Diese Wachstumsfaktoren binden an ihre jeweiligen Rezeptoren und führen schließlich zu Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierung. Zudem werden spezifische Metalloproteasen durch Plasmin freigesetzt, die ebenfalls eine Degradation der ECM bedingen können. Damit spielt uPA eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese und im Tumorprogress des Brustkrebses (Duffy et al., 2014; Yadav, 2015; Deryugina et al., 2012; Duffy et al., 2014).

Daneben gibt es einen weiteren, direkten Weg, durch den uPA Einfluss auf die Tumorgenese des Mammakarzinoms haben kann. uPA bindet an seinen Rezeptor uPAR, der auf der Zellmembran sitzt und zur Weitergabe des Signals an die Zelle unterschiedliche Faktoren wie EGFR und weitere Signalwege nutzt. Das ausgelöste Signal wiederum setzt potenziell onkogene Kaskaden wie MAPK und Jak-Stat in Bewegung (D'Alessio et al., 2009; Schmitt et al., 2010). In verschiedenen Studien konnte in Mausmodellen gezeigt werden, dass eine Reduzierung von uPA eine Verminderung der Metastasierungsrate beim Mammakarzinom bewirkt. Hohe uPA-Konzentrationen gingen hingegen mit einem höheren Risiko einer Metastasierung sowie einem kürzeren progressionsfreien Überleben einher (Banys-Paluchowski et al., 2019).

uPAR hingegen interagiert einerseits mit einer Reihe von Integrinen und dem ECM-Protein Vitronektin und vermittelt dadurch Zelladhäsion und Migration (Lv et al., 2021; Reuning et al., 2003). Andererseits stimuliert er die Zellproliferation durch Bildung eines Komplexes mit dem $\alpha\beta 3$ -Integrin und dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR, ErbB1 oder HER1) (Eden et al., 2018). In einer Studie von Harel et al. (2019) konnte zudem mithilfe von Anti-uPAR *antibody drug conjugates* eine Tumorregression im TNBC-Mausmodell erreicht werden, wodurch deutlich wird, dass uPAR ein interessantes Ziel einer zielgerichteten Therapie darstellt.

Eine natürliche Limitation der Aktivität von uPA ist durch die beiden Protease-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 gegeben. Diese binden an den uPA-uPAR-Komplex und es wird die Endozytose eingeleitet (Dupont et al., 2009). Betrachtet man die natürliche Funktion von PAI-1, so würde man erwarten, dass PAI-1 im Tumor einen Gegenspieler zu uPA darstellt. Studien zeigten jedoch, dass eine hohe Expression von PAI-1 mit einer Progression des Tumors korreliert. Dies hängt u.a. mit der Angiogenese fördernden Wirkung von PAI-1 zusammen. So zeigten PAI-1-Inhibitoren eine Blockierung der Angiogenese und des Tumorwachstums (Masuda et al., 2013). Ein weiterer, die Tumorgenese fördernder Faktor von PAI-1, ist die anti-apoptotische Wirkung. Fang et al. (2012) konnten zeigen, dass PAI-1 die Apoptose von endothelialen Zellen im Tumor verhindert und damit das Wachstum begünstigt. Somit sind sowohl uPA als auch PAI-1 prognostische Marker, bei denen die Überexpression mit einer signifikant schlechteren Überlebensrate der Patienten einhergeht (Singer et al., 2019; Harbeck et al., 2000; Jänicke et al., 1990). Außerdem sind uPA und PAI-1 nicht nur prognostisch, sondern auch prädiktiv von Bedeutung und damit klinisch von

großer Relevanz. Harbeck et al. (2002) konnten darlegen, dass Patientinnen mit hohem uPA/PAI-1-Expressionsniveau eine Hochrisikogruppe darstellten und ein besseres Ansprechen auf adjuvante endokrine Therapie, vor allem aber auf adjuvante Chemotherapie hatten und von dieser wesentlich bezüglich Gesamt- und krankheitsfreies Überleben profitierten. Beim metastasierten primären Mammakarzinom korrelieren hohe uPA/PAI-1-Spiegel mit einem schlechten Ansprechen auf eine palliative Chemotherapie (Foekens et al., 1995). Im frühen Stadium ist aufgrund der hohen Proliferationsrate ein gutes Ansprechen auf die adjuvante Chemotherapie zu erwarten. Im späten, metastasierten Stadium ist die Erkrankung jedoch schon so weit fortgeschritten, dass von einem schlechten Therapieansprechen der palliativen Chemotherapie auszugehen ist (Harbeck et al., 2004). Daher wird sowohl von der *American Society of Clinical Oncology* (Harris et al., 2016) als auch von der deutschen Arbeitsgemeinschaft gynäkologische Onkologie (AGO) (Liedtke et al., 2017) die Empfehlung herausgegeben, uPA und PAI-1 beim frühen invasiven Mammakarzinom zu testen.

Beim TNBC sind uPA und PAI-1 derzeit nicht als prognostische oder prädiktive Marker etabliert. Diverse Studien zeigten, dass ER- und PR-negative Mammakarzinome ungeachtet des HER2-Status mit einer erhöhten Expression von uPA, PAI-1 und uPAR einhergehen (Bouchet et al., 1999; de Witte et al., 2001; Grøndahl-Hansen et al., 1995; Jänicke et al., 1991; Jänicke et al., 1990). Auch im TNBC konnte eine Überexpression von uPA und uPAR festgestellt werden (Duffy et al., 2012; Foekens et al., 2000). Eine Studie von Huber et al. (2016) zeigte, dass Interaktionen von uPAR mit uPA und IGF1R (Insulin-like growth factor 1 receptor) die Tumorgenese im TNBC fördern und damit einhergehend deren *Knockdown* zu einer Verminderung der Zelllebensfähigkeit, -migration und -invasion führt.

2.5 miR-7, miR-16, miR-27a

Neueste Erkenntnisse lassen vermuten, dass die uPA-, PAI-1- und uPAR-Expression bereits auf der Genebene durch Interaktion von auf deren mRNAs ausgerichteten miRNAs moduliert werden kann. Somit stellen nicht nur uPA, PAI-1 und uPAR mRNA- bzw. Proteinexpression, sondern auch die sie regulierenden miRNAs potentiell neue prognostische sowie prädiktive Faktoren beim

TNBC dar. Ziel dieses Forschungsprojekts war das miRNA-uPA-Rezeptor System auf neue Krebsbiomarker für die Beschreibung des klinischen Verlaufs der TNBC-Erkrankung sowie das Ansprechen auf Krebstherapeutika zu untersuchen.

Zunächst wurde durch *data mining* festgestellt, welche miRNAs mit mRNA von uPA, uPAR bzw. PAI-1 interagieren. Anschließend wurde in der wissenschaftlichen Literatur (MedLine) der pathophysiologische Zustand recherchiert (www.microRNA.org), bei welchem diese miRNAs von klinischer Relevanz sind. Die klinische Relevanz der selektierten miRNAs wurde durch Nutzung der BreastMark-Datenbank evaluiert (<http://glados.ucd.ie/BreastMark/>) und es wurden jene miRNAs identifiziert, die beim TNBC bzw. Ovarialkarzinom (Gegenstand der Forschung einer zweiten Arbeitsgruppe) hoch- bzw. herunterreguliert sind.

Eine Reihe dieser ausgewählten miRNAs wurde in umfangreichen *in silico*-Analysen (M. Schmitt, M. Aubele und R. Napieralski, unveröffentlicht) weiter untersucht. Unter diesen so identifizierten miRNAs befinden sich einige miRNAs, darunter miR-7, miR-16 und miR-27a, die zusätzlich möglicherweise die mRNAs von Plasmin(ogen) sowie von pro-uPA-Aktivatoren (miR-7: Hepsin; miR-16: TMPRSS4; miR-27a: Matriptase, TMPRSS4) als Zielstrukturen erkennen. Basierend auf den beschriebenen Vorarbeiten und publizierten Hinweisen zur Relevanz beim Brustkrebs (siehe folgende Abschnitte) wurden diese drei miRNAs für weitere Analysen ausgewählt.

miR-7, eine aus 23 Nukleotiden bestehende miRNA, wurde erstmals 2001 identifiziert. Drei verschiedene Gen-Loci kodieren für miR-7: 9q21, 15q26, 19q13. Die daraus resultierenden drei Vorläufer-miRs pri-miR-7-1, pri-miR-7-2, und pri-miR-7-3 können in dieselbe mature miRNA-Sequenz umgewandelt werden (Kalinowski et al., 2014; Lagos-Quintana et al., 2001). Die mature miR-7 wird in einen RISC-Komplex aufgenommen, welcher die Ziel-mRNA durch inkomplette Basenpaarung mit der miRNA erkennt und anschließend eine Inhibition oder Destabilisierung der mRNA induziert (Li et al., 2014; Pichler et al., 2015). miR-7 hat im menschlichen Körper verschiedene Funktionen. Sie reguliert mehrere grundlegende Prozesse, darunter Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Migration (Yan et al., 2014). Neuere Erkenntnisse zeigen zudem, dass miR-7 tumorsuppressiv wirkt. Es zeigt sich einen Zusammenhang zwischen miR-7 und dem Wachstum, der Migration und Invasion bei einer Vielzahl von Karzinomen, unter anderem auch im Brustkrebs (Liu et al., 2014; Ma et al., 2014; Marzioni et al., 2014; Meza-Sosa et al., 2014).

Zwei entscheidende Proteine der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) und damit auch der Entstehung und Metastasierung von Krebs, sind E-Cadherin und Vimentin. Die Funktion von E-Cadherin liegt unter anderem in der Stabilisierung der Zelladhäsion von Epithelzellen, wohingegen Vimentin bei der Zellmigration eine koordinierende Rolle spielt und eine Überexpression in verschiedenen Krebszellen beobachtet werden kann (Battaglia et al., 2018; Satelli et al., 2011). In von Li et al. (2020) konnte gezeigt werden, dass miR-7 im Brustkrebs das *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM) inhibiert, damit die E-Cadherin-Expression fördert, die Vimentin-Expression reduziert und hierdurch wiederum Tumorwachstum und Metastasierung im Brustkrebs inhibiert.

Des Weiteren konnte eine Herunterregulation von miR-7 im metastasierenden Brustkrebsgewebe im Gegensatz zu normalem Brustgewebe festgestellt werden. Eine erhöhte Expression von miR-7 ging mit einer Inhibition des Wachstums und der Invasivität von Brustkrebszellen einher. Somit ist miR-7 ein vielversprechendes Ziel für eine zielgerichtete onkologische Therapie (Kong et al., 2012). PAK1 (P21 aktivierte Kinase 1) wird in verschiedenen humanen Krebsgeweben exprimiert und beeinflusst die Mitose von Tumorzellen, Regeneration des Zytoskeletts sowie Zellmigration und Apoptose (Radu et al., 2014). Indem miR-7 an die 3'-UTR von PAK1 bindet, inhibiert sie die Expression von PAK1, was wiederum in einer verminderten Aktivität und damit einhergehend in einer Inhibition des Brustkrebszellwachstums resultiert (Reddy et al., 2008). Ebenfalls das Brustkrebszellwachstum vermindern ist der negative Einfluss von miR-7 auf die EGFR-Expression und den Proteinkinase-B-Signaltransduktionsweg (Webster et al., 2009). miR-7 inhibiert die Invasion und Metastasierung von Brustkrebszellen unter anderem, indem es FAK (*focal adhesion kinase*), einen die Zellproliferation beeinflussenden Faktor, negativ reguliert. Erhöhte FAK-Expressions-Niveaus sind dementsprechend in metastasierenden Mammakarzinomen mit schlechter Prognose vorzufinden (Jia et al., 2014; Kong et al., 2012; Webster et al., 2009). Die miR-7-Expression korreliert somit negativ zu Brustkrebszellwachstum, -invasion und -metastasierung. Zudem wurde miR-7 in einer Studie von Foekens et al. (2008) als eine von vier miRNAs identifiziert, die mit dem metastasiefreien Überleben von Nodal-negativen, Östrogenrezeptor-positiven Patientinnen assoziiert ist.

miR-16 ist eine der ersten miRNAs, bei der eine Rolle in der Karzinogenese, Proliferation und Metastasierung nachgewiesen werden konnte. Sie liegt auf dem Chromosom 13p14 und inhibiert die Expression der Onkogene BCL2 (B Cell Lymphoma 2) und MCL1 (Myeloid Cell Leukaemia 1). Damit ist miR-16 eine Tumorsuppressor-miR (Xue et al., 2014). Zusätzlich hemmt miR-16 in normalem Gewebe die Aktivität von CCND1 und WNT3A mRNA und nimmt so durch indirekten Zellzyklusarrest in der G1-Phase Einfluss auf Zellproliferation, -invasion und -überleben. Durch die Herunterregulation von miR-16 im kranken Gewebe kommt es zu einer verringerten Hemmung von CCND1 und WNT3A mRNA, was wiederum die Karzinogenese fördert (Bonci et al., 2008). Liang et al. (2015) bewiesen in ihrer Studie zudem eine Assoziation von miR-16 zum FEAT Onkogen (*faint expression in normal tissues, aberrant overexpression in tumors*), welches einen wesentlichen Einfluss in der Tumorgenese durch Suppression der Apoptose hat. Es zeigte sich, dass miR-16 FEAT supprimieren und damit die Apoptose von Krebszellen fördern konnte (Liang et al., 2015). Außerdem hat mir-16 durch Cyclin E1 (CCNE1) Einfluss auf den Zellzyklus. CCNE1 reguliert die Überleitung einer Zelle von der G1 in die S-Phase. Durch post-transkriptionelle Herunterregulation von CCNE1 führt miR-16 einen Zellzyklusarrest in der G0/G1-Phase herbei und bewirkt somit eine Suppression der Zellproliferation (Wang et al., 2009).

miR-27a ist eine 22 Nukleotid-lange miRNA, die auf dem Gen-Locus 19p13.13 kodiert ist. Neuere Studien zeigten, dass miR-27a eine Rolle in der Tumorgenese von Malignomen der Nieren, Brust, Magen und Cervix spielt (Gottardo et al., 2007; Z. Liu et al., 2014; Mertens-Talcott et al., 2007; Wang et al., 2009). Bekannt ist, dass der Wnt/ β -Catenin Signalweg mit der Proliferation und Migration von Brustkrebs assoziiert ist. miR-27a begünstigt die Proliferation wiederum durch Steuerung von SFPR1 via dem Wnt/ β -Catenin Signalweg (Kong et al., 2017). Außerdem zeigten Chen et al. (2020), dass miR-27a GSK-3 β herunterreguliert, was wiederum Wnt/ β -Catenin-assoziierte, proliferative Faktoren aktiviert und damit Zellproliferation und -invasion fördert. Die Proteine Sp1, Sp3 und Sp4 werden in Karzinomen, ebenfalls in Brustkrebszellen, überexprimiert und fördern die Angiogenese und Proliferation der Tumorzellen. ZBTB10 ist ein Suppressor der Sp-Proteine und wird wiederum von miR-27a gesteuert. Mertens-Talcott et al. (2007) führten eine Transfektion von *antisense* miR-27a (as-miR-27a) in MDA-MB-231 Brustkrebszellen durch. Hieraus resultierte eine Überexpression von ZBTB10 mRNA und eine verminderte Expression von

Sp1, Sp3 und Sp4 auf mRNA und Protein-Niveaus. Eine Überexpression von miR-27a und ZBTB10 führen zu einer kleineren Zahl an Krebszellen in der S-Phase des Zellzyklus und zu einer erhöhten Zahl an Zellen in der G0-G1- Phase (durch ZBTB10) und G2-M-Phase (durch miR-27a). Damit ist das onkogene Verhalten von miR-27a unter anderem auf einer Suppression von ZBTB10 zurückzuführen (Tang et al., 2012; Mertens-Talcott et al., 2007). In einer Studie von Ren et al. (2015) konnte eine Überexpression von miR-27a in TNBC Krebszelllinien MDA-MB-435 und MD-MB-231 im Vergleich zu der epithelialen Brustzelllinie MCF10A festgestellt werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine Überexpression von miR-27a eine Herunterregulation von CDC27 hervorruft, was wiederum eine Reduktion der Radiosensitivität der Zellen herbeiführt (Ren et al., 2015). Eine Meta-Analyse verschiedener Studien bezüglich der prognostischen Relevanz von verschiedenen miRNAs beim TNBC ergab, dass eine erhöhte miR-27a/b Expression mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert ist (Lü et al., 2017). Zudem scheinen miR-27a wie auch miR-16 die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wie Cisplatin oder Paclitaxel zu modulieren (Teoh et al., 2017).

3. Ziel der Studie

Die personalisierte Brustkrebsmedizin verfolgt die Idee, eine auf den Patienten maßgeschneiderte und auf die molekularen Eigenschaften des Tumors zielgerichtete Therapie anbieten zu können. Der triple-negative Brustkrebs (TNBC) stellt eine aggressive Krankheit dar, die häufig jüngere Patientinnen betrifft und sich durch Invasivität und schnelle Metastasierung auszeichnet. Bislang besteht für diese Entität, im Gegensatz zu weiteren Mammakarzinom-Subtypen, keine individualisierte und zielgerichtete Therapie und geht für betroffene Patientinnen mit einer ungünstigen Prognose einher. Daher ist es notwendig, neue prognostische und prädiktive Biomarker zu finden, um die Aggressivität des Tumors und den Nutzen des Einsatzes einer gewissen Therapie abschätzen zu können. Verschiedene Faktoren des uPA-Systems werden als Krebsbiomarker mit prognostischer Relevanz bereits seit einigen Jahren in der therapeutischen Evaluation des nodal-negativen Mammakarzinoms verwendet.

miRNAs spielen durch Herunterregulation von Tumorsuppressoren und Überexprimierung von Onkogenen eine entscheidende Rolle in der Entstehung, Progression und Metastasierung von Tumoren. Die Arbeitshypothese unserer Forschungsgruppe bestand darin, dass die uPA-, PAI-1- und uPAR-Expression bereits auf der Genebene durch Interaktion von auf deren mRNAs ausgerichteten miRNAs moduliert werden kann. Dadurch eignen sich nicht nur uPA, PAI-1 und uPAR mRNA- bzw. Proteinexpression, sondern auch die sie regulierenden miRNAs potentiell als neue prognostische sowie prädiktive Faktoren beim TNBC. Somit war es Ziel dieses Projekts, das miRNA-uPA-Rezeptor-System auf neue Krebsbiomarker für die Beschreibung des klinischen Verlaufs der TNBC-Erkrankung sowie das Ansprechen auf Krebstherapeutika zu untersuchen.

Die spezifischen Forschungsziele umfassten:

1. Die Etablierung von qPCR-Assays für miR-7, miR-16 und miR-27a und Durchführung von quantitativen Analysen
2. Korrelation der miRNA-Expressionsdaten mit klinikopathologischen Faktoren
3. Evaluation der prognostischen Relevanz und Korrelation der miRNA-Expressionsdaten mit dem Ansprechen auf Chemotherapie

4. Korrelation der miRNA-Expression (Immunhistochemie an Tissue-Microarrays durch Vorarbeiten) mit uPA und PAI-1 Protein-Expressionswerten

Sollte sich eine miRNA als signifikant prognostischer oder prädiktiver Biomarker darstellen, so kann - nach Validierung in größeren, unabhängigen Kollektiven - einerseits die Aggressivität des Tumors besser eingeschätzt werden und andererseits kann so durch Einteilung in Hoch- und Niedrigrisiko-TNBC-Patienten eine Evaluation stattfinden, ob eine adjuvante Chemotherapie empfehlenswert und aussichtsreich ist. In einem weiteren Schritt könnte eine solche miRNA zielgerichtet abgeschaltet oder hochreguliert werden und bei Erfolg das Ziel einer zielgerichteten Therapie darstellen.

4. Material und Methoden

4.1 Patientenkollektiv

Das verwendete Patientenkollektiv umfasst 97 Frauen mit diagnostiziertem, triple-negativem Brustkrebs. Einschlusskriterien waren neben der histopathologisch gesicherten Diagnose TNBC, die Erhebung von *Follow-up* Daten, die Verfügbarkeit des Tumorgewebes sowie eine Einverständniserklärung der Patientinnen. Keine der eingeschlossenen Patientinnen erhielt eine neoadjuvante Chemotherapie, 67 eine adjuvante Therapie. Sie wiesen ein durchschnittliches Alter von 59,53 Jahren auf, wobei die jüngste Patientin bei Exzision des Tumors 30 Jahre alt war, die älteste hingegen 96 Jahre alt.

Das Tumorgewebe stammt aus der Brustkrebsgewebekbank der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar und wurde zwischen 1988 und 2010 unter Bewilligung der Ethikkommission des Klinikums rechts der Isar gesammelt. Die mittlere Follow-up Zeit beträgt 98,06 Monate (Minimum 0 Monate, Maximum 286 Monate) für das Gesamtüberleben sowie 87,14 Monate (Minimum 0 Monate, Maximum 269 Monate) für das krankheitsfreie Überleben. Während der Follow-up-Zeit erlitten 75 Patientinnen ein Lokalrezidiv und 54 Patientinnen verstarben. Die Studie wurde unter Einhaltung der *Declaration of Helsinki* durchgeführt.

4.2 Reagenzien und Materialien

Folgende Reagenzien und Materialien wurden verwendet:

Tab. 3 Zellkultur

Zellkultur Flaschen (25 cm², 75 cm², 175 cm²)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
HERACELL 150 i CO₂ Inkubator	Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge	Rotina 48R, Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Mikroskop	CK 30, Olympus, Tokio, Japan
DMEM (dulbecco's modiefied eagle`s medium) + Glutamax	#61965-026, Gibco, Invitroge, Paisley, United Kingdom
DMSO (dimethyl sulfoxide)	#317275, Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
EDTA (ehtylenediaminetetraacetic acid), 1%	#L2113, Biochrom, GmbH, Berlin, Deutschland
FBS (Fetal bovine serum)	#10270-106, invitrogen, Carlsbad, USA
Hemocytometer	0.1mm, Neubauer Zählkammer, Laboroptik Ltd, United Kingdom
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethansulfonic acid)	#15630-080, Gibco, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerkbank (Laminar flow cabinet, Hera Safe)	M1199, Heraeus, Hanau, Deutschland
L-Arginin	#A8094, Sigma, München, Deutschland
L-Asparagin	#A7094, Sigma, München, Deutschland
Mikroskop Abdeckung	#005540 Menzel-Glaeser, Braunschweig, Deutschland
PBS (Phosphate-buffered saline)	#10010-015, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Pipette	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Tris-gepufferte Saline	60.5 g Trizma Base, 1 L destilliertes H ₂ O, 2 N Chlorwasserstoff, 90 g Natriumchlorid. pH 7.6
Ethanol	Department für Pathologie, Technische Universität München, Deutschland
Trizma Base	T1503, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Tab. 4 qPCR

All Prep DNAN/RNA/miRNA Universal Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
miScript II RT-Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
miScript PCR-Starter Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
miScript SYBR Green PCR-Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
miScript Primer Assays	Quiagen, Hilden, Deutschland
Stratagene Mx3005P quantitative PCR	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Nanodrop	Thermo Scientific, Peqlab, Erlangen, Deutschland
PCR 96-well TW-MT-plate	#52450, Qiagen, Hilden, Deutschland
Quiacube	Thermo Scientific, Peqlab, Erlangen, Deutschland
RNase-free DNase set (50)	SensoQuest, Goettingen, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Biozym Diagnostik, Oldendorf, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen	Biozym Diagnostik, Oldendorf, Deutschland
Thermocycler	Quiagen, Hilden, Deutschland
TRizol LS Reagenz	#10296-010, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Luftdichte Waage	Sartorius Basic, Ismaning, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Hera Freeze Basic	Thermo Scientific, Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research Plus, Wesseling, Deutschland
Filter Tips für Quiacube	Quiagen, Hilden, Deutschland

Tab. 5 ELISA

Tris-gepufferte Saline	0.1 M Trizma Base und 0.125 M NaCl, justiert zu pH 8.5 mit HCl
Gewebeextraktionspuffer	1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in Tris-gepufferten Saline
ELISA Kit	Nr. 894, American Diagnostica, Darmstadt, Deutschland
Destilliertes H₂O	Department für Pathologie, Technische Universität München, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
96-Well Microtiter Platten	ThermoFisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Pipette	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen	Biozym Diagnostik, Oldendorf, Deutschland

4.3 Vorversuche mit Zelllinien

4.3.1 Auswahl der Zelllinien

Die Zelllinien MDA-MB-231 und OVMZ-6 wurden für die Vorversuche und Etablierung eines Analysen-Workflows verwendet. MDA-MB-231 (CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Germany) ist eine Brustkrebs-Zelllinie, die aufgrund der fehlenden Expression von HER2, ER und PR dem Genotyp des Triple-negativen Brustkrebses entspricht. OVMZ-6 ist eine Ovarialkarzinom-Zelllinie, die von Prof. Dr. med. Volker Möbus (Frankfurt, Deutschland) aus einem serösen Adenokarzinom, FIGO IV, extrahiert und kultiviert worden ist. Die Biomarker uPA, uPAR und PAI-1 werden in beiden Zellreihen exprimiert.

4.3.2 Kultivierung von Mamma- und Ovarialkarzinomzellen

Die Zelllinien wurden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und in einem HERACELL-CO₂ Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium bestand aus DMEM supplementiert mit 10 % FBS, 1 % HEPES und 0.2 % Arginin/Asparagin. Es wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt. Alle drei bis vier Tage erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80 % und wurden dann gesplittet. Zum Ablösen der adhärennten Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt, 2 ml einer EDTA-Lösung (10 ml EDTA 1%, 190 ml PBS) in die Kulturflasche gegeben, diese geschwenkt und für 3-4 min im Inkubator bei 37 °C inkubiert, um die Ablösung zu induzieren.

Nachdem die Lösung der Zellen unter dem Mikroskop verifiziert wurde, konnten die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, resuspendiert und in ein Röhrchen abgenommen werden. Im Anschluss daran wurden die Röhrchen für 5 min bei 320 x g zentrifugiert. Das Waschen wurde zweimal wiederholt. Der Überstand wurde entfernt, 2 ml des DMEM zum Zellpellet hinzugefügt und resuspendiert. In die neue Kulturflasche wurden 10 ml Medium hineingegeben. Die Suspension wurde mit einer Volumen-Verdünnung 1:20 in die neuen Flaschen übertragen.

4.3.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Durch Kryokonservierung konnten die Zellen über einen längeren Zeitraum bei -196°C gelagert werden. Hierfür wurden die Zellen wie beim Passagieren mit der EDTA-Lösung abgelöst und mit PBS gewaschen. Nach 2-3 min Zentrifugation bei 320 x g wurde der Überstand verworfen. Je nach Größe des Pellets erfolgte die Resuspension in 400-800 µl Einfriermedium, welches sich aus 10 % DMSO und 90 % FBS zusammensetzte). Die Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt, um einen Temperaturabfall von 1 °C pro Stunde zu gewährleisten und einen Tag bei -80°C in einem Styroporbehälter eingefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung der Zellen in einem Stickstofftank bei -196°C.

Für die Reaktivierung der eingefrorenen Zellen wurde das Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und vorgewärmtes Nährmedium (DMEM, 10 % FBS, 1 % HEPES und 0.2 %

Arginin/Asparagin) zu den gefrorenen Zellen hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 320 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet erneut in Medium resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt. Über Nacht wurde eine T75-Flasche mit 3-4 ml 100 % FBS in einem Inkubator erwärmt (37 °C, 95 % Luft/ 5 % CO₂). Hierzu wurde anschließend 6,5 ml frisches Nährmedium hinzugegeben. Das Pellet wurde in 1,5 ml Nährmedium resuspendiert und in die Zellkulturflasche übertragen.

4.3.4 Einbettung von Zellen in Fibrin

Im Rahmen der Vorversuche ist ebenfalls beobachtet worden, wie sich die Versuchsbedingungen bei Extraktion von RNA und anschließender RT-qPCR von fixierten Zellen verhalten. In einer T75-Zellkulturflasche mit mindestens 1×10^6 Zellen wurden die Zellen abgelöst, in PBS gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml 10 % Formalin/PBS (stabilisiert mit 10 % Methanol, MERCK, Darmstadt, Germany) resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen bei 4 °C, 330 x g für 5 min zentrifugiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit Tris-gepufferter Saline. Die Zellen wurden wieder zentrifugiert und der Überstand entfernt.

Das Zellpellet wurde halbiert und jeweils mit 75 µl Thrombin (100 U/ml) (vom bovinen Plasma, 40-165 NIH units/mg Protein, verdünnt zu 10 U/ml in H₂O dist., Sigma-Aldrich), 375 µl Casein (10 mg/ml Tris-HCL, pH >8) (von Rindermilch, C-5890, Sigma-Aldrich) und 300 µl Fibrinogen (25 mg/ml aqua dest.) (von humanem Plasma, F-4883, Sigma-Aldrich) versetzt. Die Suspension wurde bei 4 °C über Nacht gekühlt, um einen Fibrin-*Cloth* zu bilden. Am nächsten Tag wurde der *Cloth* in eine Biopsie-Kapsel transferiert und in Paraffin eingebettet.

4.3.5 RNA/DNA Extraktion

Zur Erlangung reproduzier- und auswertbarer Ergebnisse wurde ein standardisierter Arbeitsprozess angewandt wie in **Abbildung 3** dargestellt.

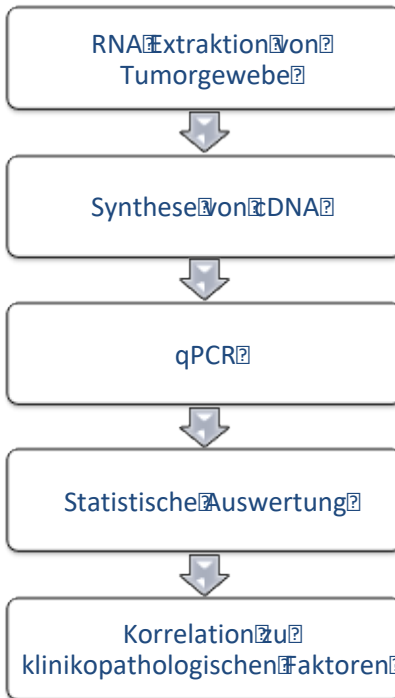


Abb. 3 Workflow der RNA Extraktion

Zunächst wurde die RNA aus Tumorgewebe extrahiert. Mittels reverser Transkription wurde die cDNA synthetisiert. Anschließend folgte die Analyse. Mithilfe der gewonnenen Daten wurde eine statistische Auswertung und Korrelation zu klinikopathologischen Faktoren durchgeführt.

Im ersten Schritt unseres RT-qPCR-Arbeitsprozesses wurde die RNA mit dem Qiacube extrahiert. Nachfolgend wird die Extraktion von RNA mittels Qiagen RNA-Extraktions-Kit erläutert.

4.3.5.1 RNA-Extraktion von Zellen mittels QIAcube und Qiagen RNA-Extraktions-Kit

Der QIAcube ist ein automatisiertes Probenvorbereitungsgerät der Firma Qiagen zur Purifikation von DNA, RNA oder Proteinen. Der Vorteil dieser maschinellen Extraktion liegt in standardisierten Arbeitsabläufen. Bis zu 12 Proben können gleichzeitig bearbeitet werden. Für die Extraktion aus Zelllinien kam der miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) zum Einsatz.

Zur Vorbereitung einer RNA-Extraktion mithilfe des QIAcubes wurden die Zellen in PBS gewaschen, zentrifugiert und das PBS aspiriert. Nach einer Wiederholung dieses Schrittes wurde

die Zellzahl bestimmt und 2 Mio. Zellen in ein neues Röhrchen transferiert. Dieses wurde bei 400 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin ist das Pellet mit 700 µl *Qiazol Lysis Reagent* versetzt worden. Das Lysat wurde gemischt und bei 11.000 x g für 1 min zentrifugiert. 140 µl Chloroform wurden hinzugefügt. Nach 15 sec Mischen wurde das Lysat für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C.

Es entstanden 3 Phasen, wobei die obere wässrige klare Phase die RNA mit der miRNA enthielt. Der klare Überstand wurde in ein neues 2 ml *Safelock Tube* abgenommen. Im Anschluss daran wurden die Proben mit dem Quiacube und dem miRNeasy Mini-Kit Protokoll laut Quiacube Protokoll-Worksheet (ProtocolSheet_RNA_miRNeasyMini_AnimalTissuesAndCells_Aqueous Phase_V2) aufgearbeitet.

4.3.5.2 RNA-Extraktion von in Fibrin eingebetteten Zellen

Von dem hergestellten in Paraffin eingebetteten Fibrin-*Cloth*-Block wurden zunächst 5-10 µm dicke FFPE-Anschnitte mittels des Forschungsmikrotoms der Pathologie TUM hergestellt. 1-2 Schnitte wurden direkt in je 1,5 ml-Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben. Zur manuellen Entfernung des Paraffins wurden 500 µl Xylol jedem Röhrchen zugegeben, gemischt und 5 min lang bei maximaler Geschwindigkeit von 20.000 x g zentrifugiert (Eppendorf 5417 R Tischzentrifuge). Das Xylol wurde aspiriert. Dieser Xylol-Waschvorgang wurde nochmals wiederholt. Das Pellet wurde mit 1 ml 100 % EtOH gewaschen, vermengt, für 5 min bei 20.000 x g abzentrifugiert und der Ethanol-Überstand vorsichtig abgenommen. Der EtOH-Waschschritt wurde nochmals mit 1 ml EtOH wiederholt. Das Pellet wurde anschließend für 10 min luftgetrocknet und in einem Thermomixer für 5 min bei 55 °C inkubiert, bis das EtOH gänzlich verdampft war. Es folgte die Extraktion der RNA mit dem miRNeasy FFPE Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

240 µl PKD Puffer wurden hinzugefügt, die Probe gemischt und 1 min lang bei 11.000 x g zentrifugiert. Folgend wurden 10 µl der Proteinase K zugegeben und durch Pipettieren vermischt.

Der Ansatz wurde bei 56 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Inkubation bei 80 °C für 15 min zur Auflösung der Formalin-induzierten Vernetzung innerhalb der Probe und eine anschließende Abkühlung für 3 min auf Eis. Es folgte ein Zentrifugations-Schritt für 15 min bei 20.000 x g. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Röhrchen transferiert und ein DNase I mix hergestellt. Die Proben wurden in den Qiacube transferiert und das Programm inklusive DNase I Verdau laut miRNeasy FFPE kit QIAcube-Protokoll und Worksheet (ProtocolSheet_RNA_miRNeasyMini_AnimalTissuesAndCells_AqueousPhase_V2) gestartet.

4.3.5.3 RNA-Extraktion von Gewebe

Für die Extraktion von RNA aus Tumorgewebe wurde der AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit der Firma Qiagen verwendet, welches eine gleichzeitige Extraktion von DNA und RNA möglich macht. Da die DNA für ein anderes Projekt verwendet werden sollte, entschied man sich für diese spezielle Extraktionsmethode.

Als Erstes wurde eine Mischung von RLT Lysis Buffer und Mercaptoethanol (Gibco™ 2-Mercaptoethanol) hergestellt (10 µl Mercaptoethanol pro 1 ml Buffer). Die in flüssigem Stickstoff gelagerte Probe wurde herausgenommen und ein 10-20 mg Gewebestück mittels Skalpell abgetrennt. Um möglichst wenig Fettgewebe hierbei zu verwenden, wurde die Probe halbiert und das Gewebestück von der Schnittkante genommen. Sofort wurde 600 µl des RLT Lysis Buffer/Mercaptoethanol Mix zu dem Gewebe hinzugeben und so lange resuspendiert, bis sich das Gewebe vollständig gelöst hat. Zur Homogenisierung wurde das Lysat direkt in eine *QIAshredder spin column*, übertragen. Dies wurde für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, der Durchfluss wurde in ein neues Röhrchen übertragen und für die weitere Aufreinigung mit dem QIAcube verwendet.

Es erfolgte die DNA-Extraktion gemäß dem Protokoll AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit Part A des Qiacube. Die eluierte DNA wurde im Anschluss bei -80 °C gelagert. Der Durchfluss, der im mittleren Rotor Adapter Sammelgefäß gelagert war, wurde in ein neues 2 ml-Zentrifugenröhrchen transferiert, 150 µl Chloroform zugegeben und die Mischung stark

vermischt. Durch eine Zentrifugation bei 4 °C für 3 min und 20.000 x g wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase konnte dann in ein neues 2 ml-Röhrchen übertragen und die RNA-Extraktion mit dem Qiacube gemäß dem AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit Part B Protokoll durchgeführt werden. Es folgte eine photospektrometrische Bestimmung der RNA-Konzentration (siehe Kapitel 4.3.5.5) und eine Lagerung bei -80 °C.

4.3.5.4 Messung der RNA-Konzentration

Der NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (Wilmington, USA) wurde verwendet, um die RNA- sowie DNA-Konzentration zu bestimmen. Zum Einsatz kamen in der Nanodrop Software der Filter „RNA40“. 1 µl Wasser wurde auf das Ende des fiberoptischen Kabels, welches sich im unteren Sockel befindet, pipettiert, um das Messergebnis auf null zu kalibrieren (Blank). Ein weiteres fiberoptisches Kabel befindet sich im oberen Sockel und ist anschließend auf den Tropfen aufgesetzt worden, sodass der Tropfen eine Verbindung zwischen beiden Kabeln herstellt. Das pulsierende Licht einer Xenon Lampe wurde durch den Tropfen geschickt und das ankommende Licht durch das Spektrophotometer mithilfe einer CCD Matrix analysiert. Sämtliche *OD ratios* (OD 260 nm : 280 nm und OD 260 nm : 230 nm) wurden automatisch von der Nanodrop Software berechnet und die RNA-Konzentration der Proben aus der Absorptionsrate (OD 260 nm) mit den Skalierungsfaktor 1 OD 260 = 40 ng/µl unter Abzug des Blank-Spektrums verrechnet. Bezüglich der Messungen der DNA-Konzentration musste die Einstellung „DNA-50“ für dsDNA vorgenommen werden. Als Skalierungsfaktor wurde hierbei 1 OD 260 = 50 ng/µl gerechnet. Die Analyse lief identisch mit der der RNA-Messungen ab.

Neben der gemessenen Konzentration wurden die folgenden Werte mit protokolliert: *Ratio* 260/280 und 260/230. Die *Ratio* 260/280 beschreibt das Verhältnis der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge und ist ein Indikator für die Reinheit der extrahierten RNA bzw. DNA bezüglich Kontamination mit Proteinen oder Lösungsmitteln wie Phenol. Bei der RNA spricht ein Quotient von 2.0 für eine reine vorliegende RNA. Für die DNA gilt ein Wert von 1.8 als rein. Werte, die kleiner oder größer dieser optimalen Zahlen sind, sind ein Zeichen für eine Kontamination mit

Protein, Phenol oder anderen Substanzen. Die Ratio 260/230 ist ebenfalls ein Marker der Reinheit für Nucleinsäuren. Hierbei spricht ein Quotient von 1.8-2.2 für reine RNA oder DNA.

4.3.6 Synthese von cDNA

Eine Voraussetzung für die Durchführung einer qPCR ist die Umschreibung der gewonnenen RNA in komplementäre DNA (cDNA). Hierfür wurde der miScript II RT Kit von Qiagen verwendet, welcher durch seine zwei Puffer, dem HiSpec und HiFlex Puffer die Detektion von multiplen miRNAs von einer einzigen cDNA erlaubt. Der 5x miScript HiSpec Puffer ermöglicht die selektive Umschreibung von miRNAs, snoRNAs (small nucleolar RNAs) und snRNAs (small nuclear RNAs) in cDNA. Der 5x miScript HiFlex Puffer wiederum ermöglicht die Konversion aller RNA-Subtypen (Vorläufer-RNA, mature RNA, nicht-kodierende RNA und mRNA) in cDNA (**Abb. 4**).

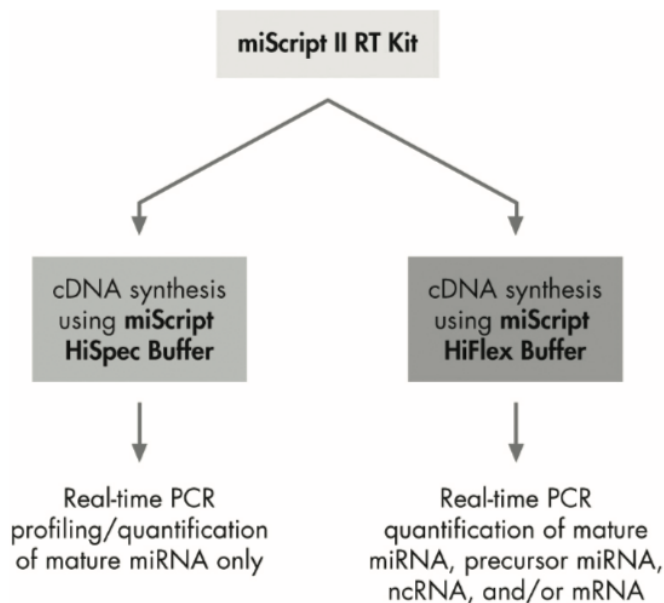


Abb. 4 Detektion verschiedener RNA durch die Puffersysteme HiSpec und HiFlex

Der miScript HiSpec Puffer ist für die selektive Konversion von maturaer miRNA und der HiFlex Puffer für die Konversion aller RNA-Subklassen zu verwenden (Abbildung aus EN-miScript-PCR-System-Handbook, Qiagen).

Die mature miRNA wird bei Verwendung des HiSpec Puffers durch die Poly-A-Polymerase polyadenyliert und mithilfe von Oligo-dT Primern revers in cDNA transkribiert. Durch den

miScript Primer Assays zusammen mit dem miScript SYBR Green PCR Kit ist eine Quantifizierung von maturer miRNA durch real-time PCR möglich (**Abb. 5**).

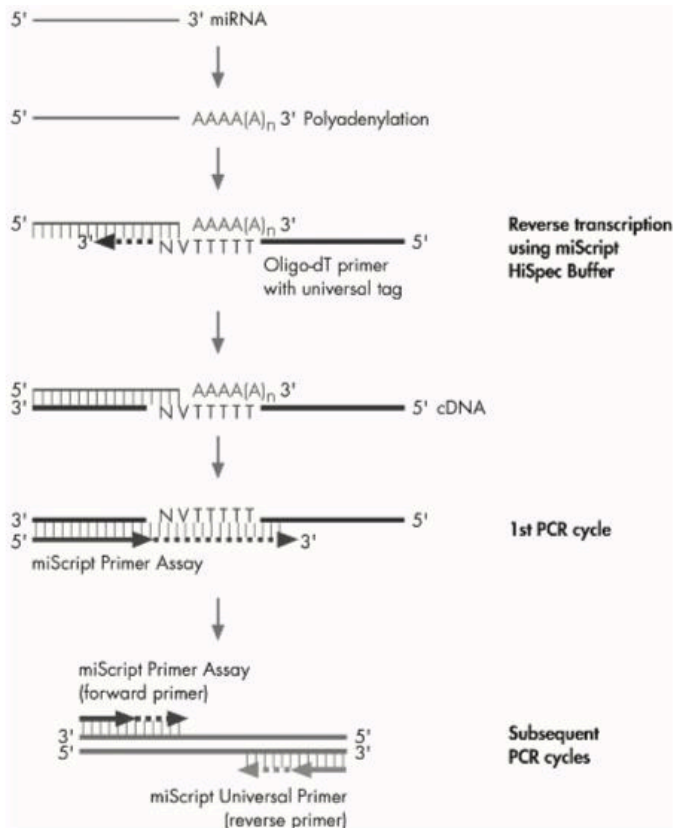


Abb. 5 Selektive Konversion von maturer miRNA in cDNA mit dem HiSpec Puffer

Polyadenylierung der maturen miRNA durch die Poly-A-Polymerase mithilfe von Oligo-dT Primern (Abbildung aus EN-miScript-PCR-System-Handbook, Qiagen).

Zunächst wurde die RNA auf Eis aufgetaut, der 10 x miScript Nucleics Mix, das RNase freie Wasser und der 5 x miScript HiSpec Puffer wurden bei Raumtemperatur (15-25 °C) aufgetaut. Die Lösungen wurden gemischt und zentrifugiert. Anschließend fand eine Lagerung auf Eis statt. Wie in **Tabelle 6** beschrieben wurden der 5 x miScript HiSpec Puffer, der 10 x miScript Nucleics Mix und miScript Reverse Transkriptase Mix in mit einem 10 % Volumenüberschuss zusammengemischt, um Pipettierverluste auszugleichen. 8 µl dieses Master Mixes wurden in ein Eppendorf Röhrchen vorgelegt. Zu jedem Röhrchen wurde je nach Konzentration zwischen 100 ng und 1 µg RNA plus RNase freies Wasser in einem Gesamtvolumen von 12 µl gemischt, sodass

man ein Reaktionsvolumen von 20 µl erhält. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C für 60 min, anschließend bei 95 °C für 5 min, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Zum Schluss wurden die Proben auf Eis gestellt.

Tab. 6 Herstellung des Master Mix für die reverse Transkription

Die aufgeführten Reagenzien wurden so verwendet, dass man ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Umschreibung zu erhält.

Pro Probe	
5 x miScript HiSpec Puffer	4 µl
10 x miScript Nucleics Mix	2 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNA	X µl RNA (100 ng-1 µg) + x µl RNase freies Wasser ad 12 µl
Totales Volumen	20 µl

Die daraus resultierende cDNA wurde vor der Analyse in RNase-freiem Wasser je nach Konzentration (**Tab. 7**) verdünnt. Für die qPCR wurde maximal 3 µl cDNA pro *well* eingesetzt. Eine Zugabe von 5 ng RNA zeigte sich in unseren Vorversuchen als ideal. Da die cDNA-Konzentration nicht gemessen werden kann, wird angenommen, dass die RNA 1:1 in cDNA umgeschrieben wird. Somit wurde eine cDNA von ca. 1,6 ng/µl angestrebt. Die Verdünnung erfolgte nach Herstellerangaben für die Durchführung von 2 Läufen.

Tab. 7 Verdünnung nach der reversen Transkription

Bei einer RNA-Konzentration von ≤ 50 ng/ μ l wurde zu insgesamt 115 μ l, bei einer Konzentration von 50-100 ng/ μ l 1:10 und ≥ 100 ng/ μ l 1:30 verdünnt.

RNA-Konzentration	Verdünnung	Mix
≤ 50 ng/ μ l		Verdünnung zu 115 μ l
50-100 ng/ μ l	1:10	20 μ l RT-Reaktion + 180 μ l RNase freies Wasser
≥ 100 ng/ μ l	1:30	20 μ l RT- Reaktion + 580 μ l RNase freies Wasser

4.3.7 Standardverdünnungsreihe

Um verwertbare Ergebnisse zu erzielen, ist eine Standardisierung der RNA-Extraktion, reversen Transkription und der qPCR im Vorfeld essentiell. Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung von Teilen der DNA, wie beispielsweise von Genen oder auch Genfragmenten unter Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen wie z.B. der Taq-Polymerase. Näheres zum Ablauf wird in Kapitel 1.3.8 beschrieben.

Für die Standardverdünnungsreihe wird bei jedem Verdünnungsschritt die Konzentration der eingesetzten cDNA halbiert. Im Röhrchen D0 befanden sich 5 ng (in 200 μ l) einer cDNA der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231. Von diesem Röhrchen wurden 100 μ l entnommen und in ein anderes Röhrchen D1 transferiert. 100 μ l RNase-freies Wasser wurde in das Röhrchen D1 hinzugefügt und die Lösung durch 20 x auf- und abpipettieren gründlich gemischt. Erneut wurden 100 μ l aus dem Röhrchen D1 in ein neues Röhrchen D2 transferiert und 100 μ l RNase-freies Wasser hinzugefügt. Insgesamt wurden sechs Verdünnungsschritte eingelegt (D0= 5 ng; D1= 2,5 ng; D2= 1,25 ng; D3= 0,625 ng; D4= 0,3125 ng; D5= 0,15625 ng; D6= 0,078 ng). Die cDNA wurde zusammen mit dem Mastermix und den miRs/ Kontrollgenen auf eine PCR-Platte aufgetragen (**Tab. 8**). Getestet wurden die Ziel-miRNAs (miR-27a, miR-16, miR-7), eine RT-Kit-interne Kontroll-miRNA (miRTC) und das Referenzgen (RNU6B). RNU6B wurde von Qiagen zur Normalisierung der Ziel-miRNAs, auch relative Quantifizierung genannt, aufgrund der relativ stabilen Expressionsniveaus in Gewebe und Zelllinien empfohlen. Die Normalisierung korrigiert Faktoren,

welche sonst zu inkorrekt quantifizieren können. Die Amplifizierungseffizienz beträgt gemäß Qiagen nahezu 100 %.

Am Ende der qPCR-Analyse wurde eine lineare Regression des Logarithmus der eingesetzten cDNA-Konzentration (x-Achse) mit dem Mittelwert von 3 Messwerten (relative Quantität des Zielgens normalisiert zu RNU6B nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode) auf der y-Achse aufgeführt. Eine lineare Regression beschreibt die Abhängigkeit beider Faktoren zueinander. Der Regressionskoeffizient R^2 ist hierbei ein Qualitätsmerkmal zum Beschreiben des linearen Zusammenhangs. Eine gute Linearität liegt vor, wenn R^2 zwischen 0,99 und 1 liegt. Die Effizienz des eigenen Arbeitens, sowie die des Systems kann ebenfalls mithilfe von Standardverdünnungsreihen überprüft werden. Sie wird durch folgende Gleichung berechnet: $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ (Rasmussen, 2001). Eine 100 % Effizienz korrespondiert mit einem Effizienzwert von 2 und einer Steigung von -3,33.

Tab. 8 Exemplarische Darstellung der Belegung einer PCR-Platte

Gemäß schematischer Darstellung wurden die qPCR-Platten für die Standardverdünnungsreihe belegt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	D0	D0	D0	D1	D1	D1	D2	D2	D2	D3	D3	D3
B	D4	D4	D4	D5	D5	D5	D6	D6	D6	NoRT ^a	NTC ^b	NTC ^b
C	D0	D0	D0	D1	D1	D1	D2	D2	D2	D3	D3	D3
D	D4	D4	D4	D5	D5	D5	D6	D6	D6	NoRT ^a	NTC ^b	NTC ^b
E	D0	D0	D0	D1	D1	D1	D2	D2	D2	D3	D3	D3
F	D4	D4	D4	D5	D5	D5	D6	D6	D6	NoRT ^a	NTC ^b	NTC ^b
G	D0	D0	D0	D1	D1	D1	D2	D2	D2	D3	D3	D3
H	D4	D4	D4	D5	D5	D5	D6	D6	D6	NoRT ^a	NTC ^b	NTC ^b

^a NoRT = keine RT

^b NTC = no template control

4.3.8 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Die Quantitative PCR (qPCR) ist eine Methode, die auf den Prinzipien der Polymerasekettenreaktion basiert. Sie erlaubt zusätzlich eine Quantifizierung der amplifizierten Gensequenzen durch Messung eines fluoreszierenden Farbstoffs in Echtzeit (*real-time qPCR*). Diese Echtzeit-Messung findet nach jedem Zyklus eines Laufs in seiner exponentiellen Phase statt. Jeder Lauf besteht aus 30 Zyklen. Dadurch können die Bias-Effekte von akkumulierten Inhibitoren oder inaktivierten Polymerasen, die insbesondere in den späteren Amplifikationszyklen auftreten, begrenzt werden. Der Prozess der PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt. Der Ablauf wird folgend beschrieben:

Aktivierung der Polymerase. Durch eine Aufwärmphase von 15 min bei 95 °C wird die Polymerase im PCR-Puffer aktiviert.

Denaturierung. Die doppelsträngige DNA mit ihren Wasserstoffbrückenbindungen wird zunächst durch eine Erhitzung auf ca. 94 °C aufgebrochen, sodass zwei einzelsträngige DNAs entstehen.

Primerhybridisierung. Für die Dauer von 30 sec bei 55 °C inkubieren, um ein *Annealing der Primer* zu ermöglichen.

Elongation. Die DNA-Polymerase setzt am 3'-Ende des angelagerten *Primers* an und füllt die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Dieser Schritt dauert 30 sec bei 70 °C.

Als Farbstoff wurde SYBR Green I im Rahmen des miScript SYBR Green PCR Kits verwendet. Dieser interkaliert in die doppelsträngige DNA des Amplifikats und gibt hierdurch ein Fluoreszenz-Signal. Dadurch entsteht eine Korrelation zwischen der Zunahme der Fluoreszenz und der Zunahme des Amplifikats. Da SYBR Green jedoch unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, ist es essenziell, auf die Zielsequenz hochspezifische *Primer* einzusetzen, um kein falsch positives Signal zu erhalten. Zusätzlich sollte immer eine Schmelzkurve durchgeführt werden, um zu beweisen, dass nur ein Produkt amplifiziert wurde. Der miScript SYBR Green PCR Kit nutzt hierfür einen spezifischen Universal-Rückwärts*primer*, der während der Reversen Transkription in die Target-cDNA eingebaut wurde und Vorwärts*primer* von der Firma Qiagen für das gewünschte Gen. Die *Primer* wurden speziell von Qiagen (Hilden, Deutschland) *designed* (**Tab. 9**). Die PCR-Platten

wurden bereits vorgelegt mit den solubilisierten *Primer Assays* (miR-7, mir-16, miR-27a, RNU6B und miRTC) von der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland), ausgelegt für eine finales Reaktionsvolumen von 25 µl, bezogen (**Tab. 12**). Als Positivkontrolle und Kalibrator wurde die Zelllinie MDA-MB 231 eingesetzt. Der Assay miRTC stellt eine interne Kontrolle der *Performance* der reversen Transkription dar.

Zur Datennormalisierung wurde RNU6B als Referenzgen in den Assay aufgenommen, um Variationen der RT-PCR-Effizienz von Probe zu Probe und Fehler bei der Probenquantifizierung zu korrigieren.

Die Beschaffenheit der vorgelegten PCR Platten macht es möglich, 6 verschiedene Patienten (in zweifacher *Well*-Ausführung), NTC und unseren Kalibrator gleichzeitig zu analysieren. Daher wurden 8 Mastermixe (6 Patienten, NTC und 1 Kalibrator) angesetzt.

Tab. 9 Referenz der verwendeten Primer Assays

Die *Primer Assays* wurden von der Firma Qiagen bezogen und waren bereits auf den qPCR-Platten vorgelegt. Die Bestellinformationen und Sequenzen sind der Tabelle zu entnehmen.

Name	Hs_mir-7_1 miScript Primer Assay
miRBase ID	Hsa-miR7-2-3p
miRBase Accession	MIMAT0004554
Mature miRNA-Sequenz	CAACAAAUCCCAGUCUACCUA
Katalognummer	MS00032116

Name	Hs_miR-16_2 miScript <i>Primer Assay</i>
miRBase ID	Hsa-miR-16-1
miRBase Accession	MI0000070
Mature miRNA-Sequenz	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
Katalognummer	MS00031493

Name	Hs_mir-27a_1 miScript <i>Primer Assay</i>
miRBase ID	Hsa-miR27a-3p
miRBase Accession	MIMAT0000084
Mature miRNA-Sequenz	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC
Katalognummer	MS000321166

Name	Hs_RNU6-1_11 miScript <i>Primer Assay</i>
Offizielles Symbol	RNU6-6P
Offizieller Name	RNA, U6 small nuclear 6, pseudogene
Enrez Gene ID	26826
Katalognummer	MS00033740
Sequenz	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTTT

Name	CTRL_miRTC_1 miScript <i>Primer Assay</i>
Katalognummer	MS00000001

Als erstes wurde der 2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10 x miScript *Universal Primer*, die cDNA, und RNase-freies Wasser bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufgetaut. Jede der

Lösungen wurde gut durchmischt und anschließend ein Reaktionsmix gemäß **Tabelle 10** angesetzt. Es wurde jeweils die benötigte Anzahl an Reaktionen plus eine zusätzliche Sicherheitsreaktion hergestellt. Für unsere Negativkontrolle NTC (keine cDNA, nur Wasser als Substrat) wurde ein Reaktionsmix gemäß **Tabelle 11** hergestellt. Pro *Well* ist 25 µl des Reaktionsmixes (welches ein Äquivalent von 3µl cDNA beinhaltet) hinzugegeben worden. Pro Platte können 6 Tumorproben plus ein Kalibrator für die 3 miRNAs, miRTC und Referenzgen RNU6B sowie eine Negativkontrolle (NTC = *no template control*) analysiert werden.

Tab. 10 Mastermix für qPCR für 7 Tumorproben und 1 Kalibrator

Für 7 Tumorproben und 1 Kalibartor (10 + 1 Wells) wurde der Mastermix anhand folgender Tabelle angesetzt. Es wurde die jeweilige cDNA eingesetzt. Pro *Well* wurden 25 µl auf die vorbelegte qPCR-Platte aufgetragen.

	pro Well
2 x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
10 x miScript Universal Primer	2,5 µl
RNase-freies Wasser	7 µl
Template cDNA	3 µl
Primer Assay	Bereits vorgelegt auf der PCR-Platte (Puder)
Totales Volumen Reaktionsmix	je <i>Well</i> 25 µl

Tab. 11 Mastermix der NTC für qPCR

Für NTC wurde ein separater Mastermix angesetzt. Statt cDNA wurde RNase freies Wasser eingesetzt.

	pro Well
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 µl
10x miScript Universal Primer	2,5 µl
RNase freies Wasser	10 µl

Tab. 12 Belegung des Pipettierschemas der qPCR-Platten

Die vorgelegte qPCR-Platte mit den solubilisierten Primer Assays (miR-27a, miR-7, miR-16, RNU6B, miRTC) wurde von der Firma Qiagen bezogen. 1-6T stellt die unterschiedlichen Tumorproben, Cal den Kalibrator und NTC die *no template control* dar. Der Mastermix gemäß Tabelle 8 und 9 wurde in die entsprechenden Wells zugegeben und anschließend die Analyse durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1T	1T	1T	1T	1T	1T	1T	1T	1T	1T	NTC	NTC
B	2T	2T	2T	2T	2T	2T	2T	2T	2T	2T	NTC	NTC
C	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	NTC	NTC
D	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	3T	NTC	NTC
E	4T	4T	4T	4T	4T	4T	4T	4T	4T	4T	NTC	NTC
F	5T	5T	5T	5T	5T	5T	5T	5T	5T	5T	NTC	NTC
G	6T	6T	6T	6T	6T	6T	6T	6T	6T	6T	NTC	NTC
H	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	Cal	NTC	NTC

1-6T = Tumorproben, Cal= Kalibrator, NTC = no template control (Negativkontrolle)

miR-27a, miR-7, miR-16, RNU6B, miRTC

Die PCR-Platte wurde nun vorsichtig mit einer qPCR-Platten-Klebefolie versiegelt. Um Luftblasen zu entfernen, wurde die Platte für 20 Sekunden bei 4100 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Real-Time Cycler (Agilent MXPro, Version 4.1) wurde mit dem Programm wie in der **Tabelle 13** beschrieben gestartet.

Tab. 13 Real-time Cycler Programmierung

Als Erstes fand ein Aktivierungsschritt für die Polymerase bei 95 °C für 15 min statt. Es folgte die Denaturierung bei 94 °C für 15 sec und eine *Primer*anlagerung bei 55 °C für 30 sec. Abschließend fand die Extension bei 70 °C für 30 sec statt. Die Gesamtanzahl der durchgeführten Zyklen war 40.

Schritte	Zeit	Temperatur
PCR-Aktivierungsschritt	15 min	95 °C
Denaturierung	15 sec	94 °C
Anlagerung der Primer	30 sec	55 °C
Extension	30 sec	70 °C
Zahl der Zyklen	40 Zyklen	

Der Real-Time Cycler hat während jedem Zyklus das Fluoreszenz-Signal gemessen. Es wurden automatisch durch die Agilent MXPro Software (Version 4.1) die „cycle threshold values“ (CT-Werte) für jedes Zielgen determiniert (= Anzahl der Zyklen, die benötigt wurden, um den Grenzwert von 0.05 zu überschreiten). Die quantitative mRNA Expressionsanalyse für miR-7, miR-16 und miR-27a wurde mithilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Berechnungsmethode durchgeführt. Wie in Kapitel 4.3.7 wurde auch hier RNU6B zur Normalisierung der Ziel-miRNAs verwendet, um Faktoren zu korrigieren, die zu einer inkorrekten Quantifizierung führen können. Die CT-Werte der Zielgene wurden mit den CT-Werten des Kontrollgens RNU6B ($\Delta CT = CT(\text{Zielgen}) - CT(\text{RNU6B})$) sowie mit unserem Kalibrator der Zelllinie MDA-MB 231 ($\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{Tumorprobe}) - \Delta CT(\text{Kalibrator})$) normalisiert. Für die Spezifität und Sensitivität wurde NTC für jeden Primer in 4-facher Ausführung und miRTC als Kontrolle der reversen Transkription für jede Tumorprobe und unseren Kalibrator analysiert. Die Analysen wurden in 2 separaten Läufen und in zeitlicher Distanz zueinander durchgeführt. Die folgenden Ausschlusskriterien wurden angewendet:

- Resultate mit einem CT-Wert von RNU6B > 35 (da schlechte RNA-Isolation oder RNA-Qualität)
- Eine $2^{\text{exp}-\Delta\Delta CT}$ Fehlerprogression % > 30 % auch nach Wiederholung
- Eine %-Standardabweichung von > 47,1 % zwischen 2 validen Läufen

4.3.9 ELISA-Bestimmung von uPA und PAI-1 Expressionsniveaus

Die uPA- und PAI-1-Proteinkonzentration wurde mittels ELISA am Tumorgewebe in Voruntersuchungen bestimmt. Zur Gewebeauflösung und -extraktion wurden zunächst 5-10 90 µm dicke Gewebestücke in ein 1ml Potter-Elvehjem Glaszylinder gegeben und mit 200 µl, 4°C kalte TBS mit 1% Triton X-100, gemixt. Die Suspension wurde in ein 1ml *Test Tube* überführt. Das *Tube* wurde für 2h bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde die Suspension in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 100.000 x g für 1 h bei 4°C zentrifugiert um den Gewebedebris von der Flüssigkeit zu trennen. Der klare Überstand wurde separiert, die lipide Schicht verworfen und der Detritus zur weiteren Analyse aufbewahrt. Es folgt die Anwendung des uPA- und PAI-1 ELISA Kits. Sowohl das uPA- als auch das PAI-1-ELISA-Kit verwenden unkonjugierte Antikörper gegen humanes uPA bzw. PAI-1. Diese Antikörper werden durch Adsorption an die Innenwände einer Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen gebunden. Es folgt die Gefrierdrying. Zwölf 8-Well-Streifen (96 Wells) und ein Halter werden mit jedem Kit geliefert. In den vorbeschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte werden Proben, Kontrollen und Standards inkubiert und gebundenes uPA/PAI-1 wird durch einen biotinylierten zweiten Antikörper nachgewiesen. Es wird *horsereddishperoxidase* (HRP)-konjugiertem Streptavidin in die Vertiefungen zugegeben. Dies führt zur Bildung des Antikörper-Enzym-Nachweiskomplexes. Hierzu wird Perborat/TMB-Substratlösung zugegeben, wodurch eine blaue Farbe als Maß für die HRP-Aktivität entsteht. Die Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt. Mit der Zugabe der Säure wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Absorption der Lösung wird bei 450 nm in einem Spektralphotometer für 96-Well-Mikrotiterplatten (ELISA-Reader) gemessen. Die Absorptionswerte werden mit den Werten der uPA- bzw. PAI-1-Standardkurve verglichen (Schmitt et al., 2006).

4.3.10 Statistische Analysen

Anhand der gewonnenen Daten aus den qPCR-Läufen und der Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Fehlern mittels Excel wurden statistische Analysen unter

Verwendung der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 24 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt.

Mithilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde zunächst ein Häufigkeitsvergleich zwischen klinischen Charakteristika (Alter, Lymphknotenstatus, Vorhandensein einer Primärmetastase, T-Stadium, Tumorgröße und Grading) der Patienten und tumorbiologischen Faktoren gezogen. Korrelationen der einzelnen miRNAs und uPA und PAI-1 untereinander wurden mithilfe von Spearman-Korrelationen durchgeführt. Ein Korrelationskoeffizient zwischen 0,3 und 0,7 wurde als moderate Korrelation angesehen. Der *cut-off* der miRNAs und uPA/PAI-1 wurde anhand von Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen bestimmt (näheres hierzu in Kapitel 5.2). Die Beziehung der klinischen Faktoren untereinander sowie zu den miRNAs wurde im definierten Zeitraum von 5-Jahren (OS 60) hinsichtlich der Überlebensrate (OS = *overall survival*) sowie des krankheitsfreien Überlebens (DFS = *disease free survival*) beobachtet. Die Gesamtüberlebensrate ist definiert als die Zeit zwischen dem Zeitpunkt der Diagnosestellung und des Todes. Das krankheitsfreie Überleben beschreibt die Zeit zwischen Abschluss der Primärtherapie des Tumors und anschließender krankheitsfreier Zeit (Health, 2016) . Ein Event im OS ist definiert als Tod des Patienten, ein Event im DFS als Rezidiv. Hierzu wurden univariate Cox-Regressions-Analysen durchgeführt und die *Hazard Ratio* mit einem 95 %-Konfidenzintervall festgehalten. In multivariaten Cox-Regressionsanalysen wurden Alter, T-Stadium und die jeweilige miRNA-Konzentration miteinander verglichen. Zur Analyse der Überlebenszeitdaten wurde das Kaplan-Meier-Verfahren verwendet. Die Überlebenszeiten wurden statistisch mithilfe des Log-Rank-Tests verglichen und graphisch durch die Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Hierbei wurden P-Werte ≤ 0.05 als statistisch signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Patientenkollektiv

Die hier beschriebene Studie ist eine retrospektive Analyse von TNBC-Patientinnen bezüglich der Expressionsprofile von miR-7, miR-16 und miR-27a sowie uPA und PAI-1 und deren Bezug zum krankheitsfreien und Gesamt-Überleben sowie klinischen und histopathologischen Faktoren. Die klinischen Charakteristika der untersuchten Kohorte sind in **Tabelle 14** wiedergegeben.

Tab. 14 Klinische und histopathologische Charakteristika des untersuchten Patientenkollektivs

In die Studie wurden 97 Patientinnen mit einem medianen Alter von ca. 60 Jahren eingeschlossen. Die Verteilung bezüglich der klinischen und histopathologischen Faktoren ist in dieser Tabelle dargestellt.

	Anzahl	Prozentzahl
Alle Patienten	97	100
Alter (Median)	59,53 Jahre	
Minimum in Jahren	30 Jahre	
Maximum in Jahren	96 Jahre	
Alter < 60 Jahre	46	47,4
Alter > 60 Jahre	51	52,6
T^a-Stadium		
1	23	23,7
2	54	55,7
3	9	9,3
4	11	11,3
pN^b- Stadium		
0	51	52,6
1	31	32,0
2	11	11,3
3	4	4,1

M^c-Stadium		
0	69	71,1
1	28	28,9
Grading		
1	2	2,1
2	15	15,5
3	79	81,4
4	1	1,0
Neoadjuvante Chemotherapie		
Keine Chemotherapie	30	30,9
Anthracyclin-haltige Chemotherapie	31	32,0
CMF	17	17,5
Kombination Anthracycline + CMF	4	4,1
Nur Taxane	1	1,0
CTX-Regimen unbekannt	14	14,4
Lokalrezidiv		
Ja	75	77,3
Nein	22	22,7
Verstorben		
Ja	54	55,7
Nein	43	44,3

^a T= Tumorgröße

^b pN= pathologisches Lymphknotenstadium

^c M= Fernmetastasen

5.2 Cut-off Bestimmung von miR-7, miR-16 und miR-27a Expressionsniveaus

miR-7, miR-16 und miR-27a Expressionsniveaus wurden mittels qPCR in TNBC-Tumorgewebe analysiert. Die miRNA Expressionsniveaus sind in Tabelle 13 und Abbildung 6 zusammengefasst. Die Expression von miR-7, miR-16 und miR-27a wurden mittels der $2^{-\text{exp}(-\Delta\Delta\text{CT})}$ Methode kalkuliert. Es zeigte sich für miR-7 (n=95) ein relativer Expressionsbereich von 0,49 bis 55,72 (Median = 3,17, Standardabweichung = 9,72, Mittelwert = 6,87), miR-16 (n=97) wies eine

normalisierte Expression im Bereich von 0,49 bis 68,33 auf (Median = 5,87, Standardabweichung = 8,66, Mittelwert = 2,97) und miR-27a (n=94) von 0,25 bis 11,39 (Median = 1,37, Standardabweichung = 1,44, Mittelwert = 1,67) (**Tab. 15**).

Tab. 15 miR-7, miR-16 und miR-27a Expression in TNBC-Tumorgewebe

	miR-7	miR-16	miR-27a
Anzahl	95	97	94
Mittelwert	6,87	5,87	1,67
Median	3,17	2,97	1,37
Standardabweichung	9,724	8,66	1,44
Minimum	0,49	0,49	0,25
Maximum	55,72	68,33	11,39
Perzentile			
25	1,10	1,56	0,87
50	3,17	2,97	1,37
75	9,23	6,72	1,87

Zur Ermittlung des *Cut-offs* wurden Überlebensanalysen anhand des Medians sowie der 25. und 75. Perzentile durchgeführt und der *Cut-off* anschließend optimiert (siehe Kapitel 5.2). Im Fall von miR-7 und miR-16 wurde der Median gewählt. Bei miR-27a wurde als *Cut-off* 2,07 (78,7 %) verwendet, welcher die Kohorte in hoch (n=74) und niedrig (n=20) einteilt.

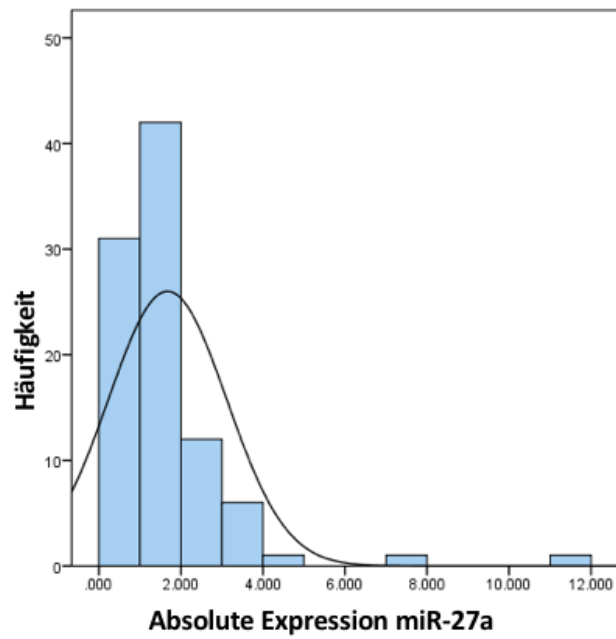
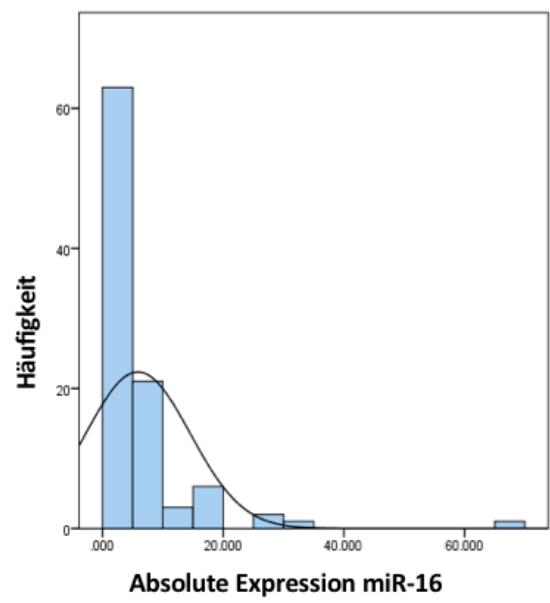
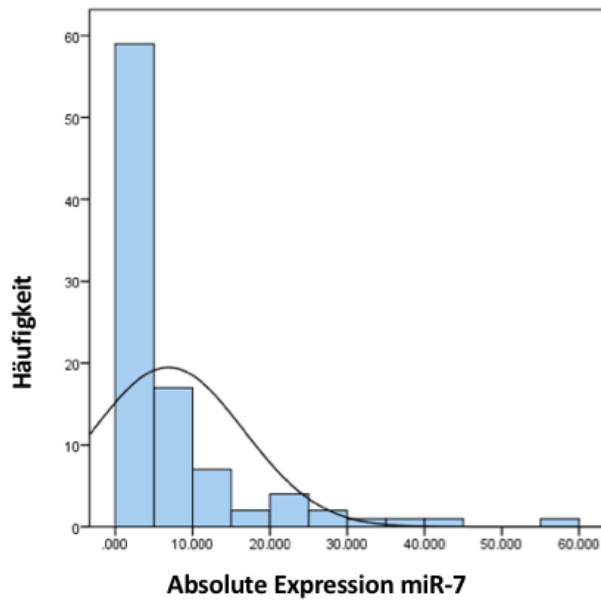


Abb. 6 Histogramme der miRNA-Expressionsniveaus im TNBC

5.3 Cut-off Bestimmung von uPA und PAI-1

uPA und PAI-1 Expressionsniveaus wurden mittels ELISA-Bestimmung ermittelt (siehe Material und Methoden, Kapitel 4.3.9) Bei uPA (n=63) zeigte sich ein relativer Expressionsbereich von 0,24 bis 16,01 und bei PAI-1 (n=86) von 0,57 bis 311,72 (Median = 24,24, Standardabweichung = 43,99, Mittelwert = 36,49). Die Verteilung wird in der **Tabelle 16** und in der **Abbildung 7** dargestellt. Der *Cut-off* wurde wie in Kapitel 5.2 beschrieben ermittelt. Für uPA wurde der *Cut-off* 2,62 (35,2 %) verwendet, für PAI-1 der Median (24,24).

Tab. 16 uPA und PAI-1 Expression in TNBC-Tumorgewebe

	uPA	PAI-1
Anzahl gemessener Proben	63	86
Mittelwert	4,72	36,49
Median	4,71	24,24
Standardabweichung	3,83	43,99
Minimum	0,24	0,57
Maximum	16,01	311,72
Perzentile		
25	1,89	13,33
50	3,76	24,24
75	5,85	40,72

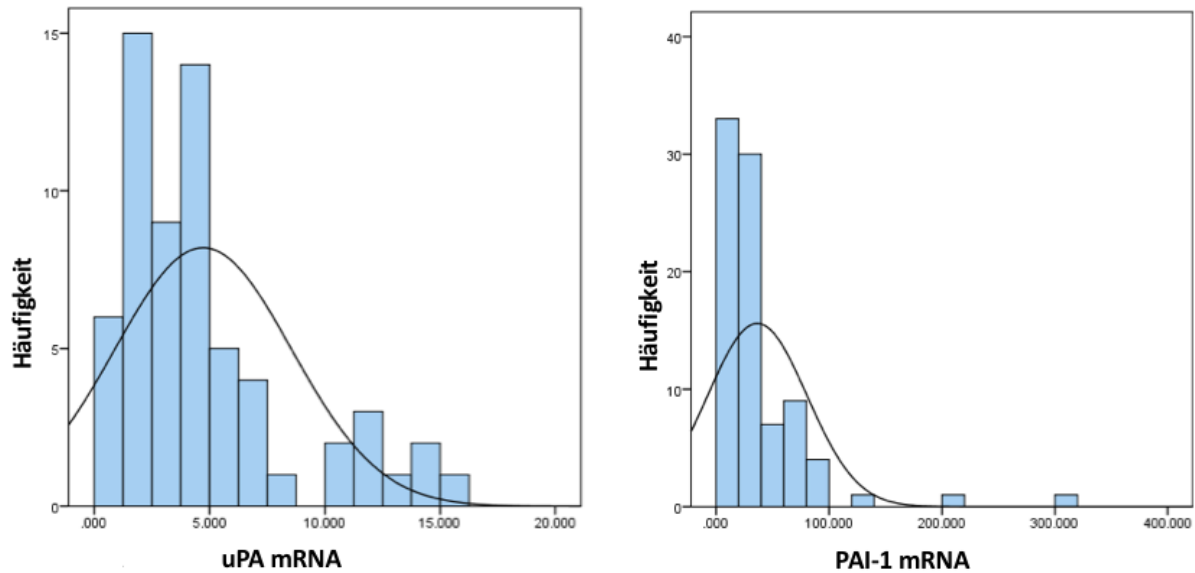


Abb. 7 Histogramme der uPA und PAI-1 Expressionsniveaus im TNBC-Tumorgewebe

5.4 Analyse der Korrelation der miRNAs und uPA, PAI-1 untereinander

Mithilfe einer nichtparametrischen Spearman-Korrelationsanalyse der drei miRNAs miR-7, miR-16 und miR-27a und uPA, PAI-1 konnte die Korrelation der fünf Faktoren untereinander überprüft werden. Wie in **Tabelle 17** ersichtlich, weist miR-27a eine Korrelation zu uPA ($r= 0,29$; $p= 0,02$), PAI-1 ($r= 0,31$; $p= 0,04$) und miR-16 ($r= 0,53$; $p= 0,00$) auf. Ebenso korrelieren die miRNAs miR-16 und miR-7 ($r= 0,29$; $p= 0,01$) sowie uPA und PAI-1 ($r= 0,39$; $p= 0,01$) miteinander.

Basierend auf der Co-Expression von miR-27a und uPA/PAI-1 wurden zur weiteren Analyse die Expressionsniveaus für jede miRNA und uPA, PAI-1 in hoch und niedrig eingeteilt und hiermit Chi-Square-Tests durchgeführt (siehe *Cut-off* Bestimmung Kapitel 5.2). Da sich keine signifikante Korrelation zeigt, ist davon auszugehen, dass es keine ausgeprägte miR-uPA-Achse für miR-7, miR-16 und miR-27a gibt (**Tab. 17-20**).

Tab. 17 Spearman-Korrelation der einzelnen miRNAs und uPA/PAI-1 untereinander

		miR-7	miR-16	uPA	PAI-1
miR-27a	Korrelationskoeffizient	0,17	0,53	0,29	0,31
	Signifikanz (2-seitig)	0,11	0,000	0,02	0,04
	Anzahl	92	93	61	83
miR-7	Korrelationskoeffizient		0,29	0,11	0,15
	Signifikanz (2-seitig)		0,002	0,39	0,18
	Anzahl		95	61	84
miR-16	Korrelationskoeffizient			0,09	0,15
	Signifikanz (2-seitig)			0,50	0,15
	Anzahl			63	86
uPA	Korrelationskoeffizient				0,39
	Signifikanz (2-seitig)				0,002
	Anzahl				63

Eine signifikante Korrelation ist fett dargestellt.

Tab. 18 Assoziation der miR-27a Expression mit der Expression von uPA und PAI-1 (Chi-Square-Test)

	Anzahl^a	miR-27a^b niedrig/hoch
Totale Patientenzahl	97	
uPA^c	85	P = 0,22
niedrig	31	26/5
hoch	54	39/15
PAI-1^d	87	P = 0,28
niedrig	44	36/8
hoch	43	31/12

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl für uPA und PAI-1 nicht n = 97

^a Patientenzahl

^b dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,07 (78,7%)

^c dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,62 (35,2%)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 24,24

Tab. 19 Assoziation der miR-7 Expression mit der Expression von uPA und PAI-1 (Chi-Square-Test)

	Anzahl ^a	miR-7 ^b niedrig/hoch
Totale Patientenzahl	97	
uPA^c	86	P = 0,54
niedrig	30	16/14
hoch	56	26/30
PAI-1^d	88	P = 0,39
niedrig	45	24/21
hoch	43	19/24

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl für uPA und PAI-1 nicht n=97

^a Patientenzahl

^b dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 3,17

^c dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,62 (35,2%)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 24,24

Tab. 20 Assoziation der miR-16 Expression mit der Expression von uPA und PAI-1 (Chi-Square-Test)

	Anzahl ^a	miR-16 ^b niedrig/hoch
Totale Patientenzahl	97	
uPA^c	88	P = 0,70
niedrig	31	16/15
hoch	57	27/30
PAI-1^d	90	P = 0,14
niedrig	45	25/20
hoch	45	18/27

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl für uPA und PAI-1 nicht n=97

^a Patientenzahl

^b dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 2,97

^c dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,62 (35,2%)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 24,24

5.1 Assoziation der miRNAs mit klinikopathologischen Faktoren: Chi-Square-Tests

Tabelle 21, 22 und 23 geben die Assoziation zwischen miR-7, miR-16 und miR-27a, (dichotomisiert anhand der Expressionsniveaus in niedrig und hoch) in Relation zu klinikopathologischen Faktoren wie Alter, Lymphknotenstatus, T-Stadium, Tumorgröße, Grading und Primärmetaste mithilfe des Chi-Square-Tests wieder.

Die miR-7-Konzentration zeigt im Chi-Square Test keine Assoziation zu Alter ($p = 0,60$), Lymphknotenstatus ($p = 0,60$), T-Stadium ($p = 0,47$), Tumorgröße ($p = 0,65$) und Primärmetastasierungsrate ($p = 0,38$). Sie zeigt jedoch eine signifikante Assoziation zum Grading ($p = 0,01$). Hohe miR-7-Werte kommen häufiger in G3 Tumoren vor.

miR-16 zeigt eine signifikante Assoziation von Tumorgröße und miR-16-Konzentration ($p < 0,001$). Niedrige miR-16-Niveaus kommen häufiger in Tumoren vor, die größer als 20 mm sind. Eine Assoziation zu Alter ($p = 0,26$), Lymphknotenstatus ($p = 0,92$), T-Stadium ($p = 0,58$), Grading ($p = 0,45$) und Primärmetastasierungsrate ($p = 0,39$) liegt nicht vor.

Auch bei miR-27a gibt es eine signifikante Assoziation von Tumorgröße und miR-27a-Konzentration ($p = 0,01$). Tumoren größer als 20 mm haben häufiger hohe miR-27a-Werte. Dahingegen korrelieren Alter ($p = 0,43$), Lymphknotenstatus ($p = 0,86$), T-Stadium ($p = 0,28$), Grading ($p = 0,80$) und auch das Auftreten von Primärmetastasen ($p = 0,78$) nicht mit der miR-16 oder miR-27a-Konzentration.

Tab. 21 Korrelation der miR-7 Expression mit klinikopathologischen Faktoren

Klinische Parameter	Patientenzahl^a	miR-7^b niedrig/hoch
Totale Patientenzahl	97	
Alter	95	P = 0,60
≤ 60 Jahre	45	21/24
> 60 Jahre	50	26/24
Lymphknotenstatus	95	P = 0,60
negativ	50	26/24
positiv	45	21/24
T-Stadium	95	P = 0,47
T1/2	76	39/37
T3/4	19	8/11
Tumorgroße	95	P = 0,65
≤ 20 mm	20	9/11
> 20 mm	75	38/37
Grading	95	P = 0,01
G1 + G2	17	13/4
G3	78	34/44
Primärmetastase	95	P = 0,38
ja	89	43/46
nein	6	4/2

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Patientenzahl

^b dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 3,17

Tab. 22 Korrelation der miR-16 Expression mit klinikopathologischen Faktoren

Klinische Parameter	Patientenzahl^a	miR-16^b niedrig/hoch
Totale Patientenzahl	97	
Alter	97	P = 0,26
≤ 60 Jahre	46	20/26
> 60 Jahre	51	28/23
Lymphknotenstatus	97	P = 0,92
negativ	51	25/26
positiv	46	23/23
T-Stadium	97	P = 0,58
T 1/2	77	37/40
T 3/4	20	11/9
Tumorgröße	97	P = 0,003
≤ 20 mm	20	4/16
> 20 mm	77	44/33
Grading	97	P = 0,45
G1 + G2	17	7/10
G3	80	41/39
Primärmetastase	97	P = 0,39
ja	91	44/47
nein	6	4/2

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Patientenzahl

^b dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 2,97

Tab. 23 Korrelation der miR-27a Expression mit klinikopathologischen Faktoren

Klinische Parameter	Patientenzahl^a	miR-27a^b niedrig/hoch
Totale Patientenzahl	97	
Alter	94	P = 0,43
≤ 60 Jahre	45	37/8
> 60 Jahre	49	37/12
Lymphknotenstatus	94	P = 0,86
negativ	50	39/11
positiv	44	35/9
T-Stadium	94	P = 0,28
T 1/2	74	60/14
T 3/4	20	14/6
Tumorgroße	94	P = 0,01
≤ 20 mm	19	11/8
> 20 mm	75	63/12
Grading	94	P = 0,80
G1 + G2	17	13/4
G3	77	61/16
Primärmetastase	94	P = 0,78
ja	88	69/19
nein	6	5/1

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Patientenzahl

^b dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,07 (78,7%)

5.2 Assoziation von miR-7, miR-16, miR-27a und klinikopathologischen Faktoren zu Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Univariate Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier-Überlebenskurven

Mithilfe von uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalysen wurde der Einfluss von etablierten klinikopathologischen Faktoren auf das 5-Jahres-Gesamtüberleben (OS 60 m) bzw. krankheitsfreie Überleben (DFS 60 m) evaluiert (**Tab. 24**). Es zeigt sich eine signifikante Korrelation vom Alter der Patienten zu sowohl dem 5-Jahres-Gesamtüberleben (HR 7,78 (95 % CI 2,71-22,33); $p < 0,001$), wie auch zum krankheitsfreien Überleben (HR 3,88 (95 % CI 1,75-8,59); $p < 0,001$). Wenn das Alter über 60 Jahre beträgt, ist das Risiko innerhalb von 5 Jahren zu versterben 7-fach und ein Rezidiv zu erhalten fast 4-fach erhöht. Das T-Stadium ist ebenfalls prognostisch mit dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben assoziiert. Ein höheres T-Stadium ($n = 22$) geht mit einem kürzeren Gesamt- (HR 4,76 (95 % CI 2,30-9,84); $p < 0,001$) sowie krankheitsfreiem Überleben (HR 5,02 (95 % CI 2,46-10,25); $p < 0,001$) als ein niedriges ($n = 77$) einher. Für die weiteren klinischen Faktoren wie Lymphknotenstatus, Tumorgröße und Grading zeigt sich in unseren Analysen keine signifikante Korrelation zum 5-Jahres-Gesamtüberleben oder krankheitsfreien Überleben nach 5 Jahren. Für miR-7 und miR-16 wurde keine Signifikanz in der Überlebensanalyse festgestellt. miR-27a korreliert jedoch bei einem *Cut-off* von 2,07 mit einem p-Wert von 0,04 signifikant mit dem 5-Jahres-Überleben. Bei einer hohen miRNA-Konzentration liegt das Risiko innerhalb von 5 Jahren zu versterben mehr als doppelt so hoch wie bei Patienten, welche eine niedrige miR-27a Konzentration aufweisen (HR 2,20 (95 % CI 1,02-4,73)). Auch auf das krankheitsfreie Überleben nach 5 Jahren hat miR-27a einen Einfluss. Eine hohe miR-27a Konzentration geht ebenfalls mit einem mehr als doppelt so hohen Risiko einher, ein Rezidiv zu erleiden wie eine niedrige miR-27a Konzentration (HR 2,35 (95% CI 1,15-4,78); $p = 0,02$).

Diese Ergebnisse wurden anhand von Kaplan-Meier-Überlebenskurven visualisiert und mittels log-rank Test verifiziert. Hier geht eine erhöhte miR-27a-Expression mit einem signifikant schlechteren Gesamt- ($p = 0,04$) und krankheitsfreien Überleben ($p = 0,02$) einher (**Abb. 8-10**).

Tab. 24 Univariate Cox-Regressionsanalysen von miR-7, miR-16, miR-27a und klinikopathologischen Faktoren in Relation zum Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben

Klinische Parameter	Gesamtüberleben ^a			Krankheitsfreies Überleben ^a		
	Anzahl ^b	HR (95 % CI) ^c	P	Anzahl ^b	HR (95 % CI) ^c	P
Alter						
≤ 60 Jahre	46	1	<0,001	46	1	0,001
> 60 Jahre	51	7,78 (2,71-22,33)		51	3,88 (1,75-8,59)	
Lymphknotens tatus						
negativ	51	1	0,19	51	1	0,07
positiv	46	1,63 (0,79-3,35)		46	1,91 (0,96-3,78)	
T- Stadium						
T 1/2	77	1	<0,001	77	1	<0,001
T 3/4	20	4,76 (2,30-9,84)		20	5,02 (2,46-10,26)	
Tumorgröße						
≤ 20 mm	20	1	0,56	20	1	0,99
> 20 mm	77	0,79 (0,35-1,77)		77	1,00 (0,45-2,22)	
Grading						
G1 + G2	17	1	0,85	17	1	0,82
G3	80	0,92 (0,38-2,24)		80	1,11 (0,46-2,67)	
miR-7^d						
niedrig	48	1	0,15	48	1	0,11
hoch	47	1,71 (0,82-3,59)		47	1,74 (0,88-3,45)	
miR-16^e						
niedrig	48	1	0,59	48	1	0,85
hoch	49	0,82 (0,40-1,68)		49	0,94 (0,48-1,84)	
miR-27a^f						
niedrig	72	1	0,04	74	1	0,02
hoch	22	2,20 (1,02-4,73)		20	2,35 (1,15-4,78)	

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben nach 60 Monaten

^b Patientenzahl

^c HR= hazard ratio (CI= confidence interval)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 3,17

^e dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 2,97

^f dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,07 (78,7%)

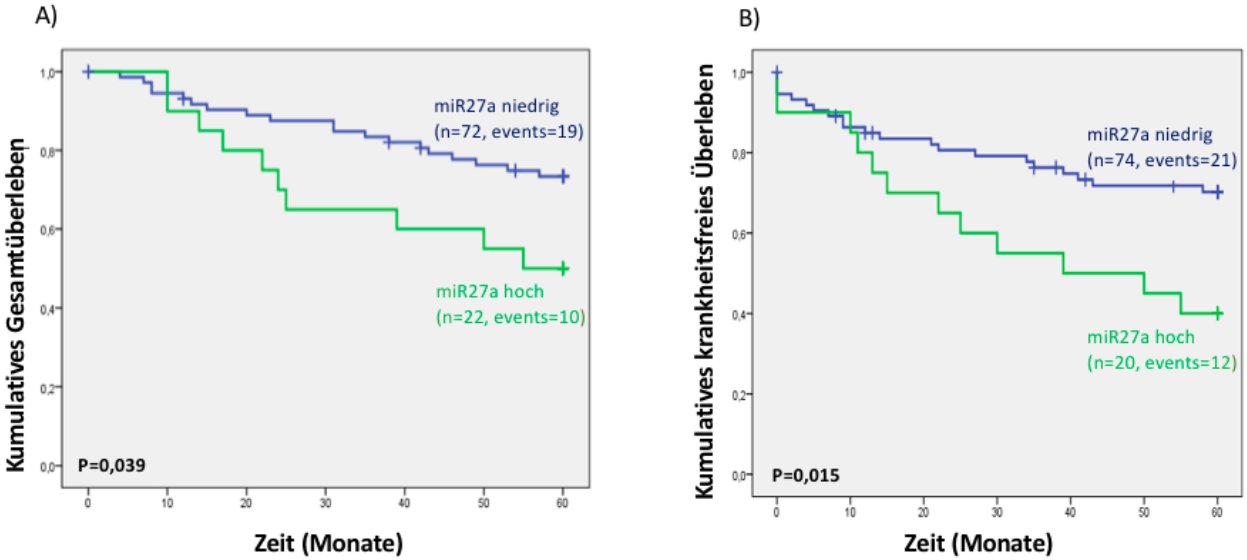


Abb. 8: Einfluss des miR-27a Gehalts (cut-off = 2,07 = 78,7%) auf das kumulative Gesamt- (A) und krankheitsfreie Überleben (B) bei Patienten mit TNBC.

Patienten mit hoher miR-27a Expression zeigen ein signifikant schlechteres Gesamt- ($p=0,04$) und krankheitsfreies Überleben ($p=0,02$) als Patienten mit niedriger miR-27a Expression. Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Analysen generiert. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

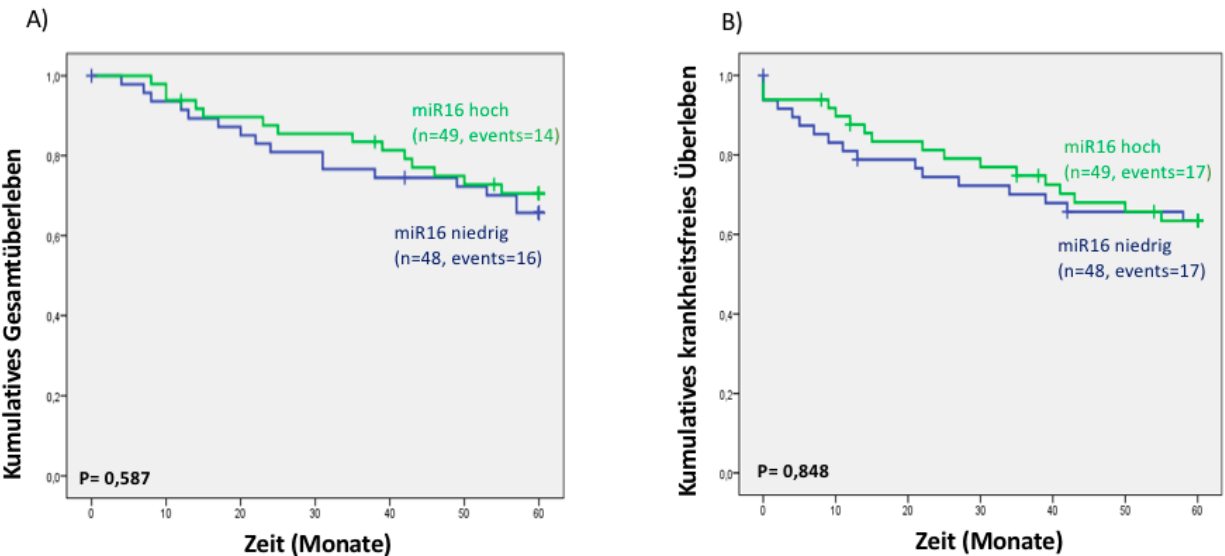


Abb. 9: Einfluss des miR-16 Gehalts (cut-off = Median) auf das kumulative Gesamt- (A) und krankheitsfreie Überleben (B) bei Patienten mit TNBC.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei einer niedrigen oder hohen miR-16 Expression im Gesamt- ($p=0,59$) und krankheitsfreien Überleben ($p=0,85$). Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

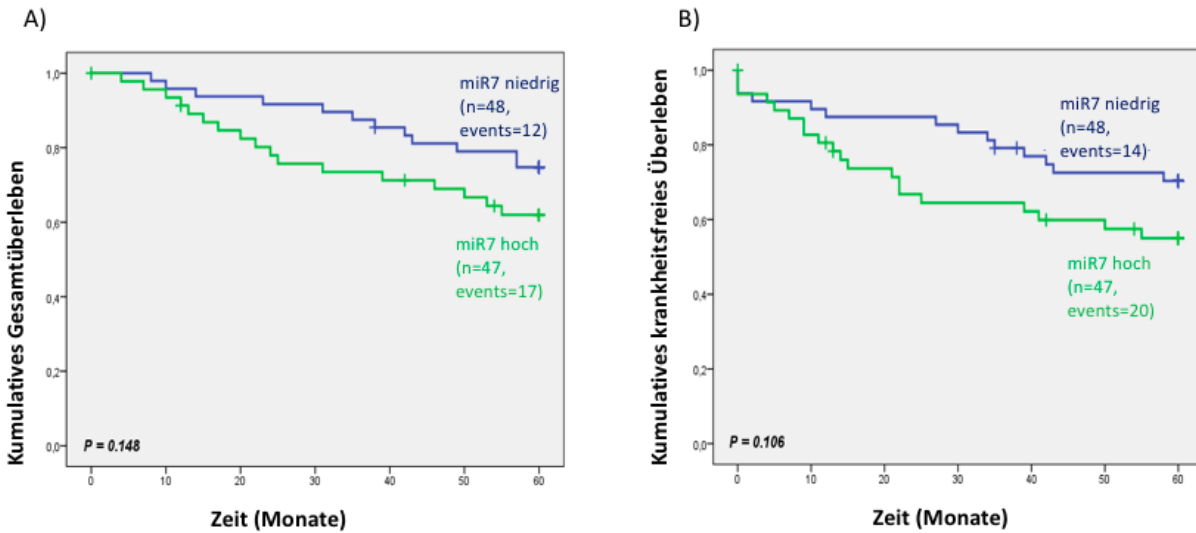


Abb. 10: Einfluss des miR-7 Gehalts (cut-off = Median = 3,17) auf das kumulative Gesamt- (A) und krankheitsfreie Überleben (B) bei Patienten mit TNBC.

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei einer niedrigen oder hohen miR-7 Expression im Gesamt- ($p = 0,15$) und krankheitsfreien Überleben ($p = 0,11$). Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

5.3 Assoziation von miR-7- und miR-16- und miR-27a-Expressionsniveaus mit Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Multivariate Cox-Regressionsanalysen

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wird die Abhängigkeit der untersuchten miRNAs mit weiteren Faktoren zum Gesamt- und krankheitsfreien Überleben überprüft. Nimmt man die drei Variablen Alter, T-Stadium und miR-27a, so präsentieren sich nur das Alter (HR 9,43 (95% CI 2,84-31,38); $p < 0,01$) und das T-Stadium (HR 1,71 (95% CI 1,18-2,49); $p = 0,001$) als signifikant. miR-27a hingegen wird durch diese Konstellation ein nicht-signifikanter Faktor (HR 2,56 (95% CI 1,16-5,62); $p = 0,17$) für das 5-Jahres-Überleben. Ebenso kann dies für das krankheitsfreie Überleben beobachtet werden (**Tab. 25**).

miR-7 zeigt in den multivariaten Analysen gemeinsam mit Alter und T-Stadium eine signifikante Korrelation zu Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. Bei einem miR-7 größer dem Median liegt ein zweifach erhöhtes Risiko vor, innerhalb von 5 Jahren zu versterben (HR 2,16 (95% CI 1,02-4,59); $p = 0,04$) oder ein Rezidiv zu erhalten (HR 2,21 (95% CI 1,09-4,49); $p = 0,03$) (**Tab. 26**).

Auch in der multivariaten Analyse mit miR-16 zeigen sich nur das Alter und das T-Stadium als signifikant für das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben. miR-16 hingegen stellt sich als nicht-signifikant dar (**Tab. 27**).

Tab. 25 Multivariate Cox-Regressionsanalysen des klinischen Outcomes (Gesamt- und krankheitsfreies Überleben) von TNBC-Patienten in Bezug zu miR-27a und klinikopathologischen Faktoren

Klinische Parameter	Gesamtüberleben ^a			Krankheitsfreies Überleben ^a		
	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P
Alter						
≤ 60 Jahre	46	1	< 0,001	46	1	0,003
> 60 Jahre	51	9,43 (2,84-31,38)		51	3,36 (1,503-7,525)	
T- Stadium						
T 1/2	77	1	0,001	77	1	< 0,001
T 3/4	20	1,71 (1,18-2,49)		20	3,77 (1,800-7,886)	
miR-27a^d						
niedrig	72	1	0,17	74	1	0,13
hoch	22	2,56 (1,16-5,62)		20	1,76 (0,845-3,654)	

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben nach 60 Monaten

^b Patientenzahl

^c HR= hazard ratio (CI= confidence interval)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,07 (78,7%)

Tab. 26 Multivariate Cox-Regressionsanalysen des klinischen Outcomes (Gesamt- und krankheitsfreies Überleben) von TNBC-Patienten in Bezug zu miR-7 und klinikopathologischen Faktoren

Klinische Parameter	Gesamtüberleben ^a			Krankheitsfreies Überleben ^a		
	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P
Alter						
≤ 60 Jahre	46	1	< 0,001	46	1	0,001
> 60 Jahre	51	8,24 (2,83-23,99)		51	3,90 (1,75-8,74)	
T- Stadium						
T 1/2	77	1	< 0,001	77	1	< 0,001
T 3/4	20	4,69 (2,21-9,97)		20	5,04 (2,42-10,46)	
miR-7^d						
niedrig	48	1	0,04	48	1	0,03
hoch	47	2,16 (1,02-4,59)		47	2,21 (1,09-4,49)	

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl für nicht immer n=97

^a Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben nach 60 Monaten

^b Patientenzahl

^c HR= hazard ratio (CI= confidence interval)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 3,17

Tab. 27 Multivariate Cox-Regressionsanalysen des klinischen Outcomes (Gesamt- und krankheitsfreies Überleben) von TNBC-Patienten in Bezug zu miR-16 und klinikopathologischen Faktoren

Klinische Parameter	Gesamtüberleben			Krankheitsfreies Überleben		
	Anzahl	HR (95% CI)	P	Anzahl	HR (95% CI)	P
Alter						
≤ 60 Jahre	46	1	< 0,001	46	1	0,002
> 60 Jahre	51	7,58 (2,62-21,90)		51	3,47 (1,55-7,76)	
T- Stadium						
T 1/2	77	1	< 0,001	77	1	< 0,001
T 3/4	20	4,59 (2,21-9,54)		20	4,40 (2,13-9,07)	
miR-16d						
niedrig	48	1	0,98	48	1	0,99
hoch	47	0,99 (0,48-2,04)		47	1,00 (0,51-1,98)	

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben nach 60 Monaten

^b Patientenzahl

^c HR= hazard ratio (CI= confidence interval)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem *Cut-off* = Median = 2,97

5.4 Assoziation uPA und PAI-1 zu Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Univariate Cox-Regressionsanalysen und Kaplan-Meier- Überlebenskurven

Betrachtet man das uPA-PAI-1-System, so korreliert bei einem *Cut-off* von 2,62 ein niedriger uPA-Spiegel mit einem längerem 5-Jahres- Gesamtüberleben ($p = 0,04$). Ein hoher uPA-Spiegel geht mit einem fast dreifach erhöhten Risiko (HR 2,85 (95 % CI 1,08-7,53)) einher, ein Todesereignis innerhalb von 5 Jahren zu erleiden. Zum krankheitsfreien Überleben nach 5 Jahren gibt es keine signifikante Korrelation. PAI-1 hingegen zeigt bei einem *Cut-off* von 24,24 weder eine signifikante Korrelation zum krankheitsfreien noch zum Gesamtüberleben (**Tab. 28**).

Auch hier wurden zur Visualisierung und Bestätigung Kaplan-Meier-Überlebenskurven angefertigt. Patienten, welche eine hohe uPA-Konzentration aufweisen, haben ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben nach 5 Jahren ($p=0,03$) (**Abb. 11**).

Tab. 28 Univariate Cox-Regressionsanalysen von uPA und PAI-1 in Relation zum Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben

Klinische Parameter	Gesamtüberleben ^a			Krankheitsfreies Überleben ^a		
	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P
uPA^d						
niedrig	31	1	0,04	31	1	0,33
hoch	57	2,85 (1,08-7,53)		57	1,47 (0,68-3,18)	
PAI-1^e						
niedrig	45	1	0,31	45	1	0,83
hoch	45	1,49 (0,69-3,21)		45	1,08 (0,53-2,18)	

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben nach 60 Monaten

^b Patientenzahl

^c HR= hazard ratio (CI= confidence interval)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,62 (35,2%)

^e dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = Median = 24,24

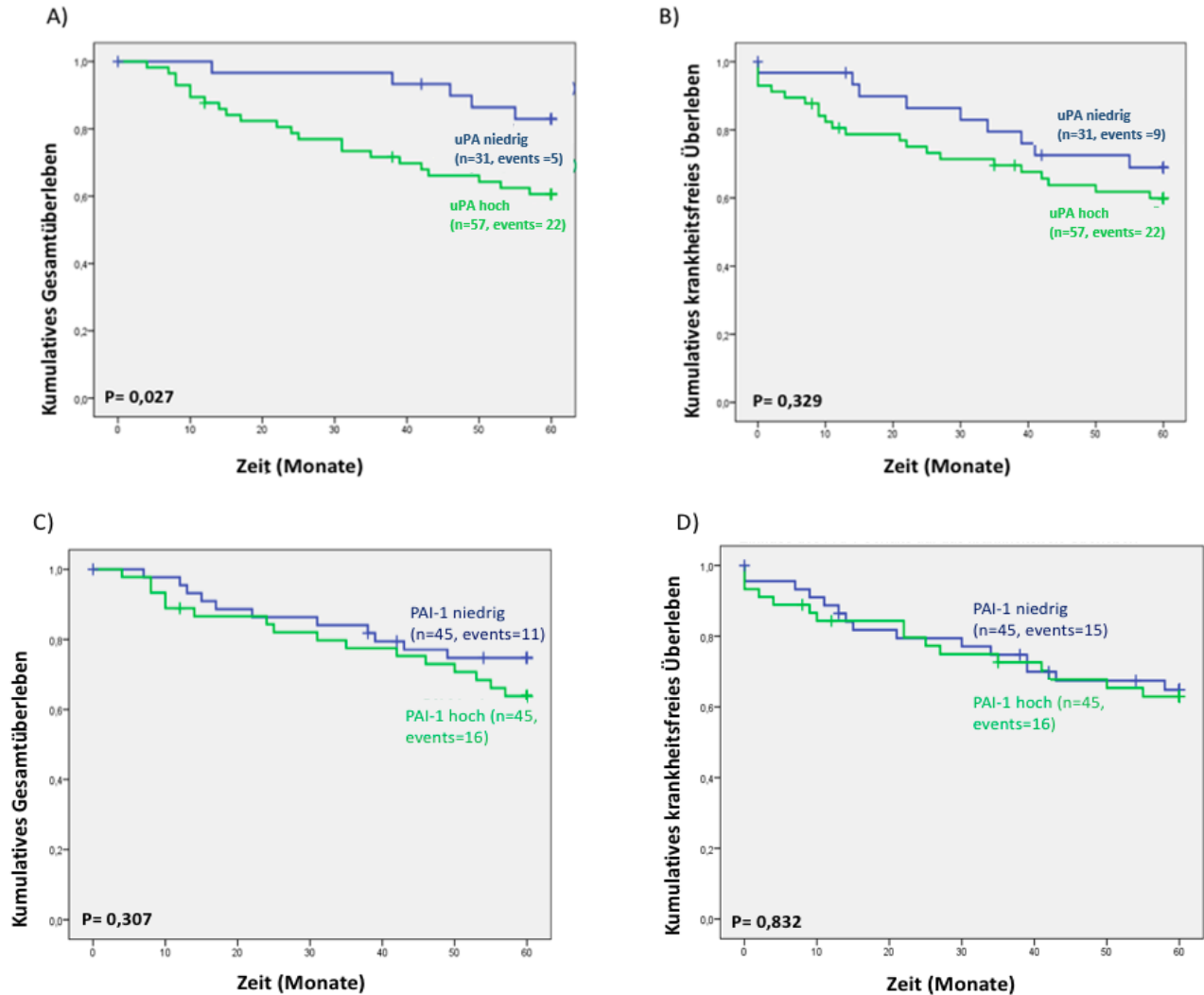


Abb. 11: Einfluss des uPA- (*Cut-off* = 2,62 (35,2%)) (A, B) und des PAI-1- (*Cut-off* = Median) (C, D) Gehalts auf das kumulative Gesamt- (A, C) und krankheitsfreie Überleben (B, D) bei Patienten mit TNBC.

Patienten mit hoher uPA-Expression zeigen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben ($p=0,03$) als Patienten mit niedriger uPA-Expression. Im krankheitsfreien Überleben kann kein signifikanter Unterschied zwischen niedriger oder hoher uPA-Expression ($p=0,04$) festgestellt werden. Es zeigt sich kein signifikanter Einfluss der PAI-1-Expression im kumulativen Gesamt- ($p=0,31$) und krankheitsfreien Überleben ($p=0,83$). Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

5.5 Assoziation von uPA-Expressionsniveaus mit Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben: Multivariate Cox-Regressionsanalysen

Auch für uPA wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse in Kombination mit Alter und T-Stadium durchgeführt. Alle drei Faktoren sind in der multivariaten Analyse bezüglich des

Gesamtüberlebens hoch signifikant. Bei dem krankheitsfreien Überleben hingegen ist uPA nicht signifikant (HR 1,64 (95 % CI 0,75-3,61); p= 0,22), Alter (HR 4,12 (95 % CI 1,67-10,16); p= 0,002) und T-Stadium (HR 4,06 (95 % CI 1,87-8,83); p< 0,001) jedoch bleiben signifikant (**Tab. 29**).

Tab. 29 Multivariate Cox-Regressionsanalysen des klinischen Outcomes (Gesamt- und krankheitsfreies Überleben) von TNBC-Patienten in Bezug zu uPA und klinikopathologischen Faktoren

Klinische Parameter	Gesamtüberleben ^a			Krankheitsfreies Überleben ^a		
	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P	Anzahl ^b	HR (95% CI) ^c	P
Alter						
≤ 60 Jahre	46	1	0,001	46	1	0,002
> 60 Jahre	51	11,38 (2,67-48,50)		51	4,123 (1,674-10,158)	
T- Stadium						
T 1/2	77	1	< 0,001	77	1	< 0,001
T 3/4	20	4,32 (1,95-9,54)		20	4,057 (1,865-8,826)	
uPA^d						
low	31	1	0,03	31	1	0,22
high	57	3,03 (1,13-8,07)		57	1,640 (0,746-3,605)	

Signifikante p-Werte sind fett gedruckt

Aufgrund von fehlenden Werten ergibt die eingeschlossene Patientenzahl nicht immer n=97

^a Gesamtüberleben und krankheitsfreies Überleben nach 60 Monaten

^b Patientenzahl

^c HR= hazard ratio (CI= confidence interval)

^d dichotomisiert in niedrige und hohe Werte bei einem cut-off = 2,62 (35,2%)

5.6 Klinikopathologische Faktoren in Assoziation zum Gesamt- und krankheitsfreien Überleben: Kaplan-Meier-Überlebenskurven und Log-Rank-Tests

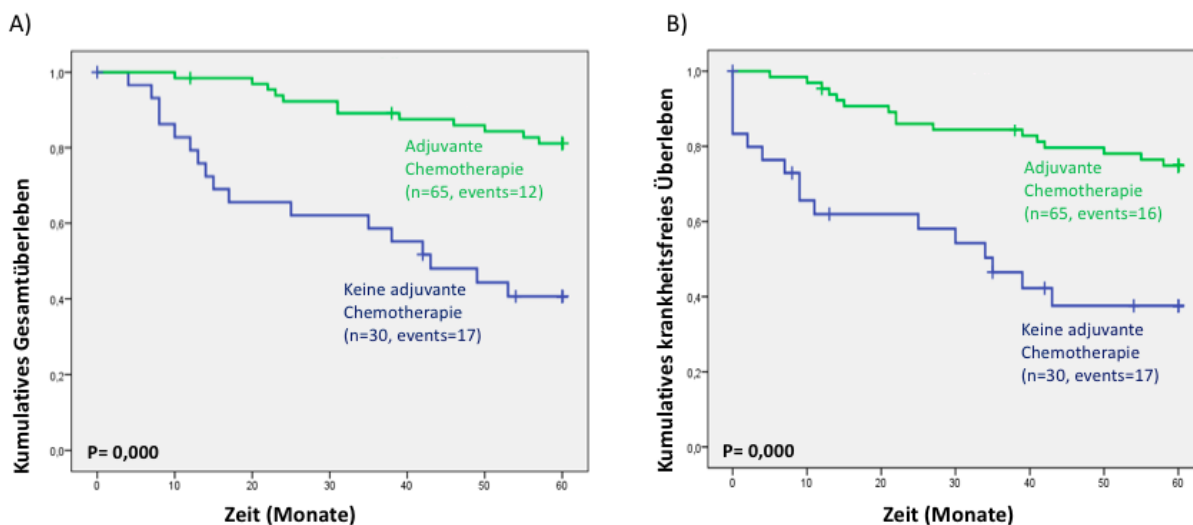
Mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven und Log-Rank-Tests wurden auch diverse klinische sowie histopathologische Faktoren in Hinblick auf die 5-Jahres-Überlebensrate und das krankheitsfreie Überleben nach 5 Jahren untersucht.

65 Patienten erhielten eine adjuvante Chemotherapie, 30 Patienten erhielten keine. Eine adjuvante Chemotherapie beeinflusst in unseren statistischen Auswertungen sowohl das Gesamt- als auch das krankheitsfreie Überleben signifikant (p< 0,001) (**Abb. 12 a, b**). 17 der 30

Patienten, die keine adjuvante Chemotherapie erhielten, verstarben innerhalb von 5 Jahren (= 56 %). Dahingegen verstarben in der Gruppe der adjuvant therapierten Patienten nur 12 von 65 (= 18 %).

Zusätzlich wurde untersucht, ob im Speziellen eine Anthracyclin-haltige Chemotherapie einen Vorteil gegenüber dem Verzicht auf eine adjuvante Chemotherapie darstellt. Auch hier zeigte sich eine signifikante Reduktion von Ereignissen nach Anthracyclin-haltiger Therapie. Eine Anthracyclin-haltige Chemotherapie erhielten 30 Patienten, 35 erhielten keine. In der Gruppe der Patienten ohne Chemotherapie beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nur 43 %, wohingegen die der Patienten mit Anthracyclin-haltiger Chemotherapie 86 % beträgt ($p < 0,001$). Auch für das krankheitsfreie Überleben zeigt eine Anthracyclin-haltige Chemotherapie einen signifikanten Benefit ($p = 0,001$) (**Abb. 12 c, d**).

Außerdem wurden die zwei gängigsten Chemotherapie-Konzepte untereinander verglichen. Adjuvant wurden meist eine CMF-Chemotherapie (= Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil) oder eine Anthracyclin-haltige Chemotherapie im untersuchten TNBC-Kollektiv initiiert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied sowohl in der Gesamtüberlebens- als auch in der krankheitsfreien Überlebensrate (**Abb. 12 e, f**).



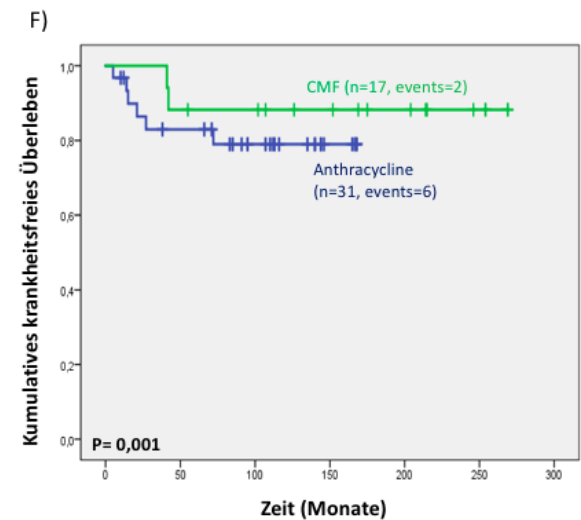
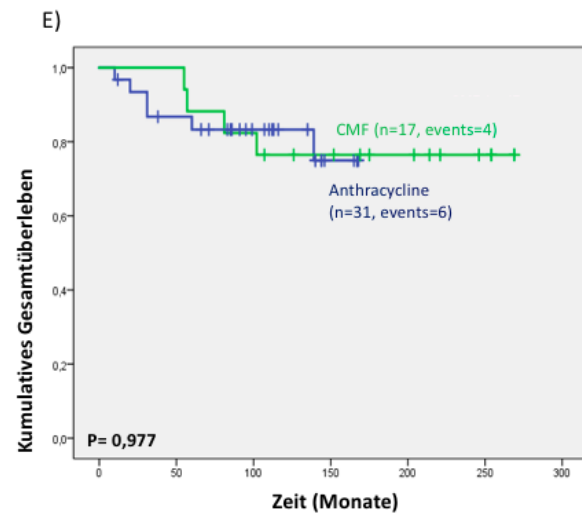
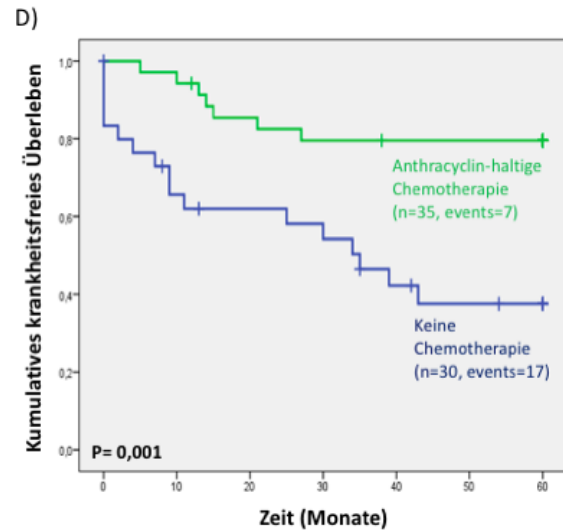
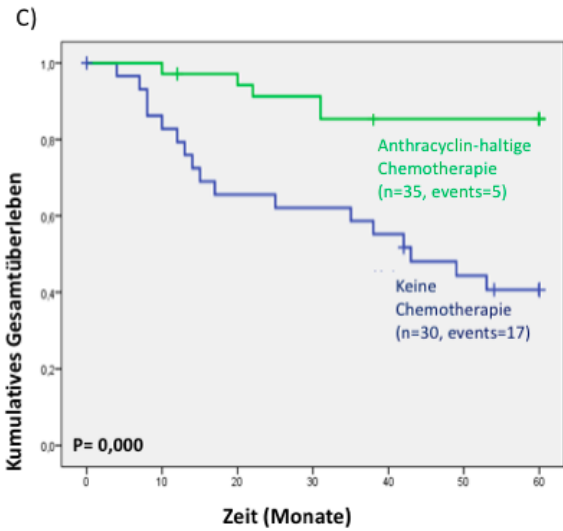


Abb. 12: Einfluss einer adjuvanten Chemotherapie (A, B), einer anthracyclin-haltigen vs. keiner Chemotherapie (C, D) und CMF vs. Anthracyclin (E, F) auf das kumulative Gesamt- und krankheitsfreie Überleben bei Patienten mit TNBC.

Patienten, welche ohne adjuvante Chemotherapie behandelt wurden, zeigen ein signifikant schlechteres Gesamt- ($p < 0,001$) und krankheitsfreies Überleben ($p < 0,001$) als Patienten mit adjuvanter Chemotherapie. Ebenso zeigt eine Anthracyclin-haltige Chemotherapie eine signifikante Besserung des Gesamt- ($p < 0,001$) (C) und des krankheitsfreien Überlebens ($p = 0,001$) (D) versus keine Anwendung von Chemotherapie. Eine Anwendung einer Anthracyclin- oder CMF-haltigen Chemotherapie weist keinen signifikanten Unterschied im Gesamt- ($p = 0,98$) (E) und krankheitsfreien Überleben ($p = 0,40$) auf (F).

Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

Unterteilt man das T-Stadium in T1/2 und T3/4 kann man einen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- ($p < 0,001$) und krankheitsfreie Überleben ($p < 0,001$) feststellen (**Abb. 13**). Patienten mit einem hohen T-Stadium (T3/4) haben ein signifikant schlechteres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben als Patienten mit niedrigem (T1/2) T-Stadium.

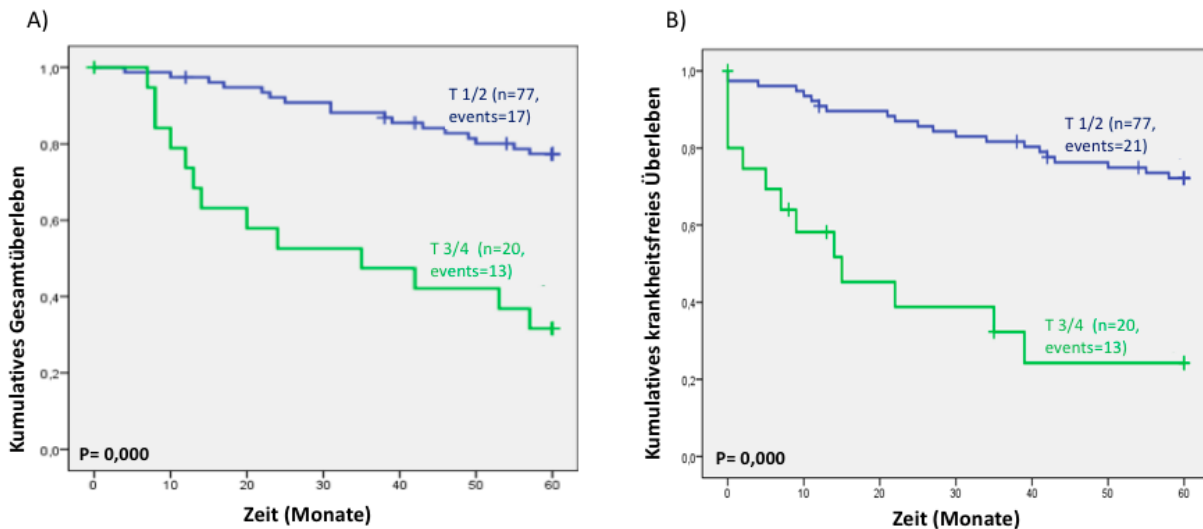


Abb. 13: Einfluss der verschiedenen T-Stadien unterteilt in T1/2 und T3/4 auf das kumulative Gesamt- (A) und krankheitsfreie Überleben (B) bei TNBC-Patienten.

Das Gesamt- ($p < 0,001$) und krankheitsfreie Überleben ($p < 0,001$) ist signifikant abhängig vom T-Stadium. Patienten mit hohem T-Stadium (T3 und T4) zeigen ein signifikant schlechteres Gesamt- ($p < 0,001$) (C) und krankheitsfreies Überleben ($p < 0,001$) (D) als Patienten mit niedrigem T-Stadium (T1 und T2). Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

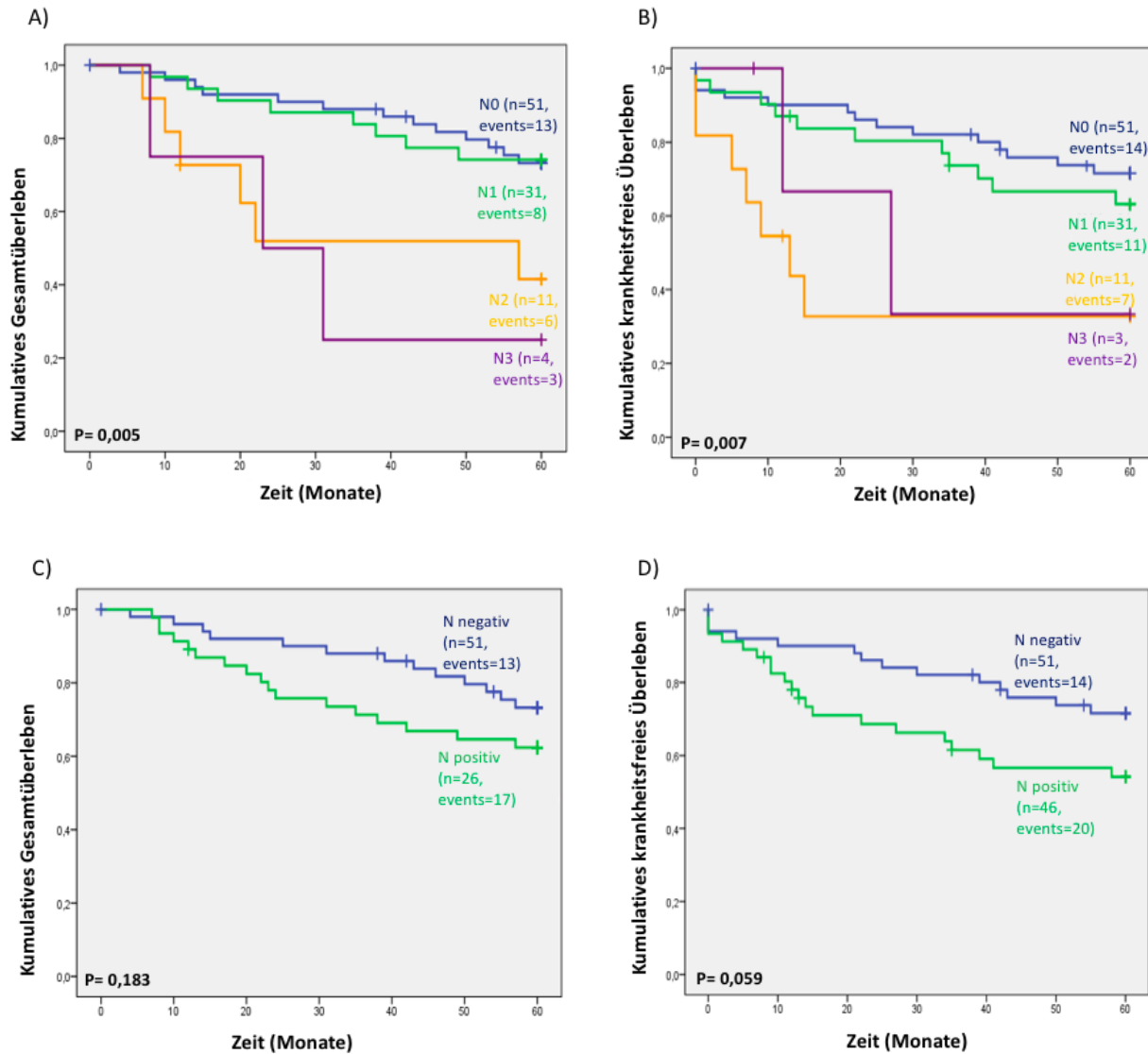


Abb. 14: Einfluss des Nodalstatus auf das kumulative Gesamt- (A) und krankheitsfreie Überleben (B) bei TNBC-Patienten.

Das Gesamt- ($p=0,01$) (A) und krankheitsfreie Überleben ($p=0,01$) (B) ist signifikant abhängig vom Nodalstatus. Ein nodalnegativer Status hat gegenüber einem nodalpositiven Status keinen signifikanten Einfluss auf Gesamt- (C) und krankheitsfreies Überleben (D). Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

Betrachtet man den Nodalstatus in Anbetracht seines Niveaus, so kann man sehen, dass ein höherer Nodalstatus mit einem schlechteren Gesamt- ($p < 0,001$) und krankheitsfreien Überleben ($p < 0,001$) einhergeht (**Abb. 14 A, B**). Differenziert man den Nodalstatus nur in positiv und negativ, so zeigt sich zwar ein Trend, aber kein signifikanter Einfluss auf das Gesamtüberleben

oder das krankheitsfreie Überleben (**Abb. 14 C, D**). Dahingegen sieht man einen Unterschied bezüglich des Überlebens, ob eine Primärmetastase vorliegt oder nicht. 91 Patienten des Kollektivs weisen keine Primärmetastase auf. Das 5-Jahres-Überleben liegt bei ihnen bei ca. 74 %. Andererseits verstarben alle 6 Patienten mit Primärmetastase innerhalb von 5 Jahren ($p < 0,001$) (**Abb. 15**).

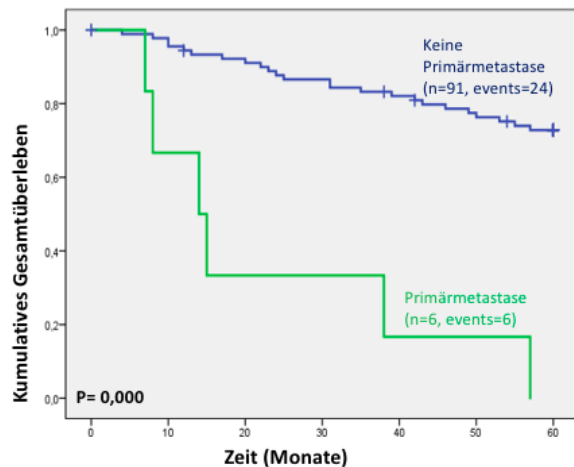


Abb. 15: Einfluss des Vorhandenseins einer Primärmetastase auf das kumulative Gesamt-Überleben bei TNBC-Patienten.

Das Gesamt-Überleben ($p < 0,001$) ist signifikant schlechter bei Vorhandensein einer Primärmetastase. Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod.

Das *Grading* zeigt in unseren Analysen keine signifikante Korrelation zum Überleben (**Abb. 16**). Eine Unterteilung in ein G1/2 vs. G3/4 wies keinen signifikanten Unterschied im Gesamt- oder krankheitsfreien Überleben auf.

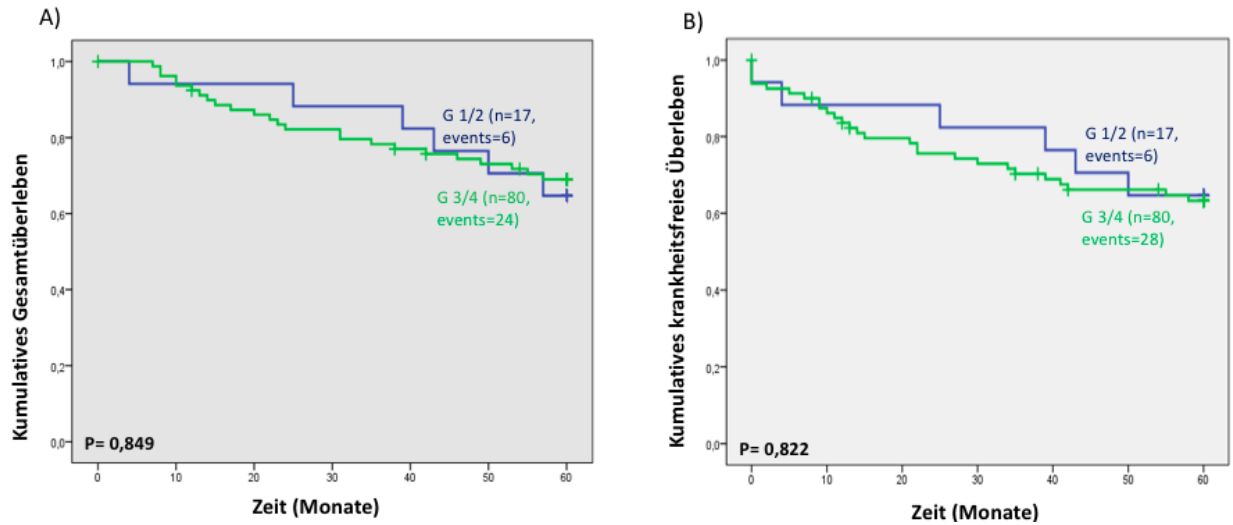


Abb. 16: Einfluss des Grading auf das kumulative Gesamt- (A) und krankheitsfreie Überleben (B) bei TNBC-Patienten.

Das Grading zeigt keine Signifikanz in Bezug zum Gesamt- ($p = 0,85$) (A) und krankheitsfreien Überleben ($p = 0,82$) (B). Überlebenskurven wurden mithilfe von Kaplan-Meier-Kurven gezeichnet. Event Gesamtüberleben: Tod, Event krankheitsfreies Überleben: Rezidiv.

6. Diskussion

Die personalisierte Krebsmedizin beinhaltet eine auf den Patienten bzw. den biologischen Eigenschaften des Tumors maßgeschneiderte Therapie. Patientinnen mit Östrogen-, Progesteron- oder HER2neu-positiven Mammakarzinomen können schon heute eine solche zielgerichtete Therapie erhalten. Dahingegen gibt es die Subgruppe der TNBCs, bei der bislang nur die klassische Chemotherapie als Therapieoption vorhanden ist, leider jedoch mit unbefriedigenden Ansprechraten (Hammond et al., 2010). TNBC ist eine Tumorentität, die besonders jüngere Patientinnen betrifft und ihre Aggressivität durch ein hohes Grading, eine extensive Tumorausdehnung sowie eine hohe Lymphknotenmetastasierungsrate präsentiert. Die Prognose ist durch die Aggressivität und das Fehlen einer zielgerichteten Therapie deutlich schlechter als die anderer Mammakarzinomsubtypen (Wu et al., 2021; Gonzalez-Angulo et al., 2011; van 't Veer et al., 2002). Dies spiegelt die Notwendigkeit wieder, neue Therapien zu erforschen.

Durch eine Vielzahl an internationalen klinischen Studien wurde bereits die sowohl prognostische als auch prädiktive Relevanz von uPA, ihres Rezeptors uPAR und des uPA-Inhibitors PAI-1 an verschiedenen Brustkrebs-Subgruppen belegt (Banys-Paluchowski et al, 2019; Deryugina et al., 2012). Daher werden seit 2007 uPA und PAI-1 durch die ASCO (*American Society for Clinical Oncology*) als Biomarker für die Risikobeurteilung von Brustkrebs-Patientinnen empfohlen. Es zeigte sich im Verlauf, dass uPA, PAI-1 und uPAR-Expression bereits auf der Genebene durch Interaktion von auf deren mRNAs ausgerichteten miRNAs moduliert werden können (Di Leva et al., 2014; Friedman et al., 2009). Dadurch eignen sich nicht nur uPA, PAI-1 und uPAR mRNA- bzw. Proteinexpression, sondern auch die sie regulierenden miRNAs potentiell als neue prognostische sowie prädiktive Faktoren beim Brustkrebs, auch für TNBC-Patientinnen.

6.1 Patientencharakteristika und klinikopathologische Faktoren

TNBC-Patientinnen sind mit 54 Jahren im Durchschnitt jünger als Rezeptor-positive Patientinnen (Median 65 Jahre) (Bauer et al., 2007). In Konkordanz zur Literatur beträgt das Durchschnittsalter

unseres Patientenkollektivs 59 Jahre, wobei die jüngste Patientin 30 Jahre alt und die älteste 97 Jahre alt war. Im Vergleich zum Rezeptor-positiven Mammakarzinom weist das TNBC meist bereits bei Diagnosestellung ein höheres Grading sowie größere Ausdehnung auf (Haffty et al., 2006). Auch in unserem Patientenkollektiv wurde in 82 % der Fälle der Tumor mit einem G3-Stadium klassifiziert. 79% der Karzinome befanden sich entweder im T1 oder T2 Stadium. Ovcaricek et al. (2011) beschreiben in Ihrer Studie eine Tumorgröße über 2 cm in 59 % der Fälle und positive Lymphknotenmetastasen in 46 %. Wir konnten eine ähnliche Verteilung in unserer Patientenkohorte beobachten. Ein Auftreten von Lymphknotenmetastasen zeigte sich in 47 % der Fälle und die Tumorgröße war in 79 % der Fälle größer als 2 cm.

Liedtke et al. (2013) wertete klinikopathologische Faktoren von 1732 Patienten im Hinblick auf deren prognostische Relevanz aus. Alter < 40 Jahre, extensive Tumorausdehnung, positiver Nodalstatus und ein hohes Grading wurden als unabhängige Prädiktoren für eine schlechte Prognose identifiziert. In unserer Kohorte zeigten sich nur teilweise übereinstimmende Ergebnisse. Ein junges Alter (< 60 Jahre) zeigte sich als signifikant positiv-prädiktiver Faktor für das allgemeine und krankheitsfreie 5-Jahres-Überleben. Patienten mit einem Alter über 60 Jahren hatten ein 8-fach erhöhtes Risiko innerhalb von 5 Jahren zu versterben (95 % CI = 2,71 – 22,33; $p < 0,001$) und ein 4-fach erhöhtes Rezidivrisiko (95 % CI = 1,75 - 8,59; $p = 0,001$). Aufgrund der unterschiedlichen Spannweite der Alterseinteilung in unserer Studie im Vergleich zu den Daten von Liedtke et al. (2013) kann jedoch kein direkter Vergleich gezogen werden. Eine bessere Prognose bei Patienten < 60 Jahren in unserer Kohorte kann, neben weiteren Faktoren, durch einen häufigeren Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie erklärt sein.

Zwar wiesen in unserer Kohorte 77 von 97 Patienten eine Tumorgröße größer als 2 cm auf, dennoch konnte weder in den Kaplan-Meier-Überlebenskurven noch in der univariaten Cox-Regressionsanalyse eine prognostische Signifikanz für das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben festgestellt werden. Neben der Tumorgröße spielt jedoch auch das T-Stadium eine entscheidende Rolle. Deshalb haben wir die T-Stadien in den Subgruppen T1/2 und T3/4 zusammengefasst und verglichen. Wir konnten zeigen, dass in unserer Kohorte ein hohes T-Stadium mit einer signifikant schlechteren Prognose bezüglich Gesamtüberleben (HR 4,76 (95 %

CI 2,30-9,84), $p < 0,001$) und krankheitsfreiem Überleben einhergeht (HR 5,02 (95 % CI 2,46 - 10,25), $p < 0,001$).

Anders als durch verschiedene Autoren beschrieben gab es in unserer Kohorte keinen signifikanten Unterschied zwischen Nodal-negativem oder -positivem TNBC in Bezug zum Gesamt- oder krankheitsfreiem Überleben (He et al., 2017; Liedtke et al., 2013; Ovcaricek et al., 2011). Trotzdem konnten wir mittels Kaplan-Meier-Analyse eine prognostische Signifikanz der Höhe des Nodalstatus (N0 bis N3) für Gesamt- ($p < 0,001$) und krankheitsfreies Überleben ($p < 0,001$) bestätigen. Je höher die Klassifizierung des Nodalstatus, desto schlechter das Überleben bzw. je höher ist das Risiko für das Auftreten eines Rezidivs oder einer Metastasierung. In der weiteren Analyse zeigten Patienten mit einem lymphonodalen Stadium N0 und N1 keinen signifikanten Unterschied bezüglich ihres Gesamt- und krankheitsfreien Überlebens ($p = 0,18$). Demgegenüber zeigten Patienten mit lymphonodalem Stadium N2 oder N3 trendmäßig eine schlechtere Prognose ($p = 0,06$).

In unserer Analyse hatte, anderes als von anderen Autoren beschrieben, das Tumorgrading keinen signifikanten Einfluss auf das 5-Jahres-Gesamt- und krankheitsfreie Überleben. Dies könnte daran liegen, dass in unserer Kohorte 82 % der Patienten ein Stadium G3 oder G4 und lediglich 18 % ein niedrigeres Stadium aufwiesen. Um eine definitive Aussage treffen zu können, müssten weiterführende Analysen zweier vergleichbarer Gruppen an einem möglichst großen Patientenkollektiv durchgeführt werden.

Zusammenfassend spiegelt die Zusammensetzung unseres Kollektivs die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Entität TNBC gut wider.

6.2 uPA und PAI-1 und deren prognostische Relevanz

uPA ist eine Serin-Protease, welche auf Chromosom 10q24 lokalisiert ist und Substrat-spezifisch Plasmin aus Plasminogen generiert. *In vitro* Studien zeigen, dass uPA zudem auch andere Proteine wie Fibronectin, *alpha6 integrin*, *hepatocyte growth factor (HGF)*, uPAR und uPA selbst spalten kann (Dano et al., 2005; Duffy, 2004; Schmitt et al., 2010). Plasmin wiederum baut

Bestandteile der ECM wie Laminin, Fibronectin, Tenascin C und Osteopontin ab und kann spezifische Metalloproteasen (z.B. MMP1, MMP2, MMP3, MMP9, MMP12, and MMP13) aktivieren. Durch Degradation der ECM wird die Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie *fibroblast growth factor 2*, *transforming growth factor beta* und HGF gefördert (Deryugina et al., 2012; Tjwa et al., 2009). Des Weiteren bindet uPA an uPAR und kann dadurch onkogene Kaskaden, die über Jak-Stat, *focal adhesion kinase system* und MAPK vermittelt werden, aktivieren. So kann uPA auf direktem und indirektem Wege die Zellproliferation, Migration, Invasion und Metastasierung fördern (D'Alessio et al., 2009).

Die Wirkung von uPA und PAI-1 wurde im Rezeptor-positiven Brustkrebs bereits näher untersucht. Duffy et al. (1988), Jänicke et al. (1989) und Jänicke et al. (1990) berichteten erstmalig, dass eine hohe uPA und PAI-1 Aktivität in Brustkrebsgewebe mit einem schlechteren *Outcome* der Patienten einherging. Weitere Untersuchungen zeigten, dass uPA und PAI-1 statistisch unabhängige, prognostische Marker im Brustkrebs sind (Fernö et al., 1996; Foekens et al., 1992; Jänicke et al., 1990). Zusätzlich konnte auch eine prädiktive, therapeutische Relevanz festgestellt werden. Ein hoher uPA und PAI-1 Spiegel wirkte sich vorteilhaft auf das Ansprechen einer CMF- und Anthracyclin-haltigen Chemotherapie aus (Harbeck et al., 2004; Harbeck et al., 2002; Manders et al., 2004). 2007 wurde schließlich uPA/PAI-1 in die Behandlungsempfehlungen der ASCO als neuer Biomarker zur Therapieentscheidung aufgenommen (Harris et al., 2007).

Korrespondierend konnten wir auch im TNBC eine prognostische Relevanz von uPA feststellen. In unserem Patientenkollektiv hatten Patienten mit einer uPA-Expression von größer 2,62 (*Cut-off* 35,2 %) ein fast 3-fach so hohes Risiko innerhalb von 5 Jahren zu versterben (HR 2,85 (CI 95% 1,08-7,53), $p = 0,04$). In der multivariaten Analyse war eine hohe uPA-Expression gemeinsam mit Alter und dem T-Stadium signifikant negativ mit dem Gesamtüberleben korreliert (HR 3,03, CI 95% (1,13-8,09), $p = 0,03$). Somit sind Alter, T-Stadium und uPA-Antigenlevel im TNBC-Tumorgewebe voneinander abhängige Faktoren und haben gemeinsam Einfluss auf das Gesamtüberleben. Dahingegen hat die PAI-1 Proteinexpression in unserer Kohorte keinen signifikanten Einfluss auf das Auftreten eines Rezidivs oder einer Metastasierung.

Für eine möglichst effektive und personalisierte Tumorthherapie ist eine zielgerichtete Therapie von besonderer Bedeutung. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass eine hohe uPA-Expression

im TNBC-Gewebe mit einer schlechten Prognose einhergeht. Im Rezeptor-positiven Brustkrebs wurden bereits diverse *Biologicals* und Synthetika getestet, die spezifisch die Expression oder Aktivität von uPA und PAI-1 vermindern (Andreasen, 2007; Sperl et al., 2001). Eine dieser zielgerichteten und vielversprechenden Therapien ist upamostat (Heidelberg Pharma), ein orales Medikament, welches das uPA-System inhibiert und in Phase I Studien sowie in Phase-II-Studien an Brustkrebs getestet wurde. Patientinnen mit einem HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinom wurden entweder eine Therapie mit upamostat plus Capecitabin oder Cabecitabin-Monotherapie verabreicht. Es zeigte sich ein erhöhtes Ansprechen sowie ein erhöhtes PFS in der Kohorte, welche die Kombinationstherapie erhielt (Goldstein et al., 2010; Heinemann et al., 2013). Auch im Pankreaskarzinom wurde eine Phase-II-Studie durchgeführt, welche eine gute Verträglichkeit von upamostat sowie eine höhere partielle Remissionsrate in Kombination mit Gemcitabin, im Vergleich zu einer Therapie mit Gemcitabin-Monotherapie, zeigte (Heinemann et al., 2013). Aufgrund der von uns erhobenen Daten wäre uPA also auch als Zielstruktur einer zielgerichteten Therapie im TNBC interessant. Der Einsatz von uPA-Inhibitoren im TNBC ist daher von großem Interesse und sollte in weiteren Studien getestet werden.

Bindet der Protease-Inhibitor PAI-1 an uPA, so unterzieht sich der Komplex der Endozytose (Dupont et al., 2009). Aufgrund der Inhibition von uPA könnte angenommen werden, dass PAI-1 ein Gegenspieler von uPA ist. Es wurde jedoch in unterschiedlichen Studien nachgewiesen, dass PAI-1 wie uPA die Tumorprogression fördert. Die hierfür zugrunde liegenden Mechanismen sind die einerseits anti-apoptische und andererseits Angiogenese-fördernde Eigenschaften von PAI-1 (Fang et al., 2012). Kwaan et al. (2000) zeigten, dass bei Zugabe von PAI-1 zu Tumorgewebe die Apoptose von Endothelzellen und Tumorzellen inhibiert wurde. Durch Stimulation der Migration von perivaskulären Endothelzellen wirkt PAI-1 zudem positiv auf die Angiogenese (Bajou et al., 2004; Isogai et al., 2001).

In einer Studie von Xu et al. (2018) wurden mittels TGF- β TNBC-Zellen stimuliert, um in *epithelial mesenchymal transition* (= EMT) zu gehen. Anschließend wurden die Protein-Sekretion und Protein-Expressionsprofile analysiert. Die EMT förderte die Sekretion von PAI-1 durch TNBC-Zellen. PAI-1 wiederum bewirkte Zellwachstum, -invasion und -migration und erhöhte die Expression von mesenchymalen Markern wie N-Cadherin. Auch im Kolonkarzinom und *non-small*

cell lung cancer (NSCLC) wurde bereits eine erhöhte Zellmigration und -proliferation sowie erhöhte EMT-Marker durch PAI-1 festgestellt (Hogan et al., 2013; Kang et al., 2016). Xu et al. (2018) zeigten außerdem eine signifikante positive Korrelation zwischen PAI-1 und N-Cadherin sowie eine negative zwischen PAI-1 und dem epithelialen Marker E-Cadherin. Zudem war die PAI-1 mRNA Expression im Tumorgewebe erhöht und ging mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben einher. In unserer Studie konnten wir allerdings keine prognostische Relevanz von PAI-1 für das krankheitsfreie und Gesamtüberleben im TNCB feststellen. Der Zusammenhang zwischen PAI-1 Expression und prognostischer Relevanz beim TNBC sollte daher in weiteren, größeren Studien erneut geprüft werden.

6.3 miR-7, -16, -27a und deren prognostische Relevanz

In neueren Studien konnte ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von miR-7 und dem Wachstum, der Migration und Invasion von multiplen Karzinomen unter anderem auch im Brustkrebs bereits demonstriert werden (Liu et al., 2014; Ma et al., 2014; Marzioni et al., 2014; Meza-Sosa et al., 2014). Bedeutend für die Metastasierung scheint hierbei die EMT (*epithelial to mesenchymal transition*) zu sein, ein Prozess, bei dem Epithelzellen ihre Zelladhäsionen verlieren, sich durch *Remodeling* des Zytoskeletts und Verlust der Polarität zu Mesenchymzellen umwandeln und dadurch invasives und migratorisches Potenzial erhalten (Wang et al., 2003; Zavadil et al., 2007). E-Cadherin und Vimentin sind zwei Faktoren mit großem Einfluss auf die EMT. E-Cadherin bewirkt die Stabilisierung der Zelladhäsion von Epithelzellen. Bei Vimentin hingegen ist die genaue Funktion noch nicht bekannt, dessen Überexpression kann jedoch in vielen Krebsarten beobachtet werden (Satelli et al., 2011). Kong et al. (2012) zeigten, dass die miR-7-Expression, welche positiv mit dem E-Cadherin- und negativ mit dem Vimentin-Expressionsniveau korreliert, im malignen Brustkrebsgewebe im Vergleich zum normalen Brustgewebe herunterreguliert ist und invers mit dem Metastasierungsrisiko korreliert. Eine Überexpression von miR-7 ging hingegen mit einer Hemmung des Wachstums und der Invasionsfähigkeit von Brustkrebszellen einher. Zudem inhibiert miR-7 FAK (*focal adhesion kinase*), ein wichtiger Mediator der Zellmotilität, -proliferation und des Zellüberlebens, welcher

in vielen soliden Tumoren überexprimiert wird und bei Überexpression mit einer schlechten Prognose und hoher Metastasierungsrate assoziiert ist (Qiao et al, 2022; Jia et al., 2014; Kong et al., 2012; Webster et al., 2009). Durch Herunterregulation von PAK1 (P21 aktivierte Kinase 1), welches in vielen Krebsgeweben überexprimiert wird und Mitose, Regeneration des Zytoskeletts, Zellmigration und Apoptose beeinflusst, sowie die EGFR-Expression und den Proteinkinase-B-Signaltransduktionsweg hemmt, hat miR-7 zudem eine tumorsuppressive Wirkung auf Mammakarzinomzellen (Korać et al., 2022; Webster et al., 2009). Neben der Beeinflussung bereits genannter molekularer Ziele und Transmissionswege reguliert miR-7 in tumorsuppressiver Funktion auch Transkriptionsfaktoren und DNA-Reparatur-Prozesse. Zum einen kann miR-7 durch Ansteuerung des HoxB3-Gens Raf1A (*Ras association domain family*) und den Tumorsuppressor Claudin-6 reaktivieren und zur Hemmung des Zellwachstums von Brustkrebszellen führen (Li et al., 2012). Zum anderen kann miR-7 durch Bindung an SET8-mRNA (*SET domain-containing (lysine methyltransferase) 8*) eine Herunterregulation von SET8 und damit eine verringerte Methylierung von Histon H4 Lysin 20 herbeiführen, was wiederum die EMT und damit das invasive Potenzial von Brustkrebszellen inhibiert (Yu et al., 2013).

Zusammenfassend wird miR-7 in der Literatur beim Mammakarzinom als tumorsuppressiv gehandelt. Unsere Daten zeichnen jedoch ein anderes Bild. In der univariaten Cox-Regressionsanalyse zeigt sich, dass eine hohe Expression tendenziell mit einer schlechten Prognose einhergeht (Gesamtüberleben $p = 0,15$, krankheitsfreies Überleben $p = 0,11$) (aufgrund geringer Fallzahl liegt hier keine Signifikanz vor). In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (Alter, T-Stadium und miR-7 Expression) tritt diese Tendenz noch stärker hervor. Es zeigt sich eine signifikante, positive Korrelation zwischen hohem miR-7 Expressionsniveau und einem 2-fach erhöhten 5-Jahres Mortalitäts- ($p = 0,04$) und Rezidivrisiko ($p = 0,03$). Ursächlich hierfür könnte sein, dass eine hohe miR-7 Konzentration mit dem T-Stadium assoziiert und dadurch in der multivariaten Analyse besser zum Vorschein kommt. Diese Hypothese sollte in weiteren Studien mit größeren Fallzahlen untersucht werden.

miR-16 ist eine der ersten miRNAs, bei der eine Rolle in der Karzinogenese, Proliferation und Metastasierung nachgewiesen werden konnte. Das Gen für miR-16 liegt auf dem Chromosom 13p14. miR-16 inhibiert die Expression der Onkogene BCL2 (B Cell Lymphoma 2) und MCL1

(Myeloid Cel Leukaemia 1). miR-16 übernimmt somit die Rolle eines Tumorsuppressors (Xue et al., 2014). Zusätzlich hemmt miR-16 in normalem Gewebe die Aktivität von CCND1 und WNT3A mRNA, welche Einfluss in Zellproliferation, -invasion und -überleben haben. Durch die Herunterregulation von miR-16 im kranken Gewebe kommt es zu einer verringerten Hemmung von CCND1 und WNT3A-mRNA, was wiederum die Karzinogenese fördert (Bonci et al., 2008). Liang et al. (2015) zeigten zudem eine Assoziation von miR-16 zum FEAT Onkogen (*faint expression in normal tissues, aberrant overexpression in tumors*), welches einen wesentlichen Einfluss in der Tumorgenese durch Suppression der Apoptose hat. Es zeigte sich, dass miR-16 FEAT supprimieren und damit die Apoptose von Krebszellen fördern kann. In einer Studie von Wang et al. (2021) konnte zudem gezeigt werden, dass miR-16 die Proliferation, Migration und Invasion von Brustkrebszellen durch *targeting* von *Actin-binding protein anillin* (ANLN) supprimiert. In unseren Analysen konnte jedoch weder in den Kaplan-Meier-Analysen, noch in den uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalysen eine statistisch signifikante Assoziation zwischen der miR-16-Expression und dem Gesamt- und krankheitsfreien Überleben aufgezeigt werden.

miR-27a spielt eine Rolle in der Tumorgenese von verschiedenen Malignomen wie dem Nieren-, Brust-, Magen- und Cervixkarzinom (Gottardo et al., 2007; Liu et al., 2014; Mertens-Talcott et al., 2007; Wang et al., 2009). Der onkogene Effekt wird in der Regulation des AKT-Signalwegs deutlich. miR-27a unterdrückt die Expression von Prohibitin, was E2F blockieren, damit den AKT-Signalweg unterbrechen kann und so die Tumorzellproliferation fördert. Sie fördert außerdem die Bcl-2-Expression, was wiederum die Zellschädigung begünstigt (Wu et al., 2018; Liu et al., 2009).

Des Weiteren zeigte sich, dass miR-27a *pleckstrin homology domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 2 (PHLPP2)* supprimieren und damit den GSK3 β -Signalweg stimulieren kann (Ding et al., 2017). Hierdurch wird die Brustkrebszellmigration gefördert und durch den Wnt/ β -Catenin-Signalweg (siehe unten) die Migration der Tumorzellen angeregt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression von miR-27a mit einem erniedrigten PTEN-Expressionsniveau und erhöhten p-AKT-Expressionsniveau festgestellt werden. PTEN ist das am zweithäufigsten mutierte Tumorsuppressorgen, welches zudem den MAPK, FAK und PI3K/AKT

Signalweg reguliert. In neueren Studien wurde gezeigt, dass der PI3K/AKT-Signalweg der Schlüsselweg ist, über den PTEN antionkogene Wirkungen entfaltet. Eine PTEN-Inhibition fördert die Zellproliferation (López-Knowles et al., 2010). Durch Herunterregulation von PTEN und BAX und somit Modulation des PI3K/AKT Signalwegs fördert miR-27a die Proliferation von TNBC-Zellen (Wu et al., 2018).

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist ebenfalls ein wichtiges Ziel für miR-27a. Jüngste Studien haben gezeigt, dass miR-27a das *sekretierte Frizzled-Related Protein* (SFRP), einen Regulator des Wnt-Signalwegs, direkt regulieren kann. Im Magen-, Kolon- und Hepatozellulären Karzinom führt die Überexpression von miR-27a zu einer Suppression von SFRP1 und damit zu einer kontinuierlichen Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweg, welcher die EMT stimuliert und damit tumorfördernd wirkt (Chen et al., 2018). Das Transmembranprotein 170B (TMEM170B) wurde auch als neues Ziel von miR-27a entdeckt. Es fördert die zytoplasmatische β -Catenin-Phosphorylierung, was zu einer Hemmung der β -Catenin-Stabilisierung führt (Li et al., 2018). Auch auf den RAS/MERK/ERK-Signalweg hat miR-27a Einfluss. Durch die Hemmung des B-Zell-Translokationsgens 2 kann miR-27-3p den Ras/MEK/ERK-Signalweg und den c-myc-Spiegel hochregulieren und so die Proliferation von Krebszellen fördern (Zhou et al., 2016). Zudem haben neuere Studien gezeigt, dass miR-27a die ERK-Phosphorylierung durch Herunterregulieren des ERK-Inhibitors sprouty2 fördert und den p38/mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweg reguliert, was sich wiederum tumorfördernd äußert (Saha et al., 2015).

miR-27a kann durch Bindung an die 3' untranslatierte Region zum Silencing des FBXW7-Gens führen. Das Silencing von FBXW7 wiederum erhöht die Expression von KLF5 und miR-27a, was zu einer Funktionsstörung von c-myc führt (Miki et al., 1994; King et al., 2013). Durch diese Funktionsstörung kommt es zu einer Überexpression von miR-23a, miR-24-2 und miR-27a und damit zu einer Verringerung von SPRY2. p44/42 MAPK wird aktiviert, was die Invasion von Krebszellen zu fördert (Xiaoni Li et al., 2013).

Außerdem hat miR-27a einen supprimierenden Einfluss auf ZBTB10, ein Suppressor der Proteine Sp1, 3 und 4, welche in Brustkrebszellen überexprimiert werden und die Angiogenese und Proliferation von Tumorzellen fördern (Mertens-Talcott et al., 2007). In TNBC-Zelllinien konnte

bereits eine Überexpression von miR-27a gegenüber normalem Brustgewebe festgestellt werden, was zu einer Herunterregulation von CDC27 führte und damit eine herabgesetzte Radiosensitivität der Zellen begünstigte (Ren et al., 2015). In einer Studie von Drayton et al. (2014) beim Urothelkarzinom zeigte sich eine erhöhte Cisplatin-Resistenz der Tumorzellen im Falle einer Überexpression von miR-27a durch Regulation des Cystin-Glutamat-Exchangers SLC7A11. In einer Studie von Wu et al. (2018) konnte in TNBC-Zellreihen eine Korrelation zwischen einer Überexpression von miR-27a und der Zellproliferation, Migration und Invasion festgestellt werden. Zusätzlich schützt miR-27a das Überleben von TNBC-Zellen nach Radiatio und hemmt deren Apoptose.

Lu et al. (2017) führte eine Meta-Analyse verschiedener Studien durch, wo miRNAs in Bezug auf deren prognostische Relevanz im TNBC untersucht wurden. Insgesamt wurden nur 4 Studien identifiziert, welche eine Aussage über das Gesamtüberleben trafen, nur eine Studie hiervon untersuchte auch das krankheitsfreie Überleben. Der Konsens der Studien war, dass eine hohe Konzentration von miR-27a/b mit einem schlechteren Gesamtüberleben einhergeht (HR 2,38 (95 % CI 1,32 – 4,29)). In unseren univariaten Cox-Regressionsanalysen konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. miR-27a zeigt bei einem *Cut-off* Wert von 2,07 eine Signifikanz für das 5-Jahres-Gesamt- und krankheitsfreie Überleben: Patienten mit einer hohen miR-27a Konzentration haben ein doppelt so hohes Risiko innerhalb von 5 Jahren zu versterben (HR 2,20 (95 % CI 1,02-4,73); p= 0,04) oder ein Rezidiv zu erleiden (HR 2,35, CI 95% (1,15 – 4,78); p= 0,02). miR-27a war jedoch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse mit Alter und T-Stadium nicht mehr signifikant.

miR-16 und miR-27a korrelieren moderat hoch miteinander, was auf eine gemeinsame Regulation der Expression hindeutet. Der Genlokus der beiden miRNAs ist jedoch verschieden, das Gen von miR-16 liegt auf Chromosom 13, das von miR-27a auf Chromosom 19. He et al. (2016) zeigten beim Nasopharynxkarzinom, dass eine Herunterregulation von miR-16 zu einer Hemmung des PI3K/AKT- und MAPK-Signalwegs führt und damit die Proliferation, Migration und Lungenmetastasierung fördert. Auch miR-27a reguliert den PI3K/AKT- und MAPK-Signalweg durch Herunterregulation von PTEN. Beide miRs scheinen auch beim TNBC über ihren gemeinsamen molekularen Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und

Progression zu spielen. Die Bestätigung einer gemeinsamen Funktion innerhalb der Signalkaskade könnte somit zu einem besseren Verständnis der genauen molekularbiologischen Zusammenhänge führen.

Zusammenfassend haben wir durch unsere Korrelationsanalyse keinen Hinweis auf eine Existenz einer miR-uPA-Achse für miR-7, miR-16 und miR-27a. Nichtsdestotrotz konnten wir mithilfe unserer Analysen den prognostischen Einfluss von miR-27a und uPA auf das Gesamt- und/oder krankheitsfreie Überleben feststellen. miR-7 zeigte in den univariaten Analysen zwar keine statistisch signifikante prognostische Relevanz, war aber in der multivariaten Analyse zusammen mit Alter und T-Stadium ein unabhängiger Faktor.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Der triple-negative Brustkrebs stellt eine heterogene, aggressive Entität mit schlechtem Ansprechen auf die konventionelle Chemotherapie dar. Die genauere Erforschung von prognostischen und prädiktiven Markern sowie Möglichkeiten einer zielgerichteten Therapie sind essentiell, um das bislang unbefriedigende *Outcome* der Betroffenen zu verbessern. Auf der Suche nach solchen Markern analysierten wir die Assoziation von Konzentration von miR-7, miR-16 und miR-27a sowie uPA und PAI-1 in TNBC-Gewebe mit dem 5-Jahres-Gesamtüberleben und krankheitsfreiem Überleben. In unserer Studie konnte eine signifikante Korrelation von miR-27a mit sowohl dem krankheitsfreien als auch dem Gesamtüberleben gesehen werden. Eine hohe miR-27a Konzentration im Tumorgewebe geht mit einer schlechteren Prognose des Krankheitsverlaufs einher. Auch uPA präsentiert sich als ein prognostischer Marker für das 5-Jahres-Gesamtüberleben, wobei ein hoher uPA-Spiegel mit einer höheren Sterblichkeitsrate einhergeht. miR-7 zeigte in der multivariaten Analyse mit Alter und T-Stadium eine Signifikanz bezüglich Gesamt- und krankheitsfreiem Überleben. miR-16 und PAI-1 hingegen zeigen in unserer Studie keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamt- und krankheitsfreie Überleben bei TNBC-Patientinnen. Zusammengenommen konnte eine miR-uPA-Achse für miR-7, miR-16 und miR-27a in unseren Analysen nicht identifiziert werden. Dennoch stellen miR-7, miR-27a und uPA potentiell interessante prognostische Marker für eine Unterscheidung zwischen Hoch- und Niedrigrisikopatienten dar, die zur Therapieentscheidung beitragen können. Die beobachtete klinische Relevanz dieser Marker in unserem recht kleinen TNBC-Kollektiv muss in weiteren klinischen Studien mit größeren Patientinnenkollektiven validiert werden. Bestätigen sich die hier gefundenen Hinweise stellen diese Marker auch potentielle Ziele für eine auf den Patienten individualisierte, zielgerichtete Therapie dar.

8. Quellenverzeichnis

- E. B. C. T. C. G. (2019). Increasing the dose intensity of chemotherapy by more frequent administration or sequential scheduling: a patient-level meta-analysis of 37 298 women with early breast cancer in 26 randomised trials. *Lancet*, 393(10179), 1440-1452.
- Ács, B., Zámbo, V., Vízkeleti, L., Szász, A.M., Madaras, L., Szentmártoni, G, Tőkés, T., Molnár, B. Á., Molnár, I.A., Vári-Kakas, S., Kulka, J., Tőkés, A.M. (2017). Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Diagn Pathol* 12, 20.
- AGO. Guidelines Breast Version (2020), from <https://www.ago-online.de/leitlinien-empfehlungen/leitlinien-empfehlungen/kommission-mamma>
- Ameres, S. L., & Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. [Review]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(8), 475-488.
- Andreasen, P. A. (2007). PAI-1 - a potential therapeutic target in cancer. *Curr Drug Targets*, 8(9), 1030-1041.
- Atchley, D. P., Albarracin, C. T., Lopez, A., Valero, V., Amos, C. I., Gonzalez-Angulo, A. M., Hortobagyi G.N., Arun B.K. (2008). Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 26(26), 4282-4288.
- AWMF S3 Leitlinie Mammakarzinom(2020). *Leitlinienprogramm Onkologie*, from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/032-045OLI_S3_Mammakarzinom_2020-02.pdf
- Bajou, K., Maillard, C., Jost, M., Lijnen, R. H., Gils, A., Declerck, P., Carmeliet, P., Foidart, J.M., Noel, A. (2004). Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene*, 23(41), 6986-6990.
- Banys-Paluchowski, M., Witzel, I., Aktas, B., Fasching, P.A., Hartkopf, A., Janni, W., Kasimir-Bauer, S., Pantel, K., Schön, G., Rack, B., Riethdorf, S., Solomayer, E.F., Fehm, T., Müller, V. (2019). The prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the blood of patients with metastatic breast cancer. *Sci Rep* 9, 2318.
- Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., & Snider, N. T. (2018). Vimentin on the move: new developments in cell migration. *F1000Res*, 7.
- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. A., & Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype. *Cancer*, 109(9), 1721-1728.
- Beelen, K., Opdam, M., Severson, T. M., Koornstra, R. H., Vincent, A. D., Wesseling, J., Muris, J. J., Berns, E.M., Vermorken, J.B., van Diest, P.J., Linn, S.C. (2014). PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 16(1), R13.
- Beezhold, K. J., Castranova, V., & Chen, F. (2010). Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Molecular Cancer*, 9, 134-134.

- Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D'Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., Bartucci, M., Muto, G., Peschle, C., De Maria, R. (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med*, *14*.
- Borri F, Granaglia A (2021). Pathology of triple negative breast cancer. *Semin Cancer Biol*. Jul;72:136-145.
- Bose D, Banerjee S, Singh RK, Wise LM, Robertson ES (2020). Vascular endothelial growth factor encoded by Parapoxviruses can regulate metabolism and survival of triple negative breast cancer cells. *Cell Death Dis*. 2020 Nov 20;11(11):996.
- Bouchet, C., Hacène, K., Martin, P. M., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Lasry, S., Oglobine, J., Spyrtatos, F (1999). Dissemination risk index based on plasminogen activator system components in primary breast cancer. *J Clin Oncol*, *17*(10), 3048-3057.
- Breckwoldt, M. K., Manfred; Albrecht, Pfleiderer (2008). *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Vol. 5). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
- Breen N, Gentleman JF, Schiller JS. Update on mammography trends: comparisons of rates in 2000, 2005, and 2008 (2011). *Cancer* May 15;117(10):2209-18.
- Böcker, W. D., Helmut; Heitz, Phillip; Höfler, Gerald; Kreipe, Hans; Moch, Holger. (2012). *Pathologie* (Vol. 5). München: Elsevier.
- Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, *6*(11), 857-866.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., Croce, C.M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 2999-3004.
- Carey, L., Winer, E., Viale, G., Cameron, D., & Gianni, L. (2010). Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol*, *7*(12), 683-692.
- Carlson, R. W., Moench, S. J., Hammond, M. E., Perez, E. A., Burstein, H. J., Allred, D. C., Vogel, C.L., Goldstein, L.J., Somlo, G., Gradishar, W.J., Hudis, C.A., Jahanzeb, M., Stark, A., Wolff, A.C., Press, M.F., Winer, E.P., Paik, S., Ljung, B.M. (2006). HER2 testing in breast cancer: NCCN Task Force report and recommendations. *J Natl Compr Canc Netw*, *4 Suppl 3*, S1-22; quiz S23-24.
- Castera L, Krieger S, Rousselin A, Legros A, Baumann JJ, Bruet O, Brault B, Fouillet R, Goardon N, Letac O, Baert-Desurmont S, Tinat J, Bera O, Dugast C, Berthet P, Polycarpe F, Layet V, Hardouin A, Frébourg T, Vaur D (2014). Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet*;22:1305–13.
- Chang, T. C., Yu, D., Lee, Y. S., Wentzel, E. A., Arking, D. E., West, K. M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*, *40*(1), 43-50.
- Chen, Y., Zhang, F., Zhao, Y., He, K., Zheng, X., Pan, Y., Shao, D., Shang, P., Yang, Y., Zhang, D., Xie, Y., Yao, X., Chen, L., Li, J., Zhang, X. (2018). Obesity-associated miR-27a upregulation promotes hepatocellular carcinoma metastasis through suppressing SFRP1. *Oncotargets Ther*, *11*, 3281-3292.

- Chen H, Zhang Y, Cao X, Mou P (2020). MiR-27a Facilitates Breast Cancer Progression via GSK-3 β . *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2020;19.
- Cho B, Han Y, Lian M, Colditz GA, Weber JD, Ma C, Liu Y (2021). Evaluation of Racial/Ethnic Differences in Treatment and Mortality Among Women With Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncol*. Jul 1;7(7):1016-1023.
- Colleoni, M., Rotmensz, N., Robertson, C., Orlando, L., Viale, G., Renne, G., Luini, A., Veronesi, P., Intra, M., Orecchia, R., Catalano, G., Galimberti, V., Nolé, F., Martinelli, G., Goldhirsch, A. (2002). Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol*, 13(2), 273-279.
- D'Alessio, S., & Blasi, F. (2009). The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 4575-4587.
- Dano, K., Behrendt, N., Hoyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L. R., Ploug, M., Rømer, J. (2005). Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost*, 93(4), 676-681.
- de Jong, M. M., Nolte, I. M., te Meerman, G. J., van der Graaf, W. T., Oosterwijk, J. C., Kleibeuker, J. H., Schaapveld, M., de Vries, E.G. (2002). Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet*, 39(4), 225-242.
- de Witte, J. H., Foekens, J. A., Brüner, N., Heuvel, J. J., van Tienoven, T., Look, M. P., Klijn, J.G., Geurts-Moespot, A., Grebenchtchikov, N., Benraad, T., Sweep, C.G. (2001). Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in cytosols and pellet extracts derived from primary breast tumours. *British journal of cancer*, 85(1), 85-92.
- Denduluri N, Somerfield MR, Chavez-MacGregor M, Comander AH, Dayao Z, Eisen A, Freedman RA, Gopalakrishnan R, Graff SL, Hassett MJ, King TA, Lyman GH, Maupin GR, Nunes R, Perkins CL, Telli ML, Trudeau ME, Wolff AC, Giordano SH (2021). Selection of Optimal Adjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy for Early Breast Cancer: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol*. Feb 20;39(6):685-693.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., Narod, S.A. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 1), 4429-4434.
- Deryugina, E. I., & Quigley, J. P. (2012). Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 564259.
- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). microRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 9, 287-314.
- Ding, L., Zhang, S., Xu, M., Zhang, R., Sui, P., & Yang, Q. (2017). MicroRNA-27a contributes to the malignant behavior of gastric cancer cells by directly targeting PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 2. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 36(1), 45.
- Drayton, R. M., Dudzic, E., Peter, S., Bertz, S., Hartmann, A., Bryant, H. E., Catto, J.W. (2014). Reduced expression of miRNA-27a modulates cisplatin resistance in bladder cancer by targeting the cystine/glutamate exchanger SLC7A11. *Clin Cancer Res*, 20(7), 1990-2000.
- Duffy, M. J. (2004). The urokinase plasminogen activator system: role in malignancy. *Curr Pharm Des*, 10(1), 39-49.
- Duffy, M. J., McGowan, P. M., & Crown, J. (2012). Targeted therapy for triple-negative breast cancer: where are we? *Int J Cancer*, 131(11), 2471-2477.

- Duffy, M. J., McGowan, P. M., Harbeck, N., Thomssen, C., & Schmitt, M. (2014). uPA and PAI-1 as biomarkers in breast cancer: validated for clinical use in level-of-evidence-1 studies. *Breast Cancer Research : BCR*, *16*(4), 428.
- Duffy, M. J., O'Grady, P., Devaney, D., O'Siorain, L., Fennelly, J. J., & Lijnen, H. J. (1988). Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. Preliminary report. *Cancer*, *62*(3), 531-533.
- Duffy SW, Tabár L, Yen AM, Dean PB, Smith RA, Jonsson H, Törnberg S, Chen SL, Chiu SY, Fann JC, Ku MM, Wu WY, Hsu CY, Chen YC, Svane G, Azavedo E, Grundström H, Sundén P, Leifland K, Frodis E, Ramos J, Epstein B, Åkerlund A, Sundbom A, Bordás P, Wallin H, Starck L, Björkgren A, Carlson S, Fredriksson I, Ahlgren J, Öhman D, Holmberg L, Chen TH (2020). Mammography screening reduces rates of advanced and fatal breast cancers: Results in 549,091 women. *Cancer* Jul 1;126(13):2971-2979.
- Dumitrescu, R. G., Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, *9*(1), 208-221.
- Dunn, B. K., Wickerham, D. L., Ford, L. G. (2005). Prevention of hormone-related cancers: breast cancer. *J Clin Oncol*, *23*(2), 357-367.
- Dupont, D. M., Madsen, J. B., Kristensen, T., Bodker, J. S., Blouse, G. E., Wind, T., Andreasen, P.A. (2009). Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *14*, 1337-1361.
- Eden G, Archinti M, Arnaudova R, Andreotti G, Motta A, Furlan F, Citro V, Cubellis MV, Degryse B (2018). D2A sequence of the urokinase receptor induces cell growth through $\alpha\beta 3$ integrin and EGFR. *Cell Mol Life Sci*. May;75(10):1889-1907.
- Eliassen AH, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, Hankinson SE (2006). Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer. *JAMA*. Jul 12;296(2):193-201.
- Eltohamy MI, Badawy OM, El kinaai N, Loay I, Nassar HR, Allam RM, Sakr MA (2018). Topoisomerase II α Gene alteration in Triple Negative Breast Cancer and Its Predictive Role for Anthracycline-Based Chemotherapy (Egyptian NCI Patients). *Asian Pac J Cancer Prev*. Dec 25;19(12):3581-3589.
- Falck, A. K., Röme, A., Fernö, M., Olsson, H., Chebil, G., Bendahl, P. O., Rydén, L. (2016). St Gallen molecular subtypes in screening-detected and symptomatic breast cancer in a prospective cohort with long-term follow-up. *The British Journal of Surgery*, *103*(5), 513-523.
- Fang, H., Placencio, V. R., & DeClerck, Y. A. (2012). Protumorigenic activity of plasminogen activator inhibitor-1 through an antiapoptotic function. *J Natl Cancer Inst*, *104*(19), 1470-1484.
- Fernö, M., Bendahl, P. O., Borg, A., Brundell, J., Hirschberg, L., Olsson, H., Killander, D. (1996). Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunoassay. *Eur J Cancer*, *32a*(5), 793-801.
- Foekens, J. A., Look, M. P., Peters, H. A., van Putten, W. L., Portengen, H., Klijn, J. G. (1995). Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, *87*(10), 751-756.

- Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., Brünner, N., Jänicke, F., Meijer-van Gelder, M.E., Henzen-Logmans, S.C., van Putten, W.L., Klijn, J.G. (2000). The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res*, 60(3), 636-643.
- Foekens, J. A., Schmitt, M., van Putten, W. L. J., Peters, H. A., Bontenbal, M., Jänicke, F., Klijn, J.G. (1992). Prognostic Value of Urokinase-type Plasminogen Activator in 671 Primary Breast Cancer Patients. *Cancer Research*, 52(21), 6101.
- Foekens, J. A., Sieuwerts, A. M., Smid, M., Look, M. P., de Weerd, V., Boersma, A. W., Klijn, J.G., Wiemer, E.A., Martens, J.W. (2008). Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(35), 13021-13026.
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92-105.
- Goldstein, L. J., Stemmer, S. M., Schmalfeldt, B., Gottschalk, N., Cardoso, F., Dushkin, H.(2010). Phase II, two-arm, double-blind, multicenter, randomized study of the combination of oral WX-671 plus capecitabine versus capecitabine in first-line HER2-negative metastatic breast cancer (MBC). *Journal of Clinical Oncology*, 28(15_suppl), TPS131-TPS131.
- Gonzalez-Angulo, A. M., Timms, K. M., Liu, S., Chen, H., Litton, J. K., Potter, J., Lanchbury, J.S., Stemke-Hale, K., Hennessy, B.T., Arun, B.K., Hortobagyi, G.N., Do, K.A., Mills, G.B., Meric-Bernstam, F. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 17(5), 1082-1089.
- Gottardo, F., Liu, C. G., Ferracin, M., Calin, G. A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L.G., Croce, C.M., Baffa, R. (2007). Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol*, 25(5), 387-392.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D140-144.
- Gr ndahl-Hansen, J., Peters, H. A., van Putten, W. L., Look, M. P., Pappot, H., R nne, E., Dano, K., Klijn, J.G., Brünner, N., Foekens, J.A. (1995). Prognostic significance of the receptor for urokinase plasminogen activator in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 1(10), 1079-1087.
- Haffty, B. G., Yang, Q., Reiss, M., Kearney, T., Higgins, S. A., Weidhaas, J., Harris, L., Hait, W., Toppmeyer, D. (2006). Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*, 24(36), 5652-5657.
- Hammond, M. E., Hayes, D. F., Dowsett, M., Allred, D. C., Hagerty, K. L., Badve, S., Fitzgibbons, P.L., Francis, G., Goldstein, N.S., Hayes, M., Hicks, D.G., Lester, S., Love, R., Mangu, P.B., McShane, L., Miller, K., Osborne, C.K., Paik, S., Perlmutter, J., Rhodes, A., Sasano, H., Schwartz, J.N., Sweep, F.C., Taube, S., Torlakovic, E.E., Valenstein, P., Viale, G., Visscher, D., Wheeler, T., Williams, R.B., Wittliff, J.L., Wolff, A.C. (2010). 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*, 28(16), 2784-2795.
- Hammond, M. E. H., Hayes, D. F., Wolff, A. C., Mangu, P. B., Temin, S. (2010). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for

- Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Oncology Practice*, 6(4), 195-197.
- Han Y, Yu X, Li S, Tian Y, Liu C (2020). New Perspectives for Resistance to PARP Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer. *Front Oncol*. Nov 25;10:578095.
- Harbeck, N., Alt, U., Berger, U., Kates, R., Krüger, A., Thomssen, C., Jänicke, F., Graeff, H., Schmitt, M. (2000). Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int J Biol Markers*, 15(1), 79-83.
- Harbeck, N., Kates, R. E., Gauger, K., Willems, A., Kiechle, M., Magdolen, V., Schmitt, M. (2004). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thrombosis and Haemostasis*, 91(3), 450-456.
- Harbeck, N., Kates, R. E., Look, M. P., Meijer-Van Gelder, M. E., Klijn, J. G., Kruger, A., Kiechle, M., Jänicke, F., Schmitt, M., Foekens, J.A. (2002). Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res*, 62(16), 4617-4622.
- Harbeck, N., Schmitt, M., Meisner, C., Friedel, C., Untch, M., Schmidt, M., Sweep, C.G., Lisboa, B.W., Lux, M.P., Beck, T., Hasmüller, S., Kiechle, M., Jänicke, F., Thomssen, C. (2013). Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-NO trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 49(8), 1825-1835.
- Harel ET, Drake PM, Barfield RM, Lui I, Farr-Jones S, Van't Veer L, Gartner ZJ, Green EM, Lourenço AL, Cheng Y, Hann BC, Rabuka D, Craik CS (2019). Antibody-Drug Conjugates Targeting the Urokinase Receptor (uPAR) as a Possible Treatment of Aggressive Breast Cancer. *Antibodies (Basel)*. Nov 5;8(4):54.
- Harris, L., Fritsche, H., Mennel, R., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S., Somerfield, M.R., Hayes, D.F., Bast, R.C. Jr. (2007). American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*, 25(33), 5287-5312.
- Harris LN, Ismaila N, McShane LM, Andre F, Collyar DE, Gonzalez-Angulo AM, Hammond EH, Kuderer NM, Liu MC, Mennel RG, Van Poznak, C., Bast, R.C., Hayes, D.F (2016). Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast Cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*.34(10):1134–1150. doi: 10.1200/JCO.2015.65.2289.
- He, M., Zhang, J.-X., Jiang, Y.-Z., Chen, Y.-L., Yang, H.-Y., Tang, L.-C., Shao, Z.M., Di, G.H. (2017). The lymph node ratio as an independent prognostic factor for node-positive triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 8(27), 44870-44880.
- He, Q., Ren, X., Chen, J., Li, Y., Tang, X., Wen, X., Yang, X., Zhang, J., Wang, Y., Ma, J., Liu, N. (2016). miR-16 targets fibroblast growth factor 2 to inhibit NPC cell proliferation and invasion via PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Oncotarget*, 7(3), 3047-3058.
- Health, N. C. I. o. (2016), from <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=44023>

- Heinemann, V., Ebert, M. P., Laubender, R. P., Bevan, P., Mala, C., & Boeck, S. (2013a). Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer*, *108*(4), 766-770.
- Heinemann, V., Ebert, M. P., Laubender, R. P., Bevan, P., Mala, C., & Boeck, S. (2013b). Phase II randomised proof-of-concept study of the urokinase inhibitor upamostat (WX-671) in combination with gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with non-resectable, locally advanced pancreatic cancer. *British journal of cancer*, *108*(4), 766-770.
- Hogan, N. M., Joyce, M. R., Murphy, J. M., Barry, F. P., O'Brien, T., Kerin, M. J., Dwyer, R.M. (2013). Impact of Mesenchymal Stem Cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *435*(4), 574-579.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds) (2019). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site.
- Huber, M. C., Mall, R., Braselmann, H., Feuchtinger, A., Molatore, S., Lindner, K., Walch, A., Gross, E., Schmitt, M., Falkenberg, N., Aubele, M. (2016). uPAR enhances malignant potential of triple-negative breast cancer by directly interacting with uPA and IGF1R. *BMC cancer*, *16*, 615-615.
- Isogai, C., Laug, W. E., Shimada, H., Declerck, P. J., Stins, M. F., Durden, D. L., Erdreich-Epstein, A., DeClerck, Y.A. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin. *Cancer Res*, *61*(14), 5587-5594.
- Izumiya, M., Tsuchiya, N., Okamoto, K., & Nakagama, H. (2011). Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer Sci*, *102*(9), 1615-1621.
- Jia, J., Martin, T. A., Ye, L., & Jiang, W. G. (2014). FAP-alpha (Fibroblast activation protein-alpha) is involved in the control of human breast cancer cell line growth and motility via the FAK pathway. *BMC Cell Biol*, *15*, 16.
- Jänicke, F., Schmitt, M., & Graeff, H. (1991). Clinical relevance of the urokinase-type and tissue-type plasminogen activators and of their type 1 inhibitor in breast cancer. *Semin Thromb Hemost*, *17*(3), 303-312.
- Jänicke, F., Schmitt, M., Hafter, R., Hollrieder, A., Babic, R., Ulm, K., Gössner, W., Graeff, H. (1990). Urokinase-type plasminogen activator (u-PA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis*, *4*(2), 69-78.
- Jänicke, F., Schmitt, M., Ulm, K., Gössner, W., Graeff, H. (1989). Urokinase-type plasminogen activator antigen and early relapse in breast cancer. *Lancet*, *2*(8670), 1049.
- Kalinowski, F. C., Brown, R. A., Ganda, C., Giles, K. M., Epis, M. R., Horsham, J., Horsham, J., Leedman, P.J. (2014). microRNA-7: a tumor suppressor miRNA with therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol*, *54*, 312-317.

- Kang, J., Kim, W., Kwon, T., Youn, H., Kim, J. S., & Youn, B. (2016). Plasminogen activator inhibitor-1 enhances radioresistance and aggressiveness of non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, 7(17), 23961-23974.
- Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., Takahashi, T. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 96(2), 111-115.
- Kaufmann, M., von Minckwitz, G., Bear, H. D., Buzdar, A., McGale, P., Bonnefoi, H., Colleoni, M., Denkert, C., Eiermann, W., Jackesz, R., Makris, A., Miller, W., Pierga, J.Y., Semiglazov, V., Schneeweiss, A., Souchon, R., Stearns, V., Untch, M., Loibl S. (2007). Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006. *Ann Oncol*, 18(12), 1927-1934.
- Kiechle, M. *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Vol. 2). München: Elsevier (2011).
- King, B., Trimarchi, T., Reavie, L., Xu, L., Mullenders, J., Ntziachristos, P., Aranda-Orgilles, B., Perez-Garcia, A., Shi, J., Vakoc, C., Sandy, P., Shen, S.S., Ferrando, A., Aifantis I. (2013). The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell*, 153(7), 1552-1566.
- King, M. C., Wieand, S., Hale, K., Lee, M., Walsh, T., Owens, K., Tait, J., Ford, L., Dunn, B.K., Costantino, J., Wickerham, L., Wolmark, N., Fisher, B. (2001). Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *Jama*, 286(18), 2251-2256.
- Kong, L. Y., Xue, M., Zhang, Q. C., & Su, C. F. (2017). In vivo and in vitro effects of microRNA-27a on proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through targeting of SFRP1 gene via Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncotarget*, 8(9), 15507-15519.
- Kong, X., Li, G., Yuan, Y., He, Y., Wu, X., Zhang, W., Wu, Z., Chen, T., Wu, W., Lobie, P.E., Zhu, T. (2012). MicroRNA-7 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis of Breast Cancer Cells via Targeting FAK Expression. *PLoS ONE*, 7(8), e41523.
- Korać P, Antica M, Matulić M. (2021). MiR-7 in Cancer Development. *Biomedicines*. Mar 23;9(3):325. doi: 10.3390/biomedicines9030325.
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D68-73.
- KrebsligaSchweiz (2014). Brustkrebs. from <https://shop.krebsliga.ch/files/kls/webshop/PDFs/deutsch/brustkrebs-mammakarzinom-011071012111.pdf>
- Kreienberg, R., Möbus, V., Jonat, W., Kühn, T. (2010). *Mammakarzinom Interdisziplinär*: Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, Jervis S, van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N, Goldgar DE, Terry MB, Rookus MA, Easton DF, Antoniou AC; BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium, McGuffog L, Evans DG, Barrowdale D, Frost D, Adlard J, Ong KR, Izatt L, Tischkowitz M, Eeles R, Davidson R, Hodgson S, Ellis S, Nagues C, Lasset C, Stoppa-Lyonnet D, Fricker JP, Faivre L, Berthet P, Hoening MJ, van der Kolk LE, Kets CM, Adank MA, John EM, Chung WK, Andrulis IL, Southey M, Daly MB, Buys SS, Osorio A, Engel C, Kast K, Schmutzler RK, Caldes T, Jakubowska A, Simard J,

- Friedlander ML, McLachlan SA, Machackova E, Foretova L, Tan YY, Singer CF, Olah E, Gerdes AM, Arver B, Olsson H (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. Jun 20;317(23):2402-2416. doi: 10.1001/jama.2017.7112. PMID: 28632866.
- Kwaan, H. C., Wang, J., Svoboda, K., & Declerck, P. J. (2000). Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis. *Br J Cancer*, 82(10), 1702-1708.
- Lagana, A., Russo, F., Sismeiro, C., Giugno, R., Pulvirenti, A., & Ferro, A. (2010). Variability in the incidence of miRNAs and genes in fragile sites and the role of repeats and CpG islands in the distribution of genetic material. *PLoS One*, 5(6), e11166.
- Lagerros, Y. T., Hsieh, S. F., & Hsieh, C. C. (2004). Physical activity in adolescence and young adulthood and breast cancer risk: a quantitative review. *Eur J Cancer Prev*, 13(1), 5-12.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858.
- Laloo, F., Varley, J., Moran, A., Ellis, D., O'Dair, L., Pharoah, P., Antoniou, A., Hartley, R., Shenton, A., Seal, S., Bulman, B., Howell, A., Evans, D.G. (2006). BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer*, 42(8), 1143-1150.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., Pietenpol, J.A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2750-2767.
- Li JP, Zhang XM, Zhang Z, Zheng LH, Jindal S, Liu YJ (2019). Association of p53 expression with poor prognosis in patients with triple-negative breast invasive ductal carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. May;98(18):e15449.
- Li, M., Han, Y., Zhou, H., Li, X., Lin, C., Zhang, E., Chi, X., Hu, J., Xu, H. (2018). Transmembrane protein 170B is a novel breast tumorigenesis suppressor gene that inhibits the Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Death & Disease*, 9(2), 91.
- Li M, Pan M, Wang J, You C, Zhao F, Zheng D, Guo M, Xu H, Wu D, Wang L, Dou J (2020). miR-7 Reduces Breast Cancer Stem Cell Metastasis via Inhibiting RELA to Decrease ESAM Expression. *Mol Ther Oncolytics*. Jun 4;18:70-82.
- Li, Q., Zhu, F., & Chen, P. (2012). miR-7 and miR-218 epigenetically control tumor suppressor genes RASSF1A and Claudin-6 by targeting HoxB3 in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(1), 28-33.
- Li, X., Liu, X., Xu, W., Zhou, P., Gao, P., Jiang, S., Lobie, P.E., Zhu, T. (2013). c-MYC-regulated miR-23a/24-2/27a cluster promotes mammary carcinoma cell invasion and hepatic metastasis by targeting Sprouty2. *The Journal of biological chemistry*, 288(25), 18121-18133.
- Li, X., Yang, W., Lou, L., Chen, Y., Wu, S., & Ding, G. (2014). microRNA: a promising diagnostic biomarker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*, 59(6), 1099-1107.

- Liang, H., Fu, Z., Jiang, X., Wang, N., Wang, F., Wang, X., Yan, X., Guan, W.X., Zhang, C.Y., Zen, K., Zhang, Y., Chen, X., Zhou, G. (2015). miR-16 promotes the apoptosis of human cancer cells by targeting FEAT. *BMC cancer*, 15, 448-448.
- Liedtke, C., Hess, K. R., Karn, T., Rody, A., Kiesel, L., Hortobagyi, G. N., Pusztai, L., Gonzalez-Angulo, A.M. (2013). The prognostic impact of age in patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 138(2), 591-599.
- Liedtke C, Thill M, Jackisch C, Thomssen C, Muller V, Janni W, Janni W (2017). Committee* AGOB: AGO recommendations for the diagnosis and treatment of patients with early breast Cancer: update 2017. *Breast Care (Basel)*;12(3):172–183.
- Liu, T., Tang, H., Lang, Y., Liu, M., & Li, X. (2009). MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett*, 273(2), 233-242.
- Liu, Z., Liu, Y., Li, L., Xu, Z., Bi, B., Wang, Y., Li, J.Y. (2014). MiR-7-5p is frequently downregulated in glioblastoma microvasculature and inhibits vascular endothelial cell proliferation by targeting RAF1. *Tumour Biol*, 35(10), 10177-10184.
- López-Mejía JA, Tallabs-Utrilla LF, Salazar-Sojo P, Mantilla-Ollarves JC, Sánchez-Carballido MA, Rocha-Zavaleta L (2022). c-Kit Induces Migration of Triple-Negative Breast Cancer Cells and Is a Promising Target for Tyrosine Kinase Inhibitor Treatment. *Int J Mol Sci*. Aug 5;23(15):8702.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., Golub, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838.
- Lu, L., Mao, X., Shi, P., He, B., Xu, K., Zhang, S., Wang, J. (2017). MicroRNAs in the prognosis of triple-negative breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96(22), e7085.
- Lv T, Zhao Y, Jiang X, Yuan H, Wang H, Cui X, Xu J, Zhao J, Wang J (2021). uPAR: An Essential Factor for Tumor Development. *J Cancer*. Oct 17;12(23):7026-7040.
- López-Knowles, E., O'Toole, S. A., McNeil, C. M., Millar, E. K., Qiu, M. R., Crea, P., Daly, R.J., Musgrove, E.A., Sutherland, R.L. (2010). PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *Int J Cancer*, 126(5), 1121-1131.
- Ma, J., Fang, B., Zeng, F., Pang, H., Zhang, J., Shi, Y., Wu, X., Cheng, L., Ma, C., Xia, J., Wang Z. (2014). Curcumin inhibits cell growth and invasion through up-regulation of miR-7 in pancreatic cancer cells. *Toxicol Lett*, 231(1), 82-91.
- Manders, P., Tjan-Heijnen, V. C., Span, P. N., Grebenchtchikov, N., Foekens, J. A., Beex, L. V. (2004). Predictive impact of urokinase-type plasminogen activator: plasminogen activator inhibitor type-1 complex on the efficacy of adjuvant systemic therapy in primary breast cancer. *Cancer Res*, 64(2), 659-664.
- Marzioni, M., Agostinelli, L., Candelaresi, C., Saccomanno, S., De Minicis, S., Maroni, L., Mingarelli, E., Rychlicki, C., Trozzi, L., Banales, J.M., Benedetti, A., Baroni, G.S. (2014). Activation of the developmental pathway neurogenin-3/microRNA-7a regulates cholangiocyte proliferation in response to injury. *Hepatology*, 60(4), 1324-1335.
- Masuda, T., Hattori, N., Senoo, T., Akita, S., Ishikawa, N., Fujitaka, K., Haruta, Y., Murai, H., Kohno, N (2013). SK-216, an inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, limits tumor progression and angiogenesis. *Mol Cancer Ther*, 12(11), 2378-2388.

- McDanel, T. G. (2009). MicroRNA: mechanism of gene regulation and application to livestock. *J Anim Sci*, 87(14 Suppl), E21-28.
- McPherson, K., Steel, C. M., & Dixon, J. M. (2000). Breast cancer—epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ : British Medical Journal*, 321(7261), 624-628.
- McTiernan, A., Rajan, K. B., Tworoger, S. S., Irwin, M., Bernstein, L., Baumgartner, R., Gilliland, F., Stanczyk, F.Z., Yasui, Y., Ballard-Barbash, R. (2003). Adiposity and sex hormones in postmenopausal breast cancer survivors. *J Clin Oncol*, 21(10), 1961-1966.
- Meindl, A., Hellebrand, H., Wiek, C., Erven, V., Wappenschmidt, B., Niederacher, D., Freund, M., Lichtner, P., Hartmann, L., Schaal, H., Ramser, J., Honisch, E., Kubisch, C., Wichmann, H.E., Kast, K., Deissler, H., Engel, C., Müller-Myhsok, B., Neveling, K., Kiechle, M., Mathew, C.G., Schindler, D., Schmutzler, R.K., Hanenberg, H. (2010). Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet*, 42(5), 410-414.
- Meindl A, Ditsch N, Kast K, Schmutzler RK (2011). Hereditary breast and ovarian cancer: New genes, new treatments, new concepts. *Dtsch Arztebl Int*.;108:323–30.
- Melcher, C., Scholz, C., Jäger, B., Hagenbeck, C., Rack, B., & Janni, W. (2012). Breast Cancer: State of the Art and New Findings. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 72(3), 215-224.
- Melo, S. A., Ropero, S., Moutinho, C., Aaltonen, L. A., Yamamoto, H., Calin, G. A., Rossi, S., Fernandez, A.F., Carneiro, F., Oliveira, C., Ferreira, B., Liu, C.G., Villanueva, A., Capella, G., Schwartz, S. Jr, Shiekhatar, R., Esteller, M. (2009). A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet*, 41(3), 365-370.
- Mertens-Talcott, S. U., Chintharlapalli, S., Li, X., & Safe, S. (2007). The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res*, 67(22), 11001-11011.
- Meza-Sosa, K. F., Perez-Garcia, E. I., Camacho-Concha, N., Lopez-Gutierrez, O., Pedraza-Alva, G., & Perez-Martinez, L. (2014). MiR-7 promotes epithelial cell transformation by targeting the tumor suppressor KLF4. *PLoS One*, 9(9), e103987.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266(5182), 66-71.
- Millikan, R. C., Newman, B., Tse, C. K., Moorman, P. G., Conway, K., Dressler, L. G., Smith, L.V., Lobbok, M.H., Geradts, J., Bensen, J.T., Jackson, S., Nyante, S., Livasy, C., Carey, L., Earp, H.S., Perou, C.M. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 109(1), 123-139.
- Modi, S., Jacot, W., Yamashita, T., Sohn, J., Vidal, M., Tokunaga, E., Tsurutani, J., Ueno, N.T., Prat, A., Chae, Y.S., Lee, K.S., Niikura, N., Park, Y.H., Xu, B., Wang, X., Gil-Gil, M., Li, W., Pierga, J.Y., Im, S.A., Moore, H.C.F, Rugo, H.S., Yerushalmi, R., Zagouri, F., Gombos, A., Kim, S.B., Liu, Q., Luo, T., Saura, C., Schmid, P., Sun, T., Gambhire, D., Yung, L., Wang, Y., Singh, J., Vitazka, P., Meinhardt, G., Harbeck, N., Cameron, D.A. (2022). Trastuzumab Deruxtecan in Previously Treated HER2-Low Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*, 387(1), 9-20.
- Nazarali SA, Narod SA (2014). Tamoxifen for women at high risk of breast cancer. *Breast Cancer* (Dove Med Press). Feb 17;6:29-36.

- Neuhouser ML, Aragaki AK, Prentice RL, Manson JE, Chlebowski R, Carty CL, Ochs-Balcom HM, Thomson CA, Caan BJ, Tinker LF, Urrutia RP, Knudtson J, Anderson GL (2015). Overweight, Obesity, and Postmenopausal Invasive Breast Cancer Risk: A Secondary Analysis of the Women's Health Initiative Randomized Clinical Trials. *JAMA Oncol.* Aug;1(5):611-21.
- O'Day, E., & Lal, A. (2010). MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 12(2), 201-201.
- O'Grady, P., Lijnen, H. R., & Duffy, M. J. (1985). Multiple Forms of Plasminogen Activator in Human Breast Tumors. *Cancer Research*, 45(12 Part 1), 6216-6218.
- Olayioye, M. A. (2001). Update on HER-2 as a target for cancer therapy: Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Research*, 3(6), 385-389.
- Ovcaricek, T., Frkovic, S. G., Matos, E., Mozina, B., & Borstnar, S. (2011). Triple negative breast cancer - prognostic factors and survival. *Radiol Oncol*, 45(1), 46-52.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74-108.
- Petrelli, F., Coinu, A., Borgonovo, K., Cabiddu, M., Ghilardi, M., Lonati, V., Barni, S. (2014). The value of platinum agents as neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*, 144(2), 223-232.
- Pichler, M., & Calin, G. A. (2015). MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. *Br J Cancer*, 113(4), 569-573.
- Pizot C, Boniol M, Mullie P, Koechlin A, Boniol M, Boyle P, Autier P (2016). Physical activity, hormone replacement therapy and breast cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*. 2016 Jan;52:138-54.
- Plotnikova O, Baranova A, Skoblov M (2019). Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome. *Front Genet*. Oct 8;10:933. doi: 10.3389/fgene.2019.00933. PMID: 31649721; PMCID: PMC6792129.
- Prakash O, Hossain F, Danos D, Lassak A, Scribner R, Miele L (2020). Racial Disparities in Triple Negative Breast Cancer: A Review of the Role of Biologic and Non-biologic Factors. *Front Public Health*. Dec 22;8:576964. doi: 10.3389/fpubh.2020.576964. PMID: 33415093; PMCID: PMC7783321.
- Qiao D, Xing J, Duan Y, Wang S, Yao G, Zhang S, Jin J, Lin Z, Chen L, Piao Y (2022). The molecular mechanism of baicalein repressing progression of gastric cancer mediating miR-7/FAK/AKT signaling pathway. *Phytomedicine*.
- Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., & Chernoff, J. (2014). PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer*, 14(1), 13-25.
- Rakha, E. A., Elsheikh, S. E., Aleskandarany, M. A., Habashi, H. O., Green, A. R., Powe, D. G., El-Sayed, M.E., Benhasouna, A., Brunet, J.S., Akslen, L.A., Evans, A.J., Blamey, R., Reis-Filho, J.S., Foulkes, W.D., Ellis, I.O. (2009). Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*, 15(7), 2302-2310.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. In S. Meuer, C. Wittwer, K.-I. Nakagawara (Eds.), *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications* (pp. 21-34). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Recouvreux, S., Sampayo, R., Bessone, M. I. D., & Simian, M. (2015). Microenvironment and endocrine resistance in breast cancer: Friend or foe? *World Journal of Clinical Oncology*, 6(6), 207-211.
- Reddy, S. D., Ohshiro, K., Rayala, S. K., & Kumar, R. (2008). MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res*, 68(20), 8195-8200.
- Ren, Y. Q., Fu, F., & Han, J. (2015). MiR-27a modulates radiosensitivity of triple-negative breast cancer (TNBC) cells by targeting CDC27. *Med Sci Monit*, 21, 1297-1303.
- Reuning, U., Magdolen, V., Hapke, S., & Schmitt, M. (2003). Molecular and functional interdependence of the urokinase-type plasminogen activator system with integrins. *Biol Chem*, 384(8), 1119-1131.
- Ritte R, Lukanova A, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Mesrine S, Fagherazzi G, Dossus L, Teucher B, Steindorf K, Boeing H, Aleksandrova K, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Palli D, Grioni S, Mattiello A, Tumino R, Sacerdote C, Quirós JR, Buckland G, Molina-Montes E, Chirlaque MD, Ardanaz E, Amiano P, Bueno-de-Mesquita B, van Duijnhoven F, van Gils CH, Peeters PH, Wareham N, Khaw KT, Key TJ, Travis RC, Krum-Hansen S, Gram IT, Lund E, Sund M, Andersson A, Romieu I, Rinaldi S, McCormack V, Riboli E, Kaaks R (2013). Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and -negative breast cancer: a cohort study. *Int J Cancer*. Jun 1;132(11):2619-29. doi: 10.1002/ijc.27913. Epub 2012 Nov 14. PMID: 23090881.
- Roche, H., Fumoleau, P., Spielmann, M., Canon, J. L., Delozier, T., Serin, D., Symann, M., Kerbrat, P., Soulié, P., Eichler, F., Viens, P., Monnier, A., Vindevoghel, A., Campone, M., Goudier, M.J., Bonnetterre, J., Ferrero, J.M., Martin, A.L., Genève, J., Asselain, B. (2006). Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J Clin Oncol*, 24(36), 5664-5671.
- Rosenberg, S. (2001). New developments in the urokinase-type plasminogen activator system. *Expert Opin Ther Targets*, 5(6), 711-722.
- Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A., Lebanony, D., Goren, Y., Silberschein, E., Targan, N., Ben-Ari, A., Gilad, S., Sion-Vardy, N., Tobar, A., Feinmesser, M., Kharenko, O., Nativ, O., Nass, D., Perelman, M., Yosepovich, A., Shalmon, B., Polak-Charcon, S., Fridman, E., Avniel, A., Bentwich, I., Bentwich, Z., Cohen, D., Chajut, A., Barshack, I. (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*, 26(4), 462-469.
- Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J.S., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 11(16), 5678-5685.
- Saha, B., Bruneau, J. C., Kodys, K., & Szabo, G. (2015). Alcohol-induced miR-27a regulates differentiation and M2 macrophage polarization of normal human monocytes. *J Immunol*, 194(7), 3079-3087.
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, 68(18), 3033-3046.
- Schmid, P., Rugo, H. S., Adams, S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S.Y., Maiya, V., Husain, A., Winer, E.P., Loi, S., Emens, L.A. (2020).

- Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 21(1), 44-59.
- Schmitt, M., Mengele, K., Napieralski, R., Magdolen, V., Reuning, U., Gkazepis, A., Sweep, F., Brünner, N., Foekens, J., Harbeck, N. (2010). Clinical utility of level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert Rev Mol Diagn*, 10(8), 1051-1067.
- Schmitt, M., Sturmheit, A. S., Welk, A., Schnelldorfer, C., & Harbeck, N. (2006). Procedures for the quantitative protein determination of urokinase and its inhibitor, PAI-1, in human breast cancer tissue extracts by ELISA. *Methods Mol Med*, 120, 245-265.
- Schneider, B. P., Winer, E. P., Foulkes, W. D., Garber, J., Perou, C. M., Richardson, A., et al. (2008). Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res*, 14(24), 8010-8018.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182(3), 311-322.
- Scott LC, Mobley LR, Kuo TM, Il'yasova D (2019). Update on triple-negative breast cancer disparities for the United States: A population-based study from the United States Cancer Statistics database, 2010 through 2014. *Cancer*. Oct 1;125(19):3412-3417.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A (2021). Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. Jan;71(1):7-33.
- Singer CF, Filipits M, Jahn SW, Abete L, Jakesz R, Greil R, Bauernhofer T, Kwasny W, Seifert M, Fitzal F, Kastner M, Schmitt M, Moinfar F, Gnant M (2019). Stromal coexpression of uPA/PAI-1 protein predicts poor disease outcome in endocrine-treated postmenopausal patients with receptor-positive early breast cancer. *Breast*. Aug;46:101-107.
- Siziopikou, K. P., & Cobleigh, M. (2007). The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies. *Breast*, 16(1), 104-107.
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244(4905), 707-712.
- Smolarz B, Durczyński A, Romanowicz H, Szyłto K, Hogendorf P (2022). miRNAs in Cancer (Review of Literature). *Int J Mol Sci*. Mar 3;23(5):2805.
- Song X, Liu Z, Yu Z (2020). EGFR Promotes the Development of Triple Negative Breast Cancer Through JAK/STAT3 Signaling. *Cancer Manag Res*. Jan 30;12:703-717.
- Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10869-10874.
- Sperl, S., Mueller, M. M., Wilhelm, O. G., Schmitt, M., Magdolen, V., & Moroder, L. (2001). The uPA/uPA receptor system as a target for tumor therapy. *Drug News Perspect*, 14(7), 401-411.
- Stauber, M. W., Thomas. *Gynäkologie und Geburtshilfe* (Vol. 3): Georg Thieme Verlag KG. (2007)

- Stover, D. G., & Winer, E. P. (2015). Tailoring adjuvant chemotherapy regimens for patients with triple negative breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 24 Suppl 2, S132.
- Sugita, B., Gill, M., Mahajan, A., Duttargi, A., Kirolikar, S., Almeida, R., Regis, K., Oluwasanmi, O.L., Marchi, F., Marian, C., Makambi, K., Kallakury, B., Sheahan, L., Cavalli, I.J., Ribeiro, E.M., Madhavan, S., Boca, S., Gusev, Y., Cavalli, L.R. (2016). Differentially expressed miRNAs in triple negative breast cancer between African-American and non-Hispanic white women. *Oncotarget*, 7(48), 79274-79291.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. May;71(3):209-249.
- Sun J, Tan J, Zheng H, Jiang J, Zou T, Li H, Ren G, Yang D (2022). Clinicopathological Features of Breast Cancer in Relation to Exposure of Cycling Reproductive Hormones: A Multicenter Retrospective Study of 14,731 Patients Diagnosed with Invasive Breast Cancer. *Med Sci Monit*. Nov 30;28:e938619.
- Takahashi, R.-u., Miyazaki, H., & Ochiya, T. (2015). The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers*, 7(2), 598-616.
- Tang W, Zhu J, Su S, Wu W, Liu Q, Su F, Yu F (2012). MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *PLoS One*. 7(12):e51702.
- Tao, L., Gomez, S. L., Keegan, T. H., Kurian, A. W., & Clarke, C. A. (2015). Breast Cancer Mortality in African-American and Non-Hispanic White Women by Molecular Subtype and Stage at Diagnosis: A Population-Based Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 24(7), 1039-1045.
- Teoh, L. S., & Das, S. (2017). The Role of MicroRNAs in Diagnosis, Prognosis, Metastasis and Resistant Cases in Breast Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 23(12), 1845-1859.
- The Cancer Genome Atlas Program, from <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>
- The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61–70 (2012).
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence. *Lancet*. 2019 Aug 29
- Tjwa, M., Moura, R., Moons, L., Plaisance, S., De Mol, M., Jansen, S., Dewerchin, M., Verfaillie, C., Carmeliet, P. (2009). Fibrinolysis-independent role of plasmin and its activators in the haematopoietic recovery after myeloablation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(11-12), 4587-4595.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65(2), 87-108.
- Turner, N., Tutt, A., & Ashworth, A. (2004). Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*, 4(10), 814-819.
- Untch, M., Jackisch, C., Schneeweiss, A., Conrad, B., Aktas, B., Denkert, C., Eidtmann, H., Wiebringhaus, H., Kümmel, S., Hilfrich, J., Warm, M., Paepke, S., Just, M., Hanusch, C., Hackmann, J., Blohmer, J.U., Clemens, M., Darb-Esfahani, S., Schmitt, W.D., Dan Costa, S., Gerber, B., Engels, K., Nekljudova, V., Loibl, S., von Minckwitz, G. (2016). Nab-

- paclitaxel versus solvent-based paclitaxel in neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer (GeparSepto-GBG 69): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 17(3), 345-356.
- Vachon CM, Sellers TA, Carlson EE, Cunningham JM, Hilker CA, Smalley RL, Schaid DJ, Kelemen LE, Couch FJ, Pankratz VS (2007). Strong evidence of a genetic determinant for mammographic density, a major risk factor for breast cancer. *Cancer Res*. Sep 1;67(17):8412-8.
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernardis, R., Friend, S.H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-536.
- Van Duyn, M. A., & Pivonka, E. (2000). Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc*, 100(12), 1511-1521.
- Velie, E., Kulldorff, M., Schairer, C., Block, G., Albanes, D., & Schatzkin, A. (2000). Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer in postmenopausal women: a prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst*, 92(10), 833-839.
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D.Y., Diéras, V., Guardino, E., Fang, L., Lu, M.W., Olsen, S., Blackwell, K. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*, 367(19), 1783-1791.
- Visvanathan, K., Chlebowski, R. T., Hurley, P., Col, N. F., Ropka, M., Collyar, D., Morrow, M., Runowicz, C., Pritchard, K.I., Hagerty, K., Arun, B., Garber, J., Vogel, V.G., Wade, J.L., Brown, P., Cuzick, J., Kramer, B.S., Lippman, S.M. (2009). American society of clinical oncology clinical practice guideline update on the use of pharmacologic interventions including tamoxifen, raloxifene, and aromatase inhibition for breast cancer risk reduction. *J Clin Oncol*, 27(19), 3235-3258.
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C. G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C., Croce, C.M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7), 2257-2261.
- von Minckwitz, G., Schneeweiss, A., Loibl, S., Salat, C., Denkert, C., Rezai, M., Blohmer, J.U., Jackisch, C., Paepke, S., Gerber, B., Zahm, D.M., Kümmel, S., Eidtmann, H., Klare, P., Huober, J., Costa, S., Tesch, H., Hanusch, C., Hilfrich, J., Khandan, F., Fasching, P.A., Sinn, B.V., Engels, K., Mehta, K., Nekljudova, V., Untch, M. (2014). Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 15(7), 747-756.
- Voogd, A. C., Nielsen, M., Peterse, J. L., Blichert-Toft, M., Bartelink, H., Overgaard, M., van Tienhoven, G., Andersen, K.W., Sylvester, R.J., van Dongen, J.A. (2001). Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin Oncol*, 19(6), 1688-1697.
- Voorhoeve, P. M. (2010). MicroRNAs: Oncogenes, tumor suppressors or master regulators of cancer heterogeneity? *Biochim Biophys Acta*, 1805(1), 72-86.

- Wang, F., Fu, X. D., Zhou, Y., & Zhang, Y. (2009). Down-regulation of the cyclin E1 oncogene expression by microRNA-16-1 induces cell cycle arrest in human cancer cells. *BMB Rep*, 42.
- Wang, H. R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. A., Alexandrova, E., Thomsen, G. H., Wrana, J.L. (2003). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science*, 302(5651), 1775-1779.
- Webster, R. J., Giles, K. M., Price, K. J., Zhang, P. M., Mattick, J. S., & Leedman, P. J. (2009). Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7. *J Biol Chem*, 284(9), 5731-5741.
- Weinberg, R. A. (2014). The biology of cancer. 25-26.
- Winter, J., & Diederichs, S. (2011). MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol*, 676, 3-22.
- Wong CS, Lim GH, Gao F, Jakes RW, Offman J, Chia KS, Duffy SW (2011). Mammographic density and its interaction with other breast cancer risk factors in an Asian population. *Br J Cancer*. Mar 1;104(5):871-4.
- Woolston, C. (2015). Breast cancer. *Nature*, 527(7578), S101-S101.
- Wu, J., Sun, Z., Sun, H., & Li, Y. (2018). MicroRNA27a promotes tumorigenesis via targeting AKT in triple negative breast cancer. *Mol Med Rep*, 17(1), 562-570.
- Wu Q, Siddharth S, Sharma D (2021). Triple Negative Breast Cancer: A Mountain Yet to Be Scaled Despite the Triumphs. *Cancers (Basel)*. Jul 23;13(15):3697.
- Xu, J., Zhang, W., Tang, L., Chen, W., & Guan, X. (2018). Epithelial-mesenchymal transition induced PAI-1 is associated with prognosis of triple-negative breast cancer patients. *Gene*, 670, 7-14.
- Xue, J., Niu, J., Wu, J., & Wu, Z. H. (2014). MicroRNAs in cancer therapeutic response: Friend and foe. *World J Clin Oncol*, 5(4), 730-743.
- Yan, B., Wang, Z. H., Zhu, C. D., Guo, J. T., Zhao, J. L. (2014). MicroRNA repertoire for functional genome research in tilapia identified by deep sequencing. *Mol Biol Rep*, 41(8), 4953-4963.
- Ying, S. Y., Chang, D. C., & Lin, S. L. (2008). The microRNA (miRNA): overview of the RNA genes that modulate gene function. *Mol Biotechnol*, 38(3), 257-268.
- Yu, N., Huangyang, P., Yang, X., Han, X., Yan, R., Jia, H., Shang, Y., Sun, L. (2013). microRNA-7 Suppresses the Invasive Potential of Breast Cancer Cells and Sensitizes Cells to DNA Damages by Targeting Histone Methyltransferase SET8. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(27), 19633-19642.
- Yue, W., Santen, R. J., Wang, J. P., Li, Y., Verderame, M. F., Bocchinfuso, W. P., Korach, K.S., Devanesan, P., Todorovic, R., Rogan, E.G., Cavalieri, E.L. (2003). Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86(3-5), 477-486.
- Yue, W., Wang, J. P., Li, Y., Fan, P., Liu, G., Zhang, N., Conaway, M., Wang, H., Korach, K.S., Bocchinfuso, W., Santen, R. (2010). Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer*, 127(8), 1748-1757.
- Zavadil, J., Narasimhan, M., Blumenberg, M., Schneider, R. J. (2007). Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells Tissues Organs*, 185(1-3), 157-161.

- Zheng, W., Gustafson, D. R., Sinha, R., Cerhan, J. R., Moore, D., Hong, C. P., Anderson, K.E., Kushi, L.H., Sellers, T.A., Folsom, A.R. (1998). Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 90(22), 1724-1729.
- Zhou, L., Liang, X., Zhang, L., Yang, L., Nagao, N., Wu, H., Liu, C., Lin, S., Cai, G., Liu, J. (2016). MiR-27a-3p functions as an oncogene in gastric cancer by targeting BTG2. *Oncotarget*, 7(32), 51943-51954.

9. Danksagung

An diesem Werk waren viele Menschen involviert, ohne deren Hilfe diese Dissertation niemals zustande gekommen wäre. Der Weg bis zur Fertigstellung meiner Arbeit war steinig, sodass ich all diesen Menschen zu ewigem Dank verpflichtet bin. Zunächst möchte ich meinem ersten Doktorvater, Prof. Schmitt, danken, welcher mir dieses Projekt näherbrachte und mich damit in die Welt der Forschung einführte. Besonderen Dank geht an Rudolf Napieralski, mein Betreuer und Mentor, welcher mich auch in stürmischen Zeiten nicht nur professionell, sondern auch persönlich sehr unterstützte. Während dieser Zeit stets an meiner Seite waren meine Kolleginnen Nancy und Shuo, die die Stunden im Labor im Flug verstreichen ließen und immer für den ein oder anderen Spaß zu haben waren. Nicht zuletzt herzlichsten Dank auch an Prof. Magdolen, welcher sich meiner, als mein zweiter Doktorvater, ohne jeglichen Zweifel annahm und mir schließlich die Vollendung dieser Dissertation möglich machte.

Natürlich danke ich meinen Eltern, ohne die ich niemals der Mensch geworden wäre, der ich heute bin und meinen Schwestern, die ich keine Sekunde missen möchte. Meiner Mutter habe ich die Vollendung dieser Arbeit versprochen. In Gedenken widme ich ihr diese Dissertation.