

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit der  
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# Die Bedeutung der miRNA-Expression für die Progression des Mamma-Karzinoms

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Inken Eggers  
aus Bremerhaven

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachterin:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Literaturdiskussion .....	3
2.1	Das Mammakarzinom .....	3
2.1.1	Epidemiologie .....	3
2.1.2	Risikofaktoren .....	4
2.1.3	Klinische und histopathologische Klassifikation .....	4
2.1.4	Symptomatik .....	6
2.1.5	Diagnosestellung .....	6
2.1.6	Therapie .....	8
2.1.7	Prognose .....	11
2.1.8	Lokalrezidiv .....	13
2.1.9	Tumormarker .....	14
2.2	MicroRNA (miRNA) .....	16
2.2.1	Biogenese .....	16
2.2.2	Funktion .....	18
2.2.3	Dysregulation in Krankheiten .....	18
2.2.4	miRNA-9 .....	20
2.2.5	miRNA-10b .....	20
2.2.6	miRNA-21 .....	21
2.2.7	miRNA-181a .....	21
2.2.8	miRNA-210 .....	22
2.2.9	miRNA-375 .....	22
3	Material und Methoden .....	24
3.1	Materialien .....	24
3.1.1	Geräte .....	24
3.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	24
3.1.3	Gebrauchsmaterialien .....	24
3.1.4	Chemikalien .....	25
3.1.5	Puffer .....	25
3.1.6	Kit-Systeme .....	25
3.1.7	Oligonukleotide .....	25
3.1.8	Gewebeproben .....	26

3.2	Methoden .....	26
3.2.1	Steriles Arbeiten .....	26
3.2.2	Extraktion der Gesamt-RNA einschließlich der miRNA .....	27
3.2.3	Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der RNA.....	28
3.2.4	cDNA-Synthese .....	29
3.2.5	qRT-PCR .....	30
3.2.6	Follow Up.....	33
3.2.7	Statistische Auswertung .....	33
4	Ergebnisse .....	34
4.1	Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs.....	34
4.2	Einfluss der miRNA-Expression auf das Überleben .....	41
4.2.1	Einfluss der miRNA-Expression auf das Gesamtüberleben.....	41
4.2.2	Einfluss der miRNA-Expression auf das Lokalrezidiv-freie Überleben... 48	
4.3	Korrelation der miRNA-Expressionslevel .....	49
4.3.1	Gewebe-gebundene Korrelation der miRNA-Expressionslevel .....	49
4.3.2	Gewebe-übergreifende Korrelation der miRNA-Expressionslevel .....	52
4.4	Korrelation der miRNA-Expression mit Tumormerkmalen.....	56
4.4.1	Korrelation der miRNA-Expression des Primarius mit Merkmalen des Primarius .....	56
4.4.2	Korrelation der miRNA-Expression des Primarius mit Merkmalen des Lokalrezidivs .....	62
4.4.3	Korrelation der miRNA-Expression des Lokalrezidivs mit Merkmalen des Lokalrezidivs .....	65
4.4.4	Korrelation der miRNA-Expression des Lymphknotens mit Merkmalen des Primarius .....	66
4.5	Einfluss der Systemtherapie des Primarius auf die miRNA-Expression im Lokalrezidiv.....	71
5	Diskussion.....	73
5.1	miRNA-9.....	74
5.2	miRNA-10b.....	75
5.3	miRNA-21.....	76
5.4	miRNA-181a.....	77
5.5	miRNA-210.....	78

5.5.1	Einfluss von Chemotherapie auf die miRNA-210-Expression im Lokalrezidiv .....	79
5.5.2	Einfluss von miRNA-210 auf das Lokalrezidiv-freie Überleben.....	80
5.6	miRNA-375.....	81
5.7	miRNAs als Biomarker .....	83
5.8	miRNAs als Therapeutikum.....	84
5.9	Methodenkritik.....	86
5.10	Ausblick.....	87
6	Zusammenfassung.....	89
7	Literaturverzeichnis .....	91
8	Anhang.....	114
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	114
8.2	Abbildungsverzeichnis.....	118
8.3	Tabellenverzeichnis.....	120
8.4	Follow Up-Datenerhebung .....	121
8.5	Werte zu den Abbildungen .....	124
8.6	Danksagung .....	136
8.7	Lebenslauf.....	137

# 1 Einleitung

Das Mamma-Karzinom ist sowohl in Deutschland als auch weltweit führend bei der Zahl der Krebserkrankungen bei Frauen. Im Vergleich zu anderen Tumorentitäten hat das Mamma-Karzinom eine gute Prognose mit einem relativen 5-Jahres-Überleben von 88% bei Frauen und 77% bei Männern bzw. einem relativen 10-Jahres-Überleben von 82% bei Frauen und 65% bei Männern [1]. Trotzdem treten – je nach Tumoreigenschaften und Therapieform – in etwa 4-40% der Fälle Lokalrezidive auf [3]. Zusätzlich zur emotionalen und psychosozialen Belastung der Patientin bzw. des Patienten infolge der erneuten Krebsdiagnose verringert sich dann auch das relative 5-Jahres-Überleben auf 50-65% [4]. Es sind Risikofaktoren bekannt, die die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Lokalrezidivs erhöhen. Hierzu zählen beispielsweise ein junges Alter bei Erstdiagnose, ein hohes Tumor-Grading oder ein negativer Hormonrezeptor-Status [5, 6]. Üblicherweise erfolgt die Entdeckung eines Lokalrezidivs im Rahmen der Tumornachsorge bzw. durch die Patientin oder den Patienten selbst bei der Tastuntersuchung der Brust [7].

Es ist von essentieller Bedeutung, Einflussfaktoren zu kennen, die die Progression von Mamma-Karzinomen fördern, um so Patientinnen und Patienten mit einem hohen Risiko, ein Lokalrezidiv zu erleiden, von denen mit einem niedrigen Risiko separieren zu können. Idealerweise sollten anhand dieser Einflussfaktoren Screening-Instrumente abgeleitet werden, die in der Lage sind, Lokalrezidive noch vor der Entdeckung in der Tumornachsorge zu erfassen oder das Auftreten von Lokalrezidiven sogar vorhersagen zu können.

Einen vielversprechenden Ansatz im Rahmen dieser Problemstellung bieten microRNAs (miRNAs). MiRNAs wurden erstmals 1993 von der Arbeitsgruppe um Rosalind Lee beschrieben [8]. Sie sind kurze, etwa 20-24 Nukleotide lange, einzelsträngige, nicht-codierende RNA-Moleküle [9]. Nach der Erstentdeckung im Nematoden *C. elegans* wurden auch in humanen Geweben aktuell über 1900 miRNAs identifiziert [10]. Sie sind über eine Translationshemmung von *messenger RNA* entscheidend an der Entwicklung und Differenzierung embryonaler Gewebe beteiligt [8]. Schnell lag der Forschungsschwerpunkt bei miRNAs nicht mehr ausschließlich auf

der Untersuchung physiologischer Entwicklungsvorgänge, sondern auch in der Analyse der Rolle von miRNAs in der Entstehung von Tumorerkrankungen und anderen Krankheiten. Hier konnte bei verschiedenen Tumorentitäten ein dysreguliertes Expressionsverhalten beobachtet werden, wodurch miRNAs immer mehr in den Fokus der Untersuchungen rückten [11]. Die Erkenntnis, dass miRNAs physiologische Prozesse wie Zellteilung und Apoptose beeinflussen, machte eine Beteiligung in der Entstehung von Krebserkrankungen wahrscheinlich [12]. Eine dysregulierte Expression verschiedener miRNAs wurde auch im Mamma-Karzinom beobachtet [13-15].

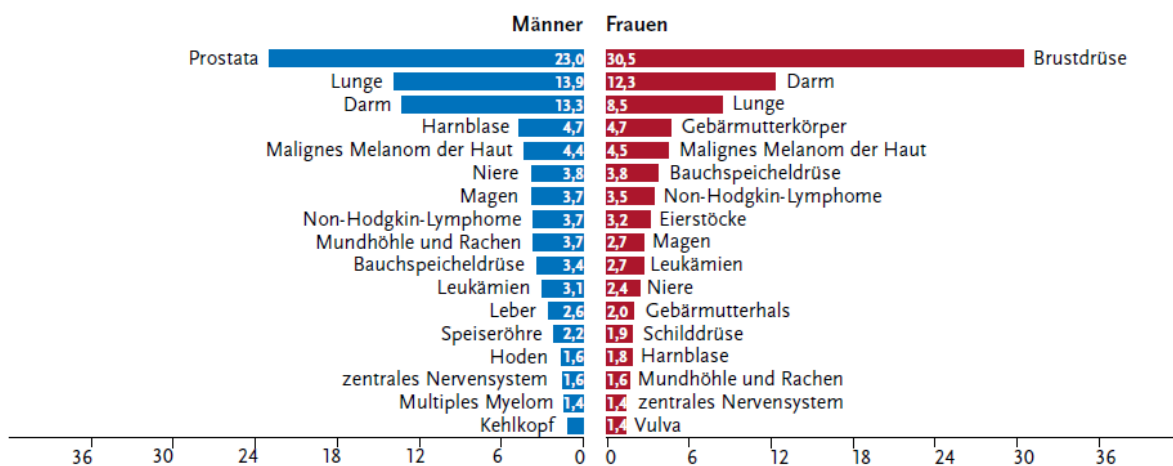
Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde als Zielsetzung der vorliegenden Arbeit definiert, die miRNA-Expression in Brustkrebsgewebe von Primärtumoren und Lokalrezidiven zu untersuchen und mit prognostischen Merkmalen des Tumors in Korrelation zu setzen. Es sollte untersucht werden, ob mithilfe der Expressionsanalyse spezifischer miRNAs Aussagen über die Progression der Krebserkrankung getroffen werden können. Hierzu kann zukünftig ebenfalls evaluiert werden, ob die untersuchten miRNAs zur Verwendung als *Screening*-Biomarker geeignet sind oder ob diese miRNAs in einem therapeutischen Konzept eine Rolle spielen könnten.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Das Mammakarzinom

#### 2.1.1 Epidemiologie

Die häufigste Krebserkrankung bei Frauen stellt sowohl weltweit als auch in Deutschland das Mamma-Karzinom dar. Der Anteil von Mamma-Karzinomen an allen Tumorentitäten betrug 2014 in Deutschland 30,5% (Abbildung 1) [1, 16]. Das Robert-Koch-Institut verzeichnete 2014 69.220 Neuerkrankungen bei Frauen und 650 Neuerkrankungen bei Männern. Der Anteil an neuerkrankten Männern liegt somit bei 1% der Gesamt-Inzidenz. Zusätzlich zu den manifesten Mamma-Karzinomen liegt die jährliche Inzidenz von Präkanzerosen bei ca. 6.000. Etwa jede 8. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an einem Mamma-Karzinom [1].



**Abbildung 1: Prozentualer Anteil des Mamma-Karzinoms an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014, entnommen aus [1]**

Das durchschnittliche Alter bei Erstdiagnose lag im Jahr 2013 bei Frauen bei 64,3 Jahren und bei Männern bei 69,9 Jahren. Im Jahr 2014 sind 17.670 Frauen und 43 Männer infolge einer Brustkrebserkrankung in Deutschland verstorben. Seit Mitte der 1990er-Jahre wird insbesondere bei den Frauen unter 70 Jahren eine leichte Verringerung der Mortalitätsraten beobachtet [17]. Das relative 5-Jahres-Überleben beträgt bei Frauen 88% und bei Männern 77%. Das relative 10-Jahres-Überleben beträgt bei Frauen 82%, bei Männern 65%. Innerhalb Deutschlands sind sowohl Inzidenz als auch Mortalität in den neuen Bundesländern im Vergleich zu den alten



Bundesländern geringer [1]. Weltweit gesehen besteht ein West-Ost-Gefälle: So findet sich die höchste Prävalenz in Nordamerika, die geringste in Asien [17]. Lokalrezidive treten nach erfolgter Brust-erhaltender Therapie (BET) in Kombination mit einer Strahlentherapie in 14,3% der Mamma-Karzinome auf. Nach einer BET ohne nachfolgende Strahlentherapie treten in 39,2% der Fälle Lokalrezidive auf [3].

### **2.1.2 Risikofaktoren**

In der Ätiologie des Mamma-Karzinoms spielen vor allem hormonelle und hereditäre Risikofaktoren eine Rolle. Zu den hormonellen Einflussgrößen zählt eine frühe Menarche und späte Menopause, Nulliparität und ein höheres Alter bei der Geburt des ersten Kindes [1]. Eine Hormonersatztherapie in der Postmenopause [18] und die Einnahme oraler Kontrazeptiva erhöhen ebenfalls das Risiko, an einem Mamma-Karzinom zu erkranken. Insgesamt geht ein erhöhter Östrogenspiegel bei prämenopausalen Frauen mit dem erhöhten Risiko einher, ein Mamma-Karzinom zu entwickeln [19]. Außerdem gelten Übergewicht und Adipositas, Bewegungsmangel und Alkohol als Risikofaktoren. Der Einfluss von Nikotin wird kontrovers diskutiert [20, 21].

Zu den hereditären Risikofaktoren werden Mutationen in den Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* gezählt. Diese Genmutationen bedingen ebenfalls ein erhöhtes Risiko, u.a. an einem Ovarialkarzinom zu erkranken [22]. Darüber hinaus zählen ein sehr dichtes Brustdrüsengewebe [23], bestimmte gutartige Brustgewebsveränderungen, wie z.B. die atypische duktale Hyperplasie [24], und eine Strahlentherapie im Bereich des Thorax zu den Risikofaktoren einer Brustkrebsentwicklung [1]. Das Brustkrebsrisiko erhöht sich mit steigendem Lebensalter [25].

### **2.1.3 Klinische und histopathologische Klassifikation**

Die klinische Einteilung der Mamma-Karzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation, welche von P. Denoix entwickelt und seit 1950 von der UICC (*Union for International Cancer Control*) weitergeführt wurde. In diese Klassifikation gehen drei Aspekte ein: die Größe des Tumors (T), der Befall regionärer Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M) [26]. Die Hauptmetastasierungsorte des

Mamma-Karzinoms sind dabei Knochen, Lunge, Leber und ZNS [27]. Anhand der Einteilung in die TNM-Klassifikation wird eine Einteilung in die UICC-Stadien 0-IV vorgenommen, welche vor allem klinische Relevanz haben [26].

Die histopathologische Klassifikation der Mamma-Karzinome umfasst eine Einteilung in invasiv-lobuläre und invasiv-duktales Karzinome. Invasiv-lobuläre Karzinome machen etwa 10% aller Mamma-Karzinome aus und gehen vom Epithel der Drüsenläppchen aus. Häufig kommen sie bilateral und multizentrisch vor. Invasiv-duktales Karzinome haben ihren Ursprung im Epithel des Milchgangsystems. Die invasiv-duktales Karzinome vom „*no specific type*“ (NST) machen etwa 80 % aller Mamma-Karzinome aus. Zusätzlich gibt es noch duktales Sonderformen, wie medulläre, muzinöse, papilläre, tubuläre und inflammatorische Karzinome [28, 29].

Im Zuge der histopathologischen Charakterisierung des Tumorpräparates erfolgt das *Grading* nach *Elston & Ellis* [26]. Hierbei werden die Tumorzellen hinsichtlich Mitoserate, Tubulusbildung und Zellkernatypien beurteilt und in die Grade G1-G3 eingeteilt. Je höher G dabei ist, desto weniger differenziert und desto maligner sind die begutachteten Tumorzellen [28, 29]. Außerdem wird eine immunhistochemische Bestimmung des Rezeptorstatus von HER2, Östrogen- und Progesteronrezeptoren vorgenommen. Der Rezeptorstatus ist vor allem in der Planung der Therapie [4] und bei der Prognosebestimmung wichtig [29].

Die Risikoläsionen des Mamma-Karzinoms werden in duktales intraepitheliale Neoplasien und in lobuläre intraepitheliale Neoplasien (LIN) unterteilt. Zu den duktales intraepithelialen Neoplasie gehört die atypische duktales Hyperplasie (ADH) und das duktales *Carcinoma in situ* (DCIS). Eine Sonderform des DCIS ist der Morbus Paget. Hierbei ist das DCIS in der Epidermis der Mamille lokalisiert. Die Basalmembran des Epithels ist bei allen Risikoläsionen noch intakt [28, 29].

Klinisch wurden außerdem intrinsische Subtypen des Mamma-Karzinoms festgelegt. Diese Subtypen unterscheiden sich in ihrem klinischen Verlauf und dem Ansprechen auf die verfügbaren Therapeutika. Mithilfe einer immunhistochemischen Einteilung wird in 4 Subtypen unterschieden (Tabelle 1) [30].

**Tabelle 1: Intrinsische Subtypen des Mamma-Karzinoms [30]**

<b>Intrinsischer Subtyp</b>	<b>Immunhistochemische Charakterisierung</b>
Luminal A	ER/PR pos., HER2 neg. Ki-67 niedrig
Luminal B	- ER/PR pos., HER2 neg., Ki-67 hoch - ER/PR pos., HER2 pos., Ki-67 hoch oder niedrig
HER2-positiv	ER/PR neg., HER2 pos.
<i>triple-negativ</i> (auch „ <i>basal-like</i> “ genannt)	ER/PR neg., HER2 neg.

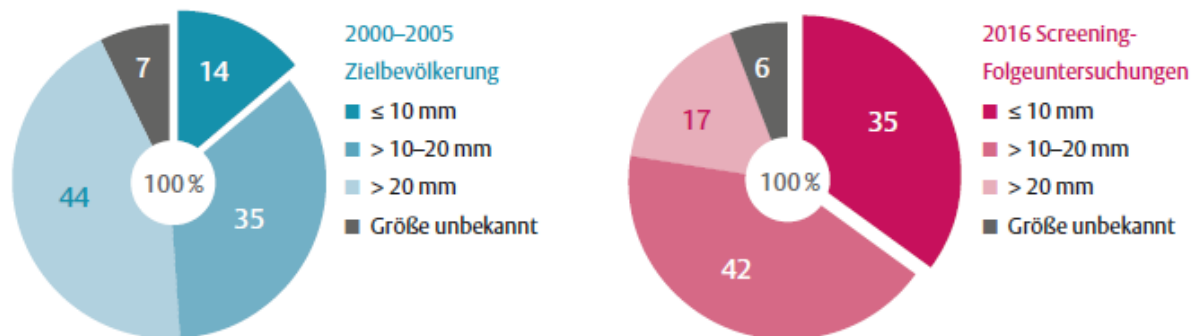
### 2.1.4 Symptomatik

Das Leitsymptom des Mamma-Karzinoms ist ein derber Knoten bei Palpation der Brust. Jeder palpable Knoten der Mamma ist malignomverdächtig und daher abklärungsbedürftig. Außerdem können Vorwölbungen oder Einziehungen der Haut auftreten, sowie eine sogenannte Orangenhaut, welche durch ein intradermales Lymphödem hervorgerufen wird. Weitere Symptome können Mamillenretraktion oder Mamillensekretion (meist einseitig und blutig-serös) sein. Beim Morbus Paget kommt es häufig zu einem Ekzem der Mamille [31]. Eine einseitige Rötung der Brust mit Überwärmung und Druckschmerzhaftigkeit kann auf ein inflammatorisches Mamma-Karzinom hindeuten. Vergrößerte, derbe, nicht-druckdolente Lymphknoten in der Axilla können ein Hinweis auf Lymphknoten-Metastasen eines Mamma-Karzinoms sein [32].

### 2.1.5 Diagnosestellung

Bei der Diagnosestellung von Mamma-Karzinomen haben insbesondere die Mammografie, die Sonografie und die Magnetresonanztomographie (MRT) einen hohen Stellenwert. Dabei hat die Mammografie vor allem bei Frauen in der Postmenopause bei weniger dichtem Brustdrüsengewebe und die Sonografie bei eher jungen Frauen mit sehr dichtem Drüsengewebe hohen diagnostischen Wert [33]. In Deutschland wurde das Mammografie-Screening zwischen den Jahren 2005 und 2009 eingeführt. Dabei werden alle in Deutschland wohnhaften Frauen zwischen 50 und 69 Jahren postalisch alle 2 Jahre zu einer Mammografie eingeladen. 2016 lag die Teilnehmerate bei 51%. Nach der flächendeckenden Einführung des Mammografie-

Programms konnte ein Anstieg der *In situ*-Karzinome an der Gesamtzahl der Karzinome festgestellt werden. 2000-2005 betrug der Anteil an *In situ*-Karzinomen etwa 7%, 2016 lag dieser Anteil bei 18%. Außerdem wurde eine Veränderung der Größenverteilung invasiver Karzinome beobachtet. So lag der Anteil an invasiven Karzinomen  $\geq 20$  mm 2000-2005 noch bei 44%, während 2016 der Anteil an invasiven Karzinomen  $\geq 20$  mm nur noch 17% betrug (Abbildung 2) [34].



**Abbildung 2: Größenverteilung invasiver Karzinome in der Zielbevölkerung vor und nach Einführung des Mammografie-Programms, entnommen aus [34]**

Zusätzlich zu Prävention im *Screening* kann die Mammografie auch zur Abklärung klinisch oder sonografisch auffälliger Befunde, im Rahmen des *Stagings* und in der Nachsorge zur Anwendung kommen. Die Befundung erfolgt nach dem BI-RADS (*Breast Imaging-Reporting And Data System*) des *American College of Radiology* (ACR).

Ergänzend zur Mammografie, bei dichtem Brustdrüsengewebe und zur Differentialdiagnose von zystischen und soliden Läsionen kann eine Sonografie der Brust erfolgen. Die Magnetresonanztomographie mit Kontrastmittelgabe kommt nur bei speziellen Indikationen zum Einsatz. Sie kann beispielsweise bei der Differenzierung von Narbengewebe zu Tumorgewebe in der Nachsorge oder bei Hochrisiko-Patientinnen mit *BRCA1*-Mutation durchgeführt werden. Eine Galaktografie wird bei pathologischer Mamillensekretion durchgeführt.

Die Diagnosesicherung muss obligat histologisch erfolgen. Hier kommen vor allem Ultraschall-gesteuerte oder Mammografie-gesteuerte Biopsien zum Einsatz. Eine

offene Biopsie ist bei ungünstiger Lage des tumorverdächtigen Areals (z.B. nahe der Thoraxwand) sinnvoll. Bei Mamillensekretion kann eine Sekretzytologie angestrebt werden [4, 27, 32].

Das präoperative *Staging* umfasst eine Mammografie der kontralateralen Brust sowie eine vollständige gynäkologische Untersuchung inklusive Sonografie. Eine weitere Ausbreitungsdiagnostik wird nur bei spezifischen Symptomen, die eine Metastasierung wahrscheinlich machen, und bei Patientinnen mit hohem Risiko für eine Fernmetastasierung (Alter <40 Jahre, N $\geq$ 1, T $\geq$ 3) durchgeführt. Dann kommen zusätzlich ein Röntgen-Thorax, eine Leber-Sonografie und eventuell eine CT von Thorax und Abdomen sowie eine Skelettszintigrafie zum Einsatz [32].

### 2.1.6 Therapie

Die Therapie des Mamma-Karzinoms erfolgt multimodal und angepasst an die histologischen und molekularpathologischen Eigenschaften der Tumorzellen. Grundsätzlich kommen die Operation des Tumors, eine Strahlentherapie und die Systemtherapie, in Form von Chemotherapie, *targeted therapy* oder endokriner Therapie, zum Einsatz [4].

Beim überwiegenden Teil der Mamma-Karzinome wird eine operative Behandlung angestrebt. Hier kommt in 60-70% der Fälle die Brust-erhaltende Therapie (BET) zur Anwendung. Dabei wird der Tumor unter Erhaltung des restlichen Brustdrüsengewebes mit einem Sicherheitsabstand aus der betroffenen Brust entfernt. Ist das Verhältnis von Tumor- zu Brustgröße ungünstig, so wird eine Mastektomie, die Entfernung der gesamten Brust, durchgeführt. Eine Mastektomie wird ebenfalls in Betracht gezogen, wenn beispielsweise eine postoperative Bestrahlung der Restbrust durch die Patientin oder den Patienten abgelehnt wird, ein großer Hautbefall vorliegt oder Tumormasse trotz Nachresektionen persistiert. Während der Tumoroperation wird eine Biopsie des *Sentinel*-Lymphknotens vorgenommen. Dieser - häufig auch „Wächter-Lymphknoten“ genannte - Lymphknoten ist der erste Lymphknoten im Abflussgebiet eines Mamma-Karzinoms. Mithilfe eines Farbstoffes oder Radionuklids wird der *Sentinel*-Lymphknoten markiert, reseziert und histologisch untersucht. Bei fehlendem Befall des Wächter-Lymphknotens wird kein weiterer Lymphknoten

entnommen. Hierdurch wird die mögliche Komplikation eines Lymphödems infolge einer axillären Lymphknoten-Dissektion bei trotzdem hoher Therapiesicherheit vermieden. Falls mehr als 3 axilläre Lymphknoten von Tumorzellen befallen sind, wird eine axilläre Lymphknoten-Dissektion vorgenommen, bei der mindestens 10 Lymphknoten entfernt und histologisch untersucht werden. Eine axilläre Dissektion erfolgt ebenso, wenn ein axillärer Lymphknotenbefall schon klinisch nachgewiesen wurde, eine *Sentinel*-Lymphknoten-Biopsie im Zuge der OP nicht möglich ist oder eine adjuvante Bestrahlung schon im Vorfeld der OP durch die Patientin abgelehnt wurde. Der Brustaufbau geschieht entweder gleichzeitig mit der Tumoroperation oder in einer zweiten OP mit autologem Gewebe (z.B. *M. latissimus dorsi*-Plastik) bzw. durch den Einsatz einer Prothese [4, 32].

Die Strahlentherapie der Restbrust ist obligater Bestandteil der Therapie nach erfolgter BET [4, 32]. Sie wird zur lokalen Kontrolle und zur Verringerung des Lokalrezidiv-Risikos sowie der Brustkrebs-spezifischen Mortalität eingesetzt [35]. Da sich etwa 70-80% der intramammären Rezidive im ehemaligen Tumorbett entwickeln, kommt bei einigen Patientinnen eine *Boost*-Bestrahlung des ehemaligen Tumorbetts zur Anwendung. Hierbei wird lokal im ehemaligen Tumorbett mit einer höheren Strahlendosis behandelt. Diese Therapieform kommt vor allem bei Patientinnen unter 60 Jahren zum Einsatz [36]. Nach einer Mastektomie wird nur bei spezifischen Indikationen, wie beispielsweise bei Vorliegen eines T3- oder T4-Tumors, >3 befallenen Lymphknoten, Nicht-Erreichen einer R0-Situation oder bei jungen Patientinnen mit hohem Rezidivrisiko eine Nachbestrahlung durchgeführt. Die lokoregionären Lymphabflussgebiete werden bei positivem *Sentinel*-Lymphknoten und fehlender Axilladissektion (durch Kontraindikationen oder Ablehnung dieser durch die Patientin) bestrahlt. Eine palliative Bestrahlung erfolgt vor allem bei Knochen- und Hirnmetastasen [4, 32].

Bei der neoadjuvanten (präoperativen) Systemtherapie unterscheidet man endokrine Therapie, *targeted therapy* und Chemotherapie. Eine neoadjuvante Chemotherapie sollte bei einem inflammatorischen oder primär inoperablem Mamma-Karzinom mit einer Anthrazyklin- und Taxan-haltigen Wirkstoffkombination durchgeführt werden. Eine endokrine neoadjuvante Therapie kann bei postmenopausalen Patientinnen mit

positivem Hormonrezeptorstatus in einer multimorbiden oder primär inoperablen Situation erwogen werden [30].

In der adjuvanten Situation soll die Chemotherapie bei *triple-negativen* Karzinomen, Luminal B-Tumoren mit hohem Rezidivrisiko und HER2-positiven Tumoren (ab T1b bzw. T1a, N0 wenn G3, hohes Ki-67 oder ER/PR neg. vorliegen) durchgeführt werden [30]. Eine Meta-Analyse der *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (EBCTCG) aus dem Jahr 2012 zeigte hier einen prognostischen Vorteil von Anthrazyklin- und Taxan-haltigen Chemotherapie-Konzepten gegenüber anderen Konzepten in Bezug auf rezidiv-freies und Gesamtüberleben [37]. Des Weiteren kommen auch platinhaltige Therapieschemata zur Anwendung [4].

Eine endokrine Therapie ist bei positivem Hormonrezeptorstatus generell indiziert, um die Brustkrebs-spezifische Mortalität zu senken [38]. Bei der endokrinen Therapie werden prämenopausal GnRH-Analoga (z.B. Leuprorelin) und selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (z.B. Tamoxifen) eingesetzt. Außerdem kann auch eine Ovariectomie durchgeführt werden. Postmenopausal kommen Aromatase-Hemmstoffe (z.B. Exemestan) und selektive Östrogen-Rezeptor-Modulatoren zum Einsatz [4]. Postmenopausale Patientinnen mit einem hohen Lokalrezidiv-Risiko sollten initial einen Aromatase-Inhibitor erhalten [39]. Im UICC-Stadium I sollte die endokrine Therapie für fünf Jahre durchgeführt werden, wohingegen in den UICC-Stadien II und III eine Therapiedauer von bis zu zehn Jahren angestrebt wird [40].

Die *targeted therapy* (zielgerichtete Therapie) kommt vor allem bei HER2-positiven Mamma-Karzinomen zur Anwendung. HER2-überexprimierende Mamma-Karzinome machen ca. 20% aller Fälle aus. Bei diesen Tumoren ist der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor HER2 durch eine Genamplifikation überexprimiert, was mit Tumorentstehung und einem aggressiveren Verlauf assoziiert ist. Mithilfe eines Antikörpers, der an die extrazelluläre Komponente des Rezeptors bindet, wird das Wachstum der Tumorzellen gehemmt. Zu dieser Substanzklasse gehören etwa Trastuzumab und Pertuzumab. Der Antikörper wird in Kombination mit einer Chemotherapie über ein Jahr gegeben [4, 32].

An die Therapie schließen sich regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen an, welche der Erkennung von Lokalrezidiven und therapiebedingten Neben- und Folgewirkungen (z.B. Lymphödem, Sensibilitätsstörungen, Organfunktionseinschränkungen) dienen. Diese beinhalten eine Anamnese, eine Tastuntersuchung der betroffenen Brust und der kontralateralen Brust, der Thoraxwand, der Axilla und dem Lymphabflussgebiet sowie eine gynäkologische Untersuchung. Sie finden in den ersten drei Jahren vierteljährlich, im vierten und fünften Jahr halbjährlich und ab dem sechsten Jahr jährlich statt. Zusätzlich soll jährlich eine Mammografie der ipsilateralen und kontralateralen Brust und ggf. auch eine Sonografie stattfinden. Bei Hochrisiko-Patientinnen ist in speziellen Fällen (z.B. schlechte Abgrenzbarkeit von Narbe zu möglichem Rezidiv) auch eine MRT indiziert. Apparative Untersuchungen (ausgenommen Mammografie und Sonografie) und Labordiagnostik werden nur bei einem Verdacht auf ein Lokalrezidiv oder Fernmetastasen eingeleitet [30, 32].

### 2.1.7 Prognose

Die Prognose des Mamma-Karzinoms ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Das 10-Jahres-Überleben für invasiv-lobuläre und invasiv-duktales Mamma-Karzinome beträgt 35% bzw. 30%. Die duktales Sonderformen (z.B. medulläre Karzinome) haben mit  $\geq 60\%$  10-Jahres-Überleben eine deutlich bessere Prognose [28]. Die Prognose ist ebenfalls abhängig von der individuellen Einstufung des Tumors in das TNM-System: so haben größere und nodal-positive Karzinome eine schlechtere Prognose. Eine primäre Fernmetastasierung (M1) ist auch mit einem schlechteren *Outcome* assoziiert. Das relative 10-Jahres-Überleben beträgt bei M1-Status 12,6% (Abbildung 3) [41].



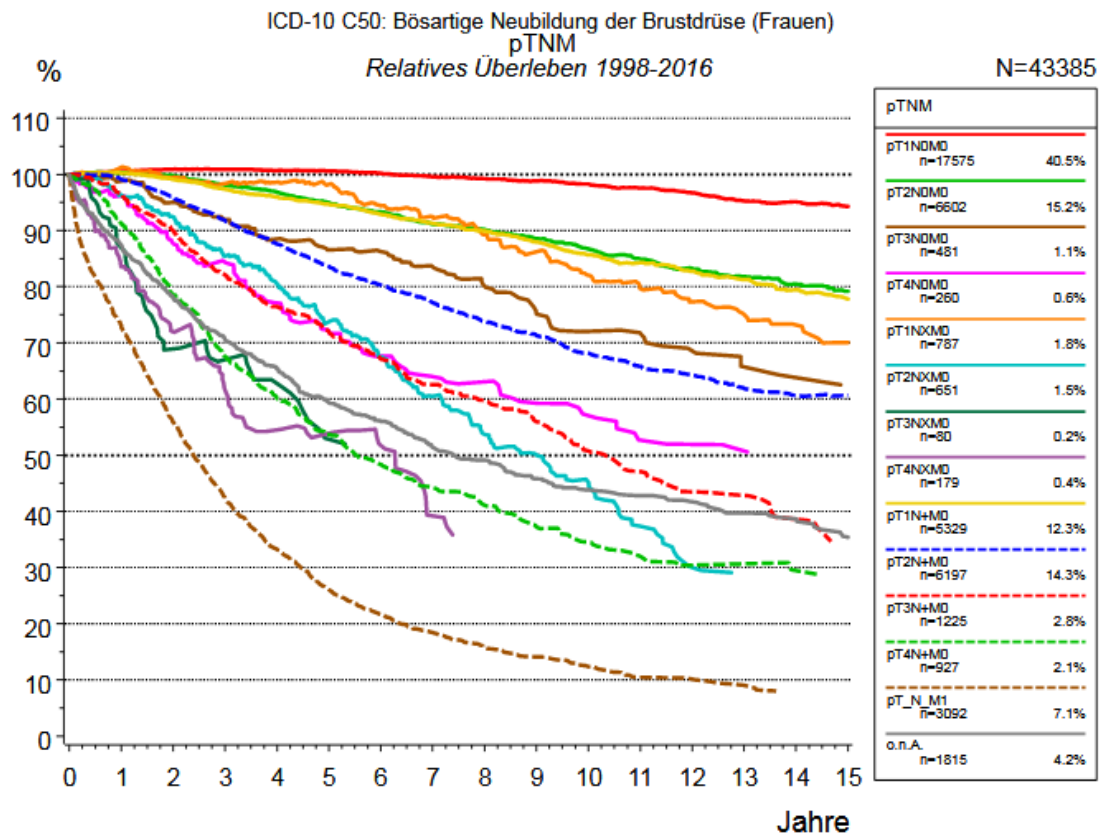


Abbildung 3: Relatives Überleben für Patientinnen mit Mamma-Karzinom nach pTNM 1998-2016 im Einzugsgebiet des Tumorregisters München, entnommen aus [41]

Eine ungünstige Prognose besteht auch bei einem hohem *Grading* des Tumors und Befall von Blut- und Lymphgefäßen, sowie Haut- und Muskelfiltration. Über 75-Jährige und Patientinnen unter 35 Jahren mit Lymphknotenmetastasen haben ebenfalls eine schlechtere Prognose. Der Rezeptorstatus ist von hoher prognostischer Relevanz. So korreliert der Expressionsgrad von Östrogen- und Progesteronrezeptoren mit dem Ansprechen auf eine endokrine Therapie. Dementsprechend haben *triple-negative* Mamma-Karzinome eine schlechtere Prognose [28, 29]. Das nukleäre Antigen Ki-67 gilt als Proliferationsmarker und kann Aufschluss über das Tumorzellwachstum geben. Eine hohe Expression von Ki-67 im Tumorgewebe ist assoziiert mit einem schlechteren Gesamtüberleben [42]. Die tumorassoziierten Proteolyse-Faktoren Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA) und Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) erleichtern die Adhäsion und Invasion von Tumorzellen und bedingen so bei einer erhöhten Konzentration im Tumorgewebe ein höheres Metastasierungsrisiko und ein verringertes Gesamtüberleben. Die Expression dieser

Faktoren kann daher eine Entscheidungshilfe in der Therapieplanung bei nodal-negativen Tumoren sein [43, 44].

### 2.1.8 Lokalrezidiv

Als Lokalrezidiv (LR) wird das Wiederauftreten des Brustkrebs intramammär und im Bereich der ipsilateralen Thoraxwand bezeichnet. Hiervon kann das regionale Rezidiv abgegrenzt werden, welches im Bereich der ipsilateralen axillären Lymphknoten oder im Bereich der ipsilateralen Clavicula auftritt. Lokalrezidiv und regionales Rezidiv werden als lokoregionäres Rezidiv zusammengefasst [30]. Die lokoregionären Rezidive kann man in „echte“ Rezidive und neue Primärtumoren an gleicher Lokalisation unterscheiden. Echte Rezidive haben einen aggressiveren Verlauf und sind häufiger invasive, infiltrierende Karzinome. Sie sind assoziiert mit einem kürzeren Gesamtüberleben. Neue Primärtumoren gehen mit einer besseren Prognose hinsichtlich des Gesamtüberlebens, aber auch mit einer höheren Assoziation zu *BRCA*-Mutationen einher [45, 46]. Die Inzidenz eines intramammären Rezidivs nach BET mit anschließender *Radiatio* liegt bei ca. 8% (5-Jahres-Überleben: 65%). Thoraxwand-Rezidive treten in ca. 4% der Fälle nach Mastektomie auf (5-Jahres-Überleben: 50%), multifokale Rezidive in 16% (5-Jahres-Überleben: 21%) [4]. Eine Strahlentherapie nach BET senkt das Risiko ein Lokalrezidiv zu entwickeln deutlich: LR-Risiko 39% bei BET ohne *Radiatio* vs. 14% bei BET mit *Radiatio* [3]. Das Risiko für das Auftreten eines Lokalrezidivs ist innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnose des Primarius am größten [47]. Risikofaktoren für das Auftreten eines Lokalrezidivs sind junges Alter bei Erstdiagnose, R1-Situation, nicht erfolgte Strahlentherapie nach BET, ausgebliebene endokrine Therapie bei positivem Hormonrezeptorstatus, ein inflammatorisches Mamma-Karzinom, Multifokalität, medialer Tumorsitz innerhalb der Brust, eine ausgedehnte intraduktale Komponente und das Vorliegen peritumoraler Gefäß- und Lymphgefäßinvasion. Ebenfalls haben die Anzahl befallener axillärer Lymphknoten, ein hohes Ki-67, hohes *Grading*, Tumorgroße > 2 cm bei N0-Status, ein hoher BMI und negativer Hormonrezeptor-Status einen Einfluss auf das Risiko, ein Lokalrezidiv zu entwickeln [4-6]. HER2-positive und *triple-negative* Mamma-Karzinome entwickeln häufiger ein Lokalrezidiv als Luminal A- und Luminal B-Tumoren [6, 48].

Die Entdeckung eines Lokalrezidivs erfolgt häufig im Rahmen der Tumor-Nachsorge oder bei der selbstständigen Tastuntersuchung der Brust durch die Patientin oder den Patienten [7]. Nach der Diagnosestellung sollte vor Einleitung einer Behandlung ein komplettes *Staging* per Thorax- und Abdomen-CT, eine histologische Sicherung des Lokalrezidivs und eine Re-Evaluation bezüglich des Hormonrezeptor- und HER2-Status erfolgen [6], da bei Patientinnen mit einem Lokalrezidiv ein erhöhtes Risiko für eine Fernmetastasierung besteht [49].

Bei intramammären Rezidiven sollte eine Mastektomie angestrebt werden. In Einzelfällen mit günstigen Tumoreigenschaften kann jedoch auch eine Brust-erhaltende Therapie mit anschließender Bestrahlung in Frage kommen. Bei Thoraxwand-Rezidiven kann eine lokale Exzision sowie die Entfernung von Teilen der Thoraxwand (z.B. Rippenteilresektion) in Betracht gezogen werden. Hierbei müssen jedoch eine mögliche Fernmetastasierung ausgeschlossen und die Komorbiditäten der Patientin sowie die Tumoreigenschaften kritisch in die Therapieentscheidung einbezogen werden. Eine *Radiatio* der Thoraxwand sollte erfolgen, wenn noch keine Bestrahlung erfolgt ist oder das Risikoprofil bezüglich der Operation ungünstig ist [4, 50]. Bei positivem Hormonrezeptor-Status sollte grundsätzlich eine endokrine Therapie erfolgen. Von einer Chemotherapie profitieren vor allem Patientinnen mit negativem Hormonrezeptorstatus [51].

### 2.1.9 Tumormarker

Als Tumormarker werden Substanzen bezeichnet, deren Menge bei Vorliegen einer Malignomkrankung vorallem in Körperflüssigkeiten (z.B. Blut) in erhöhtem Maß bestimmt werden kann. Häufig handelt es sich dabei um Proteine. Tumormarker werden zur Verlaufsbeurteilung, zum Therapiemonitoring und zur Erkennung von möglicherweise auftretenden Rezidiven herangezogen [52]. Beispielsweise wird das carcinoembryonale Antigen (CEA) als Tumormarker bei verschiedenen Adenokarzinomen, wie dem Colon- als auch dem Mamma-Karzinom, eingesetzt [53, 54]. Die klinische Relevanz der Bestimmung von Tumormarkern im Blut nimmt jedoch beim Mamma-Karzinom im Vergleich zur Bestimmung der histopathologischen Merkmale des Tumors eine untergeordnete Rolle ein [52]. Insgesamt sind im Rahmen der diagnostischen Möglichkeiten bei Mammakarzinomen noch keine

zufriedenstellenden Tumormarker etabliert, die durch einfache Blutentnahmen unkomplizierte Verlaufsbeurteilungen zulassen würden. Die Arbeitsgruppe um Ibrahim stellte 2020 fest, dass die Bestimmung von miRNA-21 im Serum sensitiver als die Bestimmung der gängigen Tumormarker CEA und CA 15-3 zur Diagnostik von Mamma-Karzinomen ist [55]. In diesem Kontext eröffnen microRNAs ein bisher wenig beachtetes Feld an Möglichkeiten.

## 2.2 MicroRNA (miRNA)

Die Erstbeschreibung von microRNAs (miRNA) erfolgte 1993 durch die Arbeitsgruppe um Rosalind Lee. Sie beschrieben die miRNA *lin-4* in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). *Lin-4* codierte nicht für ein Protein, konnte aber durch Anlagerung an die 3'UTR der mRNA von *lin-14* deren Translation behindern. Dies führte zu einer *Down-Regulation* des Proteins *lin-14* auf posttranskriptioneller Ebene [8, 56]. *Lin-14* hat eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung und Differenzierung von *C. elegans*. Wenige Jahre später wurde *let-7* als zweite miRNA identifiziert, welche ebenfalls Entwicklungsvorgänge reguliert. Diese miRNA wurde jedoch nicht nur in *C. elegans*, sondern auch in *Drosophila melanogaster*, verschiedenen humanen Geweben und Geweben anderer Wirbeltiere gefunden [57, 58]. Aufgrund der Beteiligung in der embryonalen Entwicklung von *C. elegans*, aber auch der Relevanz für humane Entwicklungsprozesse wurden in den folgenden Jahren große Anstrengungen in die weitere Erforschung der miRNAs gesteckt. Der Begriff *microRNA* wurde 2001 durch die Arbeitsgruppen um Lagos-Quintana et al., Lee et al. und Lau et al. geprägt [9, 59, 60].

### 2.2.1 Biogenese

MicroRNAs sind kurze, etwa 20-24 Nukleotide lange, einzelsträngige, nicht-codierende RNA-Moleküle [9]. Die miRNA-Gene liegen im gesamten Genom verteilt [61]. Hierbei können sie in Gruppierungen, sog. „*Clustern*“, vorliegen, welche dann gemeinsam transkribiert werden [59]. Sie können allerdings auch völlig unabhängig im Genom liegen oder sie befinden sich nach dem Promotor des später zu regulierenden Gens und können so gemeinsam mit der zu regulierenden mRNA transkribiert werden [62]. Die Reifung von miRNAs erfolgt in mehreren Schritten ( Abbildung 4). Nach ihrer Transkription durch die RNA-Polymerase II wird die miRNA zunächst als *primary microRNA* (pri-miRNA) bezeichnet und bildet eine Doppelstrang- und Schleifenstruktur aus [63, 64]. Noch im *Nucleus* wird die pri-miRNA durch die RNase III *Drosha* zur etwa 70 nt langen *precursor microRNA* (pre-miRNA) prozessiert [65, 66]. Mithilfe von Ran-GTP als Cofaktor wird die pre-miRNA dann über Exportin-5 aus dem *Nucleus* in das Zytoplasma der Zelle geschleust [67]. Die weitere Reifung der pre-miRNA erfolgt im Zytoplasma durch die RNase III *Dicer*, sodass in diesem

Prozessierungsschritt die reife miRNA entsteht [68-70]. Im Folgenden lagern sich die reife miRNA und der RISC (*RNA-induced silencing complex*) zusammen. Der RISC ist ein Enzymkomplex, der unter anderem Argonaute-Protein enthält und die Anlagerung der miRNA an die Ziel-mRNA ermöglicht [71]. Die miRNA lagert sich dann mit ihrer sog. „seed region“ an die 3'UTR der Ziel-mRNA an. Die „seed region“ ist ein ca. 7 nt langer Abschnitt der miRNA, der entweder vollständig oder nur partiell komplementär zur mRNA ist. Wenn miRNA und mRNA vollständig komplementär aneinander binden, wird der Abbau der mRNA durch die Endonuklease Argonaute2 eingeleitet, bei einer partiellen Komplementarität wird die Translation der mRNA nachfolgend inhibiert [72-75]. Die Reifung der miRNA unterliegt eigenen Regulationsmechanismen: so wird beispielsweise die Endonuklease *Dicer* von manchen miRNAs inhibiert [76], *Dicer* reguliert sich per Autoinhibition durch die interne Helikase-Domäne selbst [77] und auch miRNAs regulieren sich gegenseitig [78].

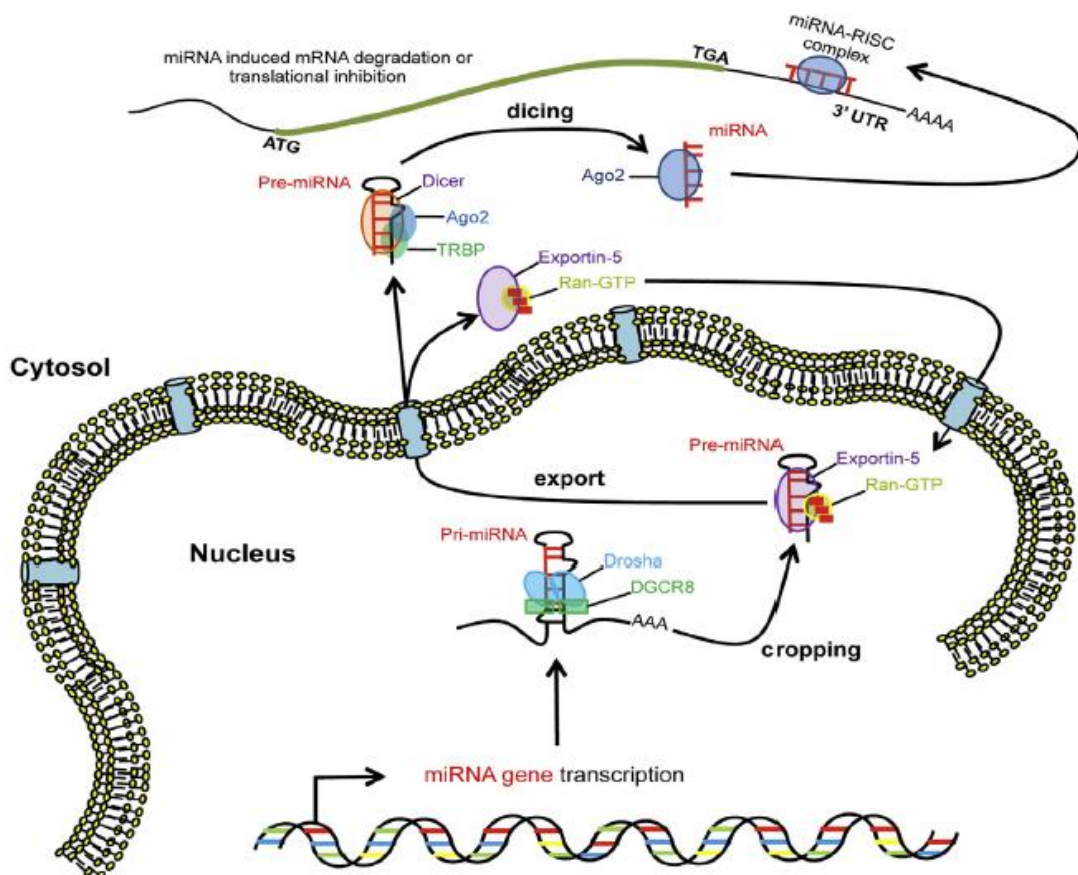


Abbildung 4: Prozessierung und Reifung von miRNA, entnommen aus [79]

### 2.2.2 Funktion

MicroRNAs sind physiologisch maßgeblich an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt. Diese Annahme begründete sich schon bei der Erstbeschreibung in *C. elegans* 1993 und wurde in den folgenden Jahren durch verschiedene Knockout-Versuche nochmals untermauert. So zeigten Bernstein et al. 2003 und Wang et al. 2007, dass *Knockouts* des miRNA-Biogenese-Enzyms *Dicer* und DGCR8 als Cofaktor von *Drosha* im Mausmodell zu embryonaler Letalität führten [80, 81]. Ebenso zeigte der *Knockout* von Argonaute2-Protein in embryonalen Stammzellen eine verlangsamte Zellerneuerung und Zelldifferenzierung [82]. So kann man verschiedenen miRNAs einen Einfluss auf die neuronale Entwicklung [83-85], die Differenzierung von Hautzellen [86], die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzelllinien [87, 88] und vielen weiteren physiologischen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen zuschreiben. Aktuell sind in der internationalen microRNA-Datenbank *miRBase* für 271 Spezies insgesamt 38 589 miRNAs aufgeführt. Dem *Homo sapiens* werden davon mehr als 1900 miRNAs zugesprochen [10]. Es wird angenommen, dass miRNAs ca. 1% des menschlichen Genoms ausmachen und diese etwa 30% der protein-codierenden Gene regulieren [63, 74].

### 2.2.3 Dysregulation in Krankheiten

MiRNAs sind in verschiedenen Krankheiten dysreguliert. In kardiovaskulären Erkrankungen ist beispielsweise die miRNA-21 während der Fibrose von Kardiomyozyten signifikant hochreguliert, was eine kardiale Hypertrophiebildung begünstigt [89]. Demgegenüber steht die miRNA-1, welche physiologisch Calcium-Signalwege über Calmodulin reguliert und somit eine kardiale Hypertrophie begrenzt [90]. Des Weiteren sind hohe Level der miRNA-29-Familie (miRNA-29a/b/c) aufgrund einer fortschreitenden Zytokin-vermittelten  $\beta$ -Zell-Dysfunktion mit der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 1 assoziiert [91]. Bei der Betrachtung neurodegenerativer Erkrankungen konnte nachgewiesen werden, dass miRNA-133b, welche spezifisch in dopaminergen Neuronen exprimiert wird und die Entwicklung und Reifung dopaminergener Neurone reguliert, bei Morbus Parkinson im Mittelhirngewebe nicht gefunden werden kann [92]. Im Feld der Autoimmunerkrankungen konnte die miRNA-203 in Psoriasis-betroffenen Arealen im Vergleich zu gesunder Haut in deutlich

höherem Maß aus Keratinozyten isoliert werden [93] und die miRNAs-146a und -155 scheinen einen maßgeblichen Einfluss auf Zellen im Synovialgewebe bezüglich deren TNF- $\alpha$ -Synthese bei Rheumatoider Arthritis zu haben [94-96].

Auch in Malignomen konnte wenige Jahre nach der Entdeckung der ersten miRNAs ein verändertes miRNA-Expressionsverhalten beobachtet werden. So beschrieb die Arbeitsgruppe um Calin 2002 das Fehlen der miRNA-15a und -16 bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie (CLL). Die Gene dieser miRNAs liegen auf dem Chromosom 13q14, welches häufig bei CLL-Patienten deletiert ist [97]. Zwei Jahre später formulierten Calin et al. die Annahme, dass eine Vielzahl von miRNAs in verschiedensten Tumorentitäten eine Rolle spielen, da etwa die Hälfte aller miRNA-Gene in fragilen oder mit der Entwicklung von Malignomen assoziierten Regionen des Genoms liegen [11]. Auch eine dysregulierte Synthese der miRNA-Biogenese-Enzyme bewirkt in humanen Krebszellen ein verändertes Verhalten. So zeigten Merritt et al., dass erniedrigte *Dicer*-Level in Zellen von Ovarial-Karzinomen mit einem kürzeren krankheitsfreien Überleben assoziiert waren [98]. Durch das veränderte, dysregulierte Expressionsverhalten wirken manche miRNAs wie Onkogene und fördern so die Entartung oder die übermäßige Proliferation von Zellen; sie werden als „oncomiR“ bezeichnet. Dies betrifft etwa die miRNA-10b und -21 in Brustkrebszellen. Dem gegenüber stehen die miRNAs, die wie Tumorsuppressoren wirken, wie z.B. miR-125b [99].

In Brustkrebs-Geweben konnte eine Dysregulation einiger miRNAs beobachtet werden. Die Expression von miRNA-9, miRNA-10b, miRNA-21, miRNA-181a, miRNA-210 und miRNA-375 wurde erhöht im Vergleich zu gesundem Gewebe beschrieben. Dabei korrelierten die dysregulierten Expressionslevel mit einem kürzeren Krankheitsfreiem Überleben oder einem höheren Risiko der Entwicklung von Rezidiven [13, 100-106]. Des Weiteren konnten miRNAs auch mit Metastasierung [107] und Resistenz gegenüber Tamoxifen als endokriner Therapie in humanem Brustkrebs in Verbindung gebracht werden [108, 109].



#### 2.2.4 miRNA-9

Es existieren 3 Gene für die miRNA-9: *miR9-1*, *miR9-2* und *miR9-3*. Sie liegen auf Chromosom 1, 5 und 15 [10]. Zuerst wurde die miRNA-9 im Zusammenhang mit der Entwicklung und Differenzierung neuronalen Gewebes beschrieben. Es wurden dynamisch wechselnde Expressionslevel in den verschiedenen Phasen der Neurogenese beobachtet [110-112]. Im Zuge dieser Erkenntnisse wurden verschiedene Zielstrukturen der miRNAs im Kontext der neuronalen Entwicklung identifiziert. Dazu gehören unter anderem Transkriptionsfaktoren wie ZIC5, FOXP1 und GSX2, sowie Moleküle im Notch-Signalweg (z.B. HES1, HER5, HER6) [113-117]. In verschiedenen Tumorentitäten wurde die miRNA-9 dysreguliert gefunden: so ist sie z.B. in Hodgkin-Lymphomen, Brustkrebs, Zervixkarzinomen, Colon- und Magenkarzinomen hochreguliert und in Leukämien und Lungenkrebs herunterreguliert [118]. Durch die Identifizierung von E-Cadherin als direkte Zielstruktur erscheint eine Beteiligung in der Migration von Tumorzellen wahrscheinlich [100, 119]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei einer erhöhten Expression von miRNA-9 die Zellproliferation in Magen- und Zervixkarzinomen gesteigert ist [120, 121]. In Brustkrebszellen scheint der Östrogen-Rezeptor ein direktes Ziel der miRNA-9 zu sein. Diese Annahme geht *in vitro* mit einer erhöhten Tamoxifen-Resistenz einher [122]. miRNA-9 selbst wird durch den Transkriptionsfaktor PROX1 reguliert [119]. Die Dysregulation von miRNA-9 in Krebszellen hat auch einen Einfluss auf das *Outcome* von Patienten. So zeigte eine Meta-Analyse von 17 Studien, dass in vielen Tumorentitäten (inklusive Mamma-Karzinomen) erhöhte Expressionslevel mit einem kürzeren Krankheits- und lokalrezidiv-freien Überleben und einem kürzeren Gesamt-Überleben einhergingen. Eine Ausnahme bildet das Ovarial-Karzinom, bei dem erniedrigte Expressionslevel zu einem schlechteren *Outcome* geführt haben [14].

#### 2.2.5 miRNA-10b

Das miRNA-10b-Gen befindet sich auf Chromosom 2 [10]. In der Literatur werden verschiedene Zielstrukturen und damit regulierte Signalwege von miRNA-10b beschrieben [123]. Die Expression von miRNA-10b selbst wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor TWIST1 oder ein Protein aus dem Epstein-Barr-Virus (LMP1) reguliert [124, 125]. Ma et al. zeigten 2007, dass die Regulation von HOXD10 durch

miRNA-10b eine Überexpression des pro-metastatischen Faktors RHOC bewirkt [124]. Außerdem wird E-Cadherin indirekt durch miRNA-10b negativ beeinflusst [126, 127]. Diese Daten veranschaulichen die Beteiligung von miRNA-10b in der Initiierung von Metastasierung und Zellmigration. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression positiv mit der HER2-Expression und negativ mit der Expression von Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren im Mamma-Karzinom korreliert [127]. In Brustkrebsgewebe konnte auch eine deutlich erhöhte miRNA-10b-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden [128]. Huang et al. zeigten 2017 in einer Meta-Analyse, dass eine hohe miRNA-10b-Expression mit einem schlechten *Outcome* bezüglich des Gesamt-Überlebens assoziiert ist [129]. Ebenso ist eine hohe miRNA-10b-Expression mit einem kürzeren Krankheits- bzw. Rezidiv-freiem Überleben assoziiert [101, 130].

### 2.2.6 miRNA-21

Das miR-21-Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert [10]. MiRNA-21 wurde in verschiedenen Tumorarten inklusive des Mamma-Karzinoms überexprimiert gefunden [102, 128, 131]. In der Literatur findet man zahlreiche Hinweise für die Beteiligung der miRNA-21 in der Tumorentstehung und -progression, in der Metastasierung und in anti-apoptotischen Vorgängen [131-135]. Außerdem ist eine Vielzahl möglicher Zielstrukturen beschrieben [136]. Unter anderem sind dort Regulatoren des Zellzyklus, wie z.B. CDC25A [137], sowie PDCD4 als vermutlich pro-apoptotischen Faktor [134, 138] und der Tumorsuppressor PTEN beschrieben [139, 140]. Die miRNA-21 selbst wird durch die Transkriptionsfaktoren STAT3 und NFκB reguliert. Diese Regulation ist Interleukin-6- und Interferon-abhängig [133, 141]. Hohe Expressionslevel der miRNA-21 im Knochenmark von Patienten mit Mamma-Karzinom korrelieren signifikant mit kürzerem Rezidiv-freiem und kürzerem Gesamtüberleben [103, 142].

### 2.2.7 miRNA-181a

Für die miRNA-181a sind zwei Gen-Loci bekannt: *miR-181a-1* wird auf Chromosom 1 und *miR-181a-2* auf Chromosom 9 codiert [10]. MiRNA-181a trägt physiologisch wesentlich zur Differenzierung von B-Lymphozyten [143] und zur Modulation der T-Zell-Sensitivität und -Selektion bei [144]. In der Entwicklung von Blut- und

Lymphgefäßen ist miRNA-181a über PROX1 als Zielstruktur beteiligt [145]. Als weitere potentielle Zielstrukturen wurden in der Literatur unter anderem PTEN, als Regulator des PI3K-Signalweges, der Tumorsuppressor ATM, als Regulator in der Reparaturkaskade bei DNA-Schädigungen und das anti-apoptotisch wirksame BCL-2 beschrieben [103, 146-149]. Jiao et al. haben miRNA-181a in einen Zusammenhang mit der MDR (*multi drug resistance*) in MCF7-Zellen gebracht und haben als mögliches ursächliches Target BCRP (*breast cancer resistance protein*) vorgeschlagen [150].

### 2.2.8 miRNA-210

Das miR-210-Gen ist auf Chromosom 11 lokalisiert [10]. Die miRNA-210 wird vor allem im Kontext der Hypoxie beschrieben. Sie wird bei hypoxischen Stoffwechsellagen durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) induziert und somit vermehrt exprimiert [151]. Als mögliche Zielstrukturen sind unter anderem RAD52, welches ein Element des homologen DNA-Reparaturmechanismus ist, TWIST1, welches als Regulator der epithelial-mesenchymalen Transition im klarzelligen Nierenzellkarzinom beschrieben ist, und SOCS1 sowie TNIP1 als Bestandteile des NF $\kappa$ B-Signalweges beschrieben [152-155]. In glatten Muskelzellen von Pulmonalarterien hat miRNA-210 bei Hypoxie über den Transkriptionsfaktor E2F3 als *Target* einen anti-apoptotischen Effekt [156] und in Brustkrebszelllinien wurde sie in einen Zusammenhang mit einer höheren Zellproliferation, -migration und -invasion gebracht [15]. In *triple-negativen* Mamma-Karzinomen sind die Expressionslevel von miRNA-210 signifikant höher als bei Östrogen- und Progesteron-Rezeptor-positivem/HER2-negativem Brustkrebs. Die höhere Expression von miRNA-210 sowohl im Tumorgewebe als auch im Blutplasma ist mit einem schlechteren *Outcome* und dem höheren Risiko für eine Fernmetastasierung assoziiert. In ER-positiven Mamma-Karzinomen sind hohe miRNA-210-Expressionswerte mit einem höheren Risiko für Rezidive assoziiert [15, 104, 157, 158].

### 2.2.9 miRNA-375

Die miRNA-375 ist auf Chromosom 2 codiert [10]. Zuerst wurde sie von der Arbeitsgruppe um Poy 2004 als Pankreas-spezifische microRNA beschrieben, die die Insulinsekretion in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen reguliert. MiRNA-375 vermindert dabei

unabhängig vom Glucose-Metabolismus und  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel die Insulinsekretion. In den Pankreaszellen wurden Myotropin und PDK1 als Targets identifiziert, welche Signalmoleküle im PI3K-Weg sind [159, 160]. Als weitere Zielstrukturen wurden die Januskinase 2 (JAK2) als Bestandteil des JAK/STAT-Signalweges im Magen-Karzinom und IGF1R im Ösophagus-Karzinom gefunden [161, 162]. In verschiedenen Tumorentitäten, wie z.B. dem hepatozellulären Karzinom (HCC), dem Magen-Karzinom und dem Melanom, ist miRNA-375 herunterreguliert [163]. Im Gegensatz hierzu steht die Überexpression von miRNA-375 im Brustkrebs. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Expression von miRNA-375 vor allem Östrogenrezeptor-positiven Brustkrebs betrifft. Es wurde RASD1 als Target identifiziert, welches physiologisch die Expression von ER $\alpha$  (Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ ) inhibiert. Das hohe miRNA-375-Expressionslevel korreliert mit einem hohen ER $\alpha$ -Level. Gleichzeitig scheint aber ER $\alpha$  die Expression von miRNA-375 ebenfalls positiv zu beeinflussen [164, 165]. Zehentmayr et al. zeigten, dass eine hohe Expression von miRNA-375 mit dem höheren Risiko ein Lokalrezidiv zu entwickeln assoziiert ist [105]. Andere Autoren beschreiben eine niedrigere Expression der miRNA-375 im Mamma-Karzinom im Vergleich zu gesundem Brustgewebe und schreiben ihr eine Wirkung als Tumorsuppressor zu [166, 167].

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Dampfsterilisator *Varioklav* (HP-Labortechnik, Oberschleißheim), Eismaschine *Scotsman AF 100* (Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien), Gefrierschrank -20°C (Liebherr, Bulle, Schweiz), Gefrierschrank -80°C *HeraFreeze* (Heraeus, Hanau), Heizblock Thermoschüttler pro (CellMedia, Elsteraue), Kühlschranks 4°C *Cooler* (Liebherr, Bulle, Schweiz), Laborabzug *Airflow Controller AC2* (Waldner, Wangen), Labor-Feinwaage (Sartorius, Göttingen), Minizentrifuge *Sprout* (Heathrow Scientific, Vernon Hills, USA), *Perfect Spin Lightcycler* Platten-Zentrifuge (PeqLab, Erlangen), pH-Meter 211 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein), *Real-Time PCR System LightCycler 480 II* (Roche, Mannheim), Sicherheitswerkbank *SteriFlow* (Heraeus, Hanau), Spektrophotometer *NanoDrop One* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), Thermocycler *Mastercycler egradient S* (Eppendorf, Hamburg), Tischzentrifuge *5415 C* (Eppendorf, Hamburg), Vortexschüttler *Vibrofix VF 1* (IKA-Labortechnik, Staufen), Zentrifuge *5804 R* (Eppendorf, Hamburg)

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einweghandschuhe Nitril *SemperCare* (Semperit, Singapur), *Framestar* 96-Well PCR-Platten (4titude Ltd, Berlin), PCR Tubes 0,2 ml (STARLAB, Hamburg), Pipettenspitzen *TipOne FilterTips* (0,5-10 µL, 2-20 µL, 20-200 µL, 101-1000 µL) (STARLAB; Hamburg), Polypropylen-Röhrchen 50 ml, (Greiner BioOne, Frickenhausen), *Q-Stick Adhesive Foil* für *Framestar* 96-Well PCR-Platten (4titude, Berlin), *Safe-Lock* Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml, 50 ml) (Eppendorf, Hamburg), Serologische Einwegpipetten *Cellstar* (Greiner BioOne, Frickenhausen), *Terralin Liquid* (Schülke & Mayr, Norderstedt), *8-Strip PCR-Tubes* (STARLAB, Hamburg)

#### 3.1.3 Gebrauchsmaterialien

Pipettierhilfe *Accu-Jet Pipetboy* (Brand, Wertheim), Pipetten *Eppendorf Research Plus* (0,5-10 µL, 2-20 µL, 1-100µL, 20-200 µL, 100-1000 µL) (Eppendorf, Hamburg)

### 3.1.4 Chemikalien

*Aqua dest.* (B. Braun, Melsungen), Ethanol 100% p.a. (Honeywell Riedel-de-Haën, Seelze), HCl 37% (Merck, Darmstadt), Nuklease-freies Wasser (Quantabio, Beverly, USA), *RiboLock* RNase-Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), Tris-HCl Puffer p.a. (Carl Roth, Karlsruhe), Trypsin EDTA (Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA), Xylol p.a. (Carl Roth, Karlsruhe)

### 3.1.5 Puffer

TE-Puffer 810 nM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0):

12,11 mg Tris-HCl

0,37 mg EDTA

10 ml *Aqua dest.*

mit HCl 37% auf pH 8,0 eingestellt und anschließend filtriert.

### 3.1.6 Kit-Systeme

*miRNeasy* FFPE Kit (Qiagen, Hilden)

*PerfeCTa SYBR Green SuperMix* (Quantabio, Beverly, USA)

*qScript microRNA cDNA Synthesis Kit* (Quantabio, Beverly, USA)

### 3.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Metabion (Planegg, Deutschland) bezogen und in der qRT-PCR verwendet.

RNU6	5'-GCAAATTCGTGAAGCGTTCC-3'
RNU48	5'-CTCTGAGTGTGTCGCTGATGC-3'
Universal Primer	5'-GCATAGACCTGAATGGCGGTA-3'
hsa-miR-9-5p	5'-CGCTCTTTGGTTATCTAGCTGTATG-3'
hsa-miR-10b-5p	5'-CGTACCCTGTAGAACCGAATTTGT-3'
hsa-miR-21-5p	5'-GCTAAAGTGCTTATAGTGCAGGT-3'
hsa-miR-181a-5p	5'-CATTCAACGCTGTCGGTGAG-3'
hsa-miR-210-3p	5'-TGTGACAGCGGCTGAAAA-3'

hsa-miR-375      5'-GTTCGGCTCGCGTGAAA-3'

### **3.1.8 Gewebeproben**

Die verwendeten Paraffin-Gewebeschnitte stammen von Patientinnen, die zwischen 1998 und 2016 in der Universitätsmedizin Mainz aufgrund eines Mamma-Karzinoms operiert wurden und bei denen Tumorgewebe entnommen wurde. Es wurden nur Gewebeproben eingeschlossen, bei denen zusätzlich zum Gewebe des Primarius auch Gewebe von Lymphknotenmetastasen und/oder Lokalrezidiven zur Verfügung standen. Außerdem wurden nur diejenigen Patientinnen eingeschlossen, denen bei Erstdiagnose des Mamma-Karzinoms in der Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit Blutproben zu Forschungszwecken entnommen wurden. Alle Patientinnen gaben ein schriftliches Einverständnis, dass ihr Gewebe, ihre Blutproben und ihre personenbezogenen Daten in anonymisierter Form zu medizinischen Forschungszwecken verwendet werden dürfen. Die Diagnosestellung des Mamma-Karzinoms erfolgte durch einen Pathologen der Universitätsmedizin Mainz anhand der Histologie des entnommenen Gewebes. Die Gewebeproben (Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen, Lokalrezidive) wurden von der Gewebe-Biobank der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt und in Übereinstimmung mit den Regularien der Gewebe-Biobank verwendet. Ein Ethikvotum liegt vor (Ethikvotum Nr. 837.36016 (10679)).

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Steriles Arbeiten**

Aufgrund ubiquitär vorkommender RNasen (besonders im Bereich der menschlichen Haut) erfordert der Umgang mit Geweben, mit denen eine Isolation von RNA/miRNA vorgenommen werden soll, besondere Vorsichtsmaßnahmen. Daher wurde bei allen Arbeitsschritten der folgenden Methoden Einweghandschuhe getragen und die Extraktion der Gesamt-RNA einschließlich der miRNA an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

### 3.2.2 Extraktion der Gesamt-RNA einschließlich der miRNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA einschließlich der microRNA erfolgte mithilfe des *miRNeasy FFPE Kits* von Qiagen. Das Herstellerprotokoll wurde in der folgenden Weise modifiziert. Es wurden von der jeweiligen Gewebeprobe vier Paraffinschnitte à 10 µm Dicke verwendet. Zum Herauslösen des Paraffins wurden zuerst zweimal jeweils zwei 10 µm-Paraffinschnitte in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und 1 ml Xylol p.a. hinzugefügt, zehn Sekunden auf dem Vortexschüttler gemischt und zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Xylol-Überstand sorgfältig abpipettiert und der Xylol-Schritt zweifach wiederholt. Um jegliches Xylol aus den Gewebeproben zu entfernen, wurde 1 ml Ethanol 100% hinzugegeben, zehn Sekunden auf dem Vortexschüttler gemischt und fünf Minuten inkubiert. Der Ethanol-Überstand wurde sorgfältig abpipettiert und der Schritt wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 30 Minuten bei 37°C mit geöffnetem Deckel in einem Heizblock inkubiert, um jegliches Ethanol aus dem Gewebe zu entfernen. Sobald die Gewebestücke trocken und somit auch frei von Ethanol waren, wurden 150 µl PKD-Puffer hinzugegeben und per Vortexschüttler gemischt. Zur Degradation der vorhandenen Proteine wurden 10 µl Proteinase K hinzugefügt und es folgten 15 Minuten Inkubationszeit bei 56°C, sowie 15 Minuten bei 80°C im Heizblock. Anschließend wurde die Reaktion abgestoppt, indem die Reaktionsgefäße drei Minuten auf Eis gelagert wurden. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 20.000 g. Das so hergestellte Pellet enthielt hauptsächlich Zellabfall und quervernetzte DNA. Daher wurde der flüssige Überstand in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zum Entfernen jeglicher DNA aus der Gewebeprobe wurden 16 µl *DNase Booster Puffer* und 10 µl RNase-freie DNase I hinzugegeben, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden 320 µl RBC-Puffer hinzugegeben und mit dem Reaktionsansatz vermischt. Im nächsten Schritt wurden 1120 µl Ethanol 100% hinzugegeben und durch sofortiges Auf- und Abpipettieren vermischt. 700 µl der Probe wurden dann auf eine *RNeasy MinElute-spin column* gegeben, welche in einem 2 ml-Auffanggefäß platziert war. Es folgten 15 Sekunden Zentrifugation bei 8.000 g; das Eluat wurde verworfen. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die gesamte Probe durch die *RNeasy MinElute-spin column* gelaufen war. Im Anschluss wurden 500 µl RPE-Puffer auf die *RNeasy MinElute-spin column* gegeben und zwei Minuten bei 8.000 g zentrifugiert und das Eluat wurde abermals



verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nun wurde die *RNeasy MinElute-spin column* in ein neues 2 ml Auffanggefäß überführt und fünf Minuten bei 8.000 g zentrifugiert, um die Membran der Säule zu trocknen. Die Elution der RNA (inklusive miRNA) erfolgte, nachdem die *RNeasy MinElute-spin column* in ein neues 1,5 ml Auffanggefäß überführt wurde, durch Zugabe von 20 µl RNase-freiem Wasser auf die Membran der Säule mit einer einminütigen Inkubation. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 8.000 g für eine Minute. Das Eluat wurde aufgenommen und abermals auf die Membran gegeben und nochmals nach einminütiger Inkubationszeit für eine Minute bei 8.000 g zentrifugiert. Zu den 18 µl Eluat (bei 2 µl Totraumvolumen der *RNeasy MinElute-spin column*) wurde 1 µl des RNase-Inhibitors *RiboLock* hinzugegeben, um vor ungewolltem RNA-Abbau durch Ribonukleasen zu schützen. Nach der Quantifizierung der Gesamt-RNA-Konzentration und der Reinheitsbestimmung der RNA am *NanoDrop One* wurde die RNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

### 3.2.3 Quantifizierung und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Quantifizierung der Gesamt-RNA-Konzentration und die Reinheitsbestimmung der RNA erfolgte spektralphotometrisch am *NanoDrop One* im Anschluss an die RNA-Extraktion. Dazu wurde zur Bestimmung eines Referenzwertes zuerst eine Leermessung mit 1 µl Nuklease-freiem Wasser vorgenommen und anschließend jeweils 1 µl der Probe zur Messung eingesetzt. Anhand des Absorptionsmaximums bei einer Wellenlänge von 260 nm wird die optische Dichte ( $OD_{260}$ ) der Probe gemessen. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, einschließlich der miRNA. Außerdem wird die optische Dichte bei den Wellenlängen 280 nm ( $OD_{280}$ ), welche dem Absorptionsmaximum von Proteinen entspricht, und 230 nm ( $OD_{230}$ ), welche Aufschluss über eine Verunreinigung mit organischen Substanzen gibt, gemessen. Aus der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm kann rechnerisch mit Hilfe des Lambert-Beer'schen-Gesetzes die Konzentration der Gesamt-RNA ermittelt werden. Die Reinheit der Probe in Bezug auf RNA lässt sich durch die Bildung der Quotienten von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  und von  $OD_{260}$  zu  $OD_{230}$  beurteilen. Hierbei sollte  $OD_{260}/OD_{280}$  bei reiner RNA bei ca. 2,0 und  $OD_{260}/OD_{230}$  bei ca. 1,8 bis 2,2 liegen [168].

### 3.2.4 cDNA-Synthese

Die isolierte miRNA wurde im Anschluss an die Extraktion in cDNA umgeschrieben, damit diese als *Template* in der qRT-PCR eingesetzt werden konnte. Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des *qScript microRNA cDNA Synthesis Kit* von Quantabio durchgeführt. Dabei wurde die Synthese entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt.

Die Synthese ist in zwei Schritte gegliedert: die *Poly(A)-Tailing*-Reaktion und die cDNA-Synthese-Reaktion. Im ersten Reaktionsschritt wird mithilfe der Poly(A)-Polymerase ein Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der miRNA synthetisiert, damit im nachfolgenden zweiten Schritt ein *Oligo-dT-Adapter-Primer* daran binden und eine Reverse Transkriptase in Anwesenheit von dNTPs die miRNA in cDNA umschreiben kann. Dieser Schritt ist wichtig, da nur DNA in der qRT-PCR eingesetzt werden kann.

Die in Tabelle 2 aufgeführten Komponenten wurden in einem 0,2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis gemischt und anschließend zentrifugiert. Die Gesamt-RNA musste laut Herstellerprotokoll mit Nuklease-freiem Wasser auf 1000 ng/µl eingestellt werden. Nachfolgend wurde sie im *Thermocycler* bei 37°C für 60 Minuten und anschließend bei 70°C für fünf Minuten inkubiert.

**Tabelle 2: Reaktionsansatz der *Poly(A) Tailing*-Reaktion (Schritt 1)**

Komponente	Volumen [µl]
<i>Poly(A) Tailing</i> -Puffer	2
Poly(A)-Polymerase	1
Gesamt-RNA in Nuklease-freiem Wasser (1 µg/µl)	7
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10</b>

Die in Tabelle 3 aufgeführten Komponenten wurden auf Eis vermischt, zentrifugiert und anschließend zuerst bei 42°C für 20 Minuten inkubiert und dann bei 85°C für fünf Minuten im *Thermocycler* inkubiert.

**Tabelle 3: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese-Reaktion (Schritt 2)**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
<i>Poly(A) Tailing</i> -Reaktionsansatz	10
microRNA cDNA Reaktionsmix	9
Reverse Transkriptase	1
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

Die Konzentration der vorliegenden cDNA betrug nun 1000 ng/µl. Das Reaktionsprodukt wurde mit TE-Puffer im Verhältnis von 1:100 für den Einsatz in der qRT-PCR verdünnt. Außerdem wurde eine der 1:100 verdünnten Proben zur Herstellung einer Standardreihe verwendet. Dazu wurde diese Probe nochmals in den Stufen 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 mit TE-Puffer verdünnt. Bis zum Einsatz in der qRT-PCR wurde die verdünnte cDNA bei -20°C gelagert.

### 3.2.5 qRT-PCR

Die *quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion* (qRT-PCR) basiert auf dem Konzept der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR dient der Amplifikation definierter Nukleotidsequenzen. Hierzu werden in einem Reaktionsansatz die zu amplifizierende DNA (*Template*), eine hitzestabile DNA-Polymerase, zwei spezifische Oligonukleotid-Sequenzen, welche als *Primer* selektiv an die zu amplifizierende DNA binden und somit die Startpunkte der Synthese bestimmen, Desoxyribonukleosid-triphosphate (dNTPs) und spezifische Pufferlösungen hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wird dann in einen *Thermocycler* platziert und es folgen 30-50 Zyklen der folgenden drei Schritte. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge bei einer Temperatur von ca. 95°C voneinander getrennt. Im zweiten Schritt (*Annealing*) lagern sich bei ca. 55-65°C die *Primer* an die komplementäre Sequenz der zu amplifizierenden DNA an. Im dritten Schritt findet die Elongation des neuen komplementären DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase ausgehend vom *Primer* statt. Dieser Schritt findet bei ca. 70°C statt. Der so hergestellte DNA-Doppelstrang besteht dann aus einem Original-Einzelstrang und einem neu synthetisierten Einzelstrang [169].

Die qRT-PCR ist eine Weiterentwicklung der PCR, welche die DNA-*Templates* nicht nur amplifiziert, sondern zusätzlich auch quantifiziert. Hierzu ist der Einsatz fluoreszenzmarkierter Reagenzien nötig. Mit Hilfe des bei der Synthese abgegebenen Fluoreszenzsignals wird die amplifizierte DNA quantifiziert [170]. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt in einem speziellen *Thermocycler* mit integrierter Detektionseinheit (*Lightcycler*).

In der vorliegenden Arbeit wurde das *PerfeCTa SYBR Green*-System der Firma Quantabio verwendet. Dabei wurde ein *Universal Primer*, welcher am *Oligo-dT-Adapter-Primer* des im cDNA-Synthese-Schritt entstandenen Produkts komplementär bindet, verwendet. Zur Amplifikation und Quantifizierung der gewählten miRNAs wurde außerdem zusätzlich jeweils ein miRNA-spezifischer *Primer* zum Reaktionsansatz hinzugefügt (Abbildung 5).

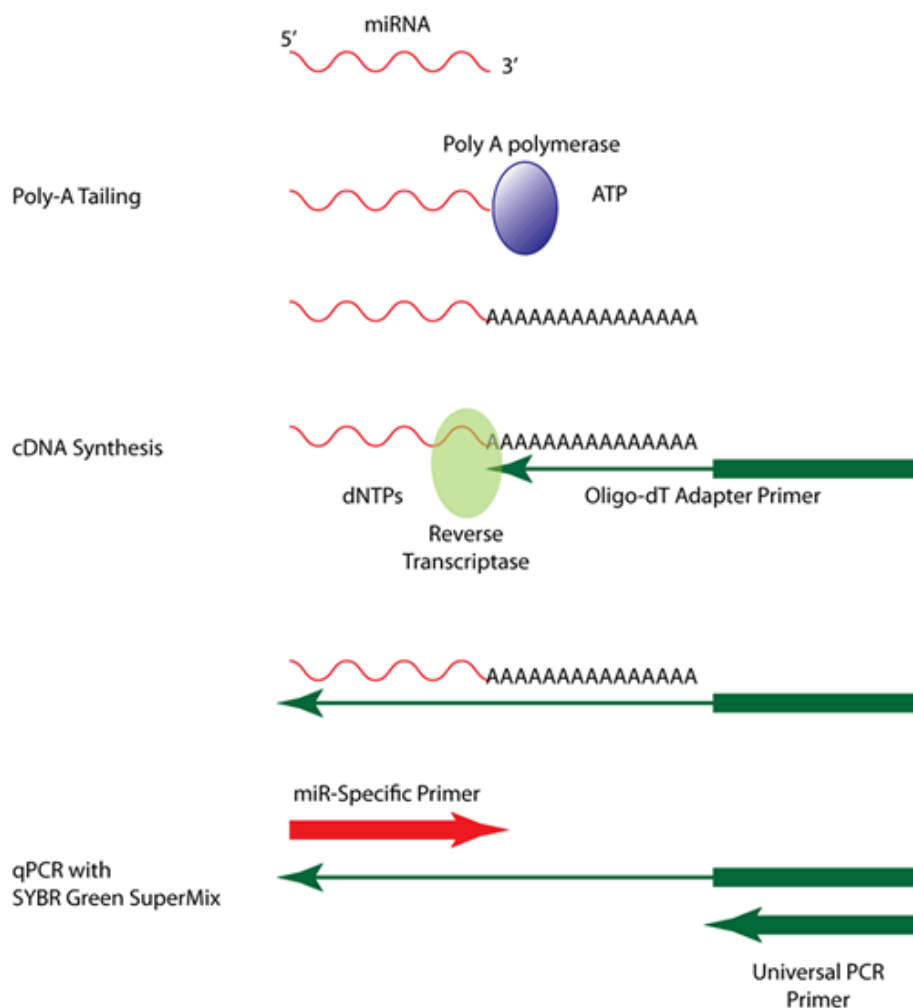


Abbildung 5: Reaktionsschritte der cDNA-Synthese und der qRT-PCR, entnommen aus [171]

Folgender Reaktionsansatz wurde in Dupletts in die 96 Well PCR-Platten pipettiert (Tabelle 4). In jedem PCR-Lauf wurden gleichzeitig zwei Negativproben gemessen, um mögliche Verunreinigungen des Reaktionsansatzes auszuschließen. Hierbei wurde anstatt der cDNA 4 µl Nuklease-freies Wasser hinzugegeben.

**Tabelle 4: Reaktionsansatz für die qRT-PCR**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
<i>PerfeCTa</i> SYBR Green SuperMix	10
Spezifischer miRNA-Primer (10 µM)	0,4
<i>Universal Primer</i> (10 µM)	0,4
Nuklease-freies Wasser	5,2
1:100 verdünnte cDNA	4
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20</b>

Im Anschluss wurde die 96 Well-PCR-Platte luftdicht verschlossen und zentrifugiert und der beschriebene Reaktionsansatz mit den folgenden Reaktionsbedingungen im *Lightcycler* inkubiert.

Enzymaktivierung	95°C, 2 Min.	
PCR (45 Zyklen)	Denaturierung	95°C, 5 Sek.
	<i>Annealing</i>	60°C, 15 Sek.
	Elongation	70°C, 15 Sek.
	(mit Fluoreszenzdetektion)	

Die Cp-Werte der Proben-Dupletts wurden gemittelt und die Konzentration der amplifizierten DNA in Bezug auf die Standardreihe relativ quantifiziert. Dabei wurde für alle Proben mit einer Cp-Standardabweichung > 0,3 und einem Cp-Wert > 40 bei drei wiederholten Messungen ein Wert von 0 angenommen.

### **3.2.6 Follow Up**

Das *Follow Up* der Patientinnen, deren Tumorproben analysiert wurden, wurde mit Hilfe des klinikinternen Informationssystems SAP erhoben. Es wurden patientenbezogene Daten (z.B. Geburtsdatum), tumorbezogene Daten (z.B. TNM-Klassifikation) und therapiebezogene Daten in das *Follow Up* aufgenommen. Eine Anonymisierung der patientenbezogenen Daten erfolgte unmittelbar im Anschluss an die Datenerhebung. Die erhobenen Parameter werden detailliert im Anhang aufgeführt.

### **3.2.7 Statistische Auswertung**

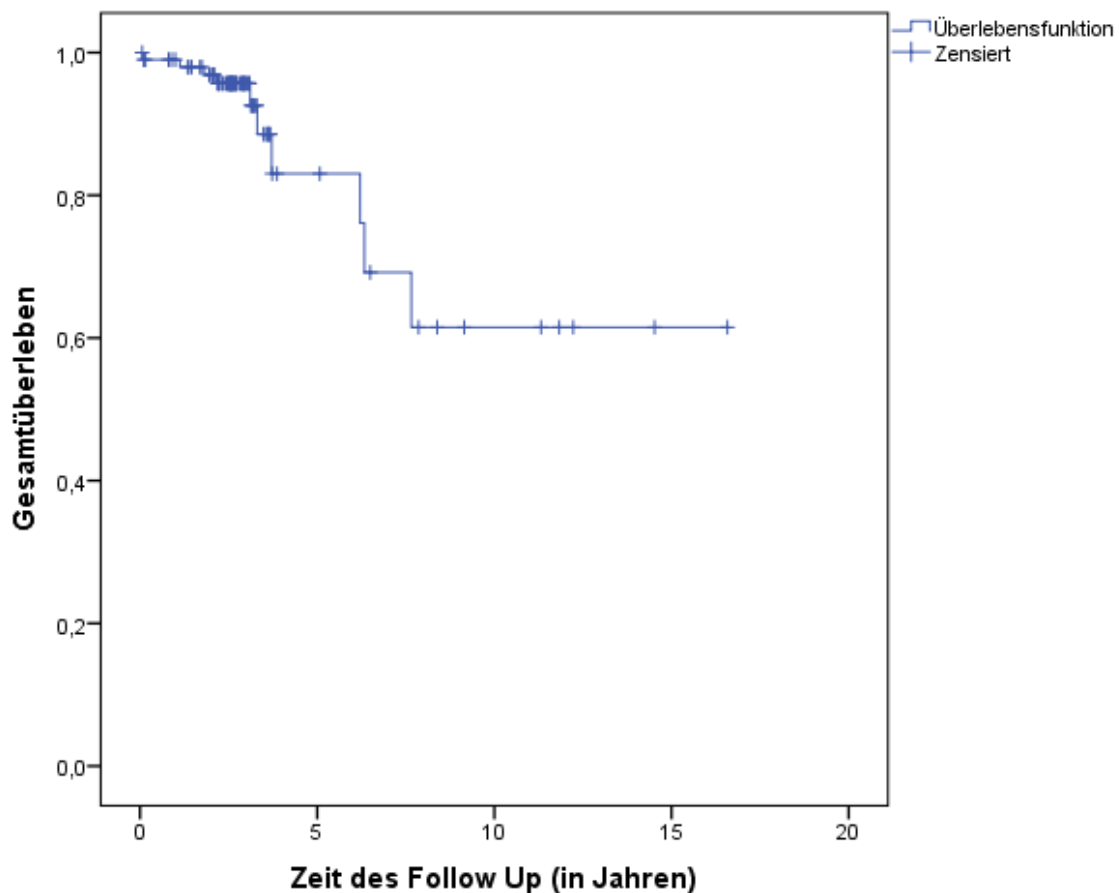
Zur Aufbereitung der Daten aus der qRT-PCR und zum Erheben des *Follow Up* wurde *Microsoft Excel* verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte dann mit *IBM SPSS Statistics 23*. Die Analysen zu Überlebenszeiten und Lokalrezidiv-freien Überlebenszeiten wurden mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven grafisch dargestellt und mit dem *Log-Rank-Test* auf Signifikanz überprüft. Bivariate Korrelationsanalysen der miRNA-Expressionslevel erfolgten mit dem *Spearman-Rho-Test*. Die Korrelation der miRNA-Expression mit tumorbezogenen und prognostischen Merkmalen erfolgte mit dem *Mann-Whitney-U-* und dem *Kruskal-Wallis-Test*. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen. Die Angabe der miRNA-Expressionswerte erfolgte in relativen Einheiten (r.E.).

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Expressionsanalyse 6 verschiedener miRNAs in Mamma-Karzinom-Gewebeproben von 102 Patientinnen, die im Zeitraum von 1998 bis 2016 aufgrund eines Mamma-Karzinoms an der Universitätsmedizin Mainz operiert wurden, vorgenommen. In der statistischen Analyse erfolgte eine deskriptive Darstellung der patienten- und tumorbezogenen Daten, die Korrelation aller miRNA-Expressionslevel untereinander, eine Analyse der miRNA-abhängigen Überlebenszeiten und die Korrelation der miRNA-Expression mit tumorbezogenen und prognostischen Merkmalen. Bei der Darstellung der Ergebnisse werden nur signifikante oder statistisch auffällige Auswertungen aufgeführt.

### 4.1 Deskriptive Statistik des Patientenkollektivs

Insgesamt wurden die Gewebeproben von 102 Patientinnen untersucht. Es wurden keine Mamma-Karzinom-Gewebeproben von männlichen Patienten in die Untersuchungen einbezogen. Das mediane Alter der Patientinnen bei Erstdiagnose des Mamma-Karzinoms lag bei 61,4 Jahren (31,7 - 91,5 Jahre). 10 Patientinnen (9,6%) verstarben während der Nachbeobachtungszeit. Der Tod trat im Median nach 3,2 Jahren (1,1 – 7,7 Jahre) ein. Die mediane Nachbeobachtungsdauer betrug 2,6 Jahre (0,1 – 16,6 Jahre), wovon eine Patientin direkt im Anschluss an die Primärtumor-OP *lost to follow up* war (Abbildung 6). Die mediane Nachbeobachtungsdauer der Nichtverstorbenen Patientinnen betrug dabei 2,7 Jahre (0,1 – 16,6 Jahre).



**Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Gesamtüberlebens im Patientenkollektiv.** Dargestellt sind die Überlebenszeitdaten von 102 Patientinnen. 10 Patientinnen verstarben in der Nachbeobachtungszeit. Jedes Todesereignis ist mit einer Stufe dargestellt. Vertikale Striche kennzeichnen rechtszensierte Daten. Die maximale Nachbeobachtungsdauer betrug 16,6 Jahre.

Ein Großteil der Primärtumoren war vom invasiv-duktalem Typ („NST“). Dabei wiesen ca. zwei Drittel der Patientinnen ein begleitendes DCIS auf. Drei Patientinnen hatten schon bei Diagnose des Primarius Fernmetastasen. Der Östrogenrezeptor-Status war bei 84,3% der Fälle positiv und 16,7% der Tumoren wiesen eine Überexpression von HER2 auf (Tabelle 5).



Tabelle 5: Deskriptive Statistik der erhobenen Merkmale der Primärtumoren.

Parameter	Ausprägung	Häufigkeit	Prozentwert
Histologie	invasiv-duktral	75	73,5
	invasiv-lobulär	13	12,7
	gemischt duktral/lobulär	2	2,0
	muzinöses Adeno-Ca	3	2,9
	metaplastisch	1	1,0
	DCIS	1	1,0
	medullär	1	1,0
	mikropapillär	3	2,9
	apokrin	1	1,0
	fehlende Angabe	2	2,0
Lokalisation	rechts unifokal	44	43,1
	links unifokal	41	40,2
	rechts multizentrisch	9	8,8
	links multizentrisch	7	6,9
	beidseits	1	1,0
begleitendes DCIS	kein DCIS	35	34,3
	DCIS	67	65,7
begleitende LIN	keine LIN	93	91,2
	LIN	9	8,8
Tumorgröße (T)	T1	46	45,1
	T2	43	42,2
	T3	12	11,8
	T4	0	0
	fehlende Angabe	1	1
Nodalstatus (N)	N0	60	58,8
	N1	25	24,5
	N2	10	9,8
	N3	5	4,9
	Nx	2	2,0
Metastasierung (M)	M0	97	95,1
	M1	3	2,9

## Ergebnisse

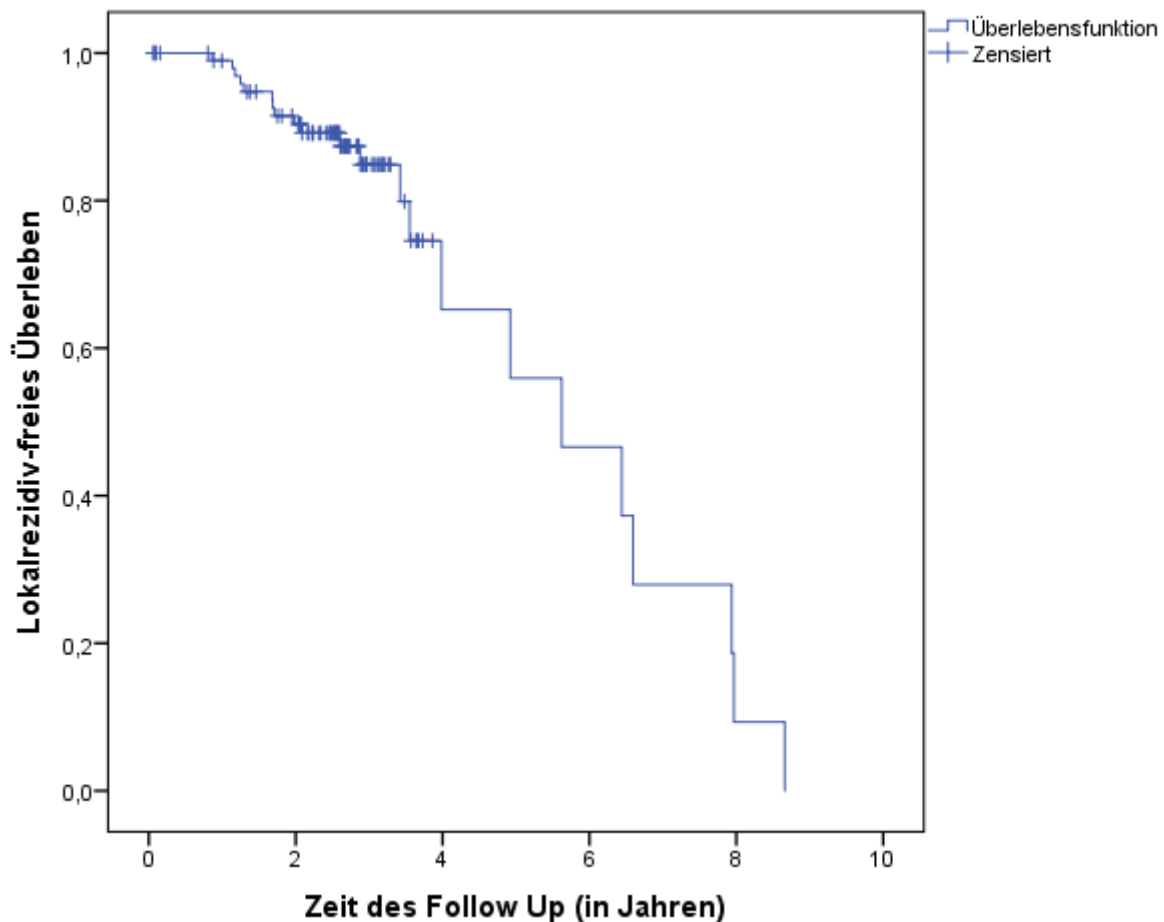
	Mx	2	2,0
Grading (G)	G1	11	10,8
	G2	48	47,1
	G3	42	41,2
	fehlende Angabe	1	1,0
Residualtumor (R)	R0	90	88,2
	R1	7	6,9
	fehlende Angabe	5	4,9
Östrogenrezeptor-Status	negativ	16	15,7
	positiv	86	84,3
Progesteronrezeptor-Status	negativ	31	30,4
	positiv	70	68,6
	fehlende Angabe	1	1,0
HER2-Status	negativ	85	83,3
	positiv	17	16,7

Vier von 102 Patientinnen (3,9%) entwickelten Fernmetastasen. Es traten bei jeweils drei Patientinnen pulmonale und hepatische Metastasen auf. Außerdem traten insgesamt je eine ossäre, kutane, zerebrale und ovariale Metastase auf. Eine Patientin hatte drei Metastasen an verschiedenen Lokalisationen (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Deskriptive Statistik der erhobenen Merkmale der Fernmetastasen.**

Parameter	Ausprägung	Häufigkeit	Prozentwert
Fernmetastasierung	keine Fernmetastase	98	96,1
	Fernmetastase	4	3,9
Lokalisation (Mehrfachnennung möglich)	pulmonal	3	
	hepatisch	3	
	ossär	1	
	kutan	1	
	zerebral	1	
	ovarial	1	

22 der 102 Patientinnen entwickelten ein Lokalrezidiv (22,6%). Die Zeit bis zum Auftreten des Lokalrezidivs betrug im Median 2,7 Jahre (0,9 – 8,7 Jahre) (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Lokalrezidiv-freien Überlebens im Patientenkollektiv.**

Analyse des Lokalrezidiv-freien Überlebens von 102 Patientinnen. Es traten 22 Ereignisse ein. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Vertikale Striche stellen rechtszensierte Daten dar. Die maximale Nachbeobachtungszeit betrug 8,7 Jahre.

Die Lokalrezidive waren vor allem Tumoren vom „nicht-spezifischen Typ“ (invasiv-duktral). Fast die Hälfte der Lokalrezidive (45,5%) wurden im Stadium T1 reseziert. 54,5% der Tumoren waren Östrogenrezeptor-positiv und 13,6% zeigten eine HER2-Überexpression (Tabelle 7).

Tabelle 7: Deskriptive Statistik der erhobenen Merkmale der Lokalrezidive.

Parameter	Ausprägung	Häufigkeit	Prozentwert
Histologie	invasiv-duktral	14	63,6
	invasiv-lobulär	1	4,5
	muzinöses Adeno-Ca	1	4,5
	Adenokarzinom	2	9,1
	metaplastisch	2	9,1
	fehlende Angabe	2	9,1
Lokalisation	linke Mamma	9	40,9
	rechte Mamma	6	27,3
	linke Thoraxwand	3	13,6
	rechte Thoraxwand	2	9,1
	linke Axilla	2	9,1
	rechte Axilla	0	0
Tumorgröße (T)	T0, Tis	1	4,5
	T1	10	45,5
	T2	6	27,3
	T3	0	0
	T4	1	4,5
	fehlende Angabe	4	18,2
Nodalstatus (N)	N0	6	27,3
	N1	2	9,1
	N2	2	9,1
	N3	1	4,5
	Nx	7	31,8
	fehlende Angabe	4	18,2
Metastasierung (M)	M0	14	63,6
	M1	1	4,5
	fehlende Angabe	7	31,8
Grading (G)	G1	0	0
	G2	5	22,7
	G3	13	59,1
	fehlende Angabe	4	18,2

## Ergebnisse

Residualtumor (R)	R0	16	72,7
	R1	2	9,1
	fehlende Angabe	4	18,2
Östrogenrezeptor-Status	negativ	10	45,5
	positiv	12	54,5
Progesteronrezeptor-Status	negativ	13	59,1
	positiv	9	40,9
HER2-Status	negativ	19	86,4
	positiv	3	13,6

Bei allen 102 Patientinnen wurde eine operative Therapie des Primärtumors durchgeführt. Dabei erhielten 74 Patientinnen (72,5%) eine Brust-erhaltende Therapie und 28 Patientinnen (27,5%) eine Mastektomie. Bei 34 Patientinnen (33,3%) musste eine Nachresektion vorgenommen werden. Des Weiteren erfolgten bei den meisten Patientinnen eine Systemtherapie und eine postoperative Bestrahlung (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Systemtherapie und Bestrahlung im Rahmen der Primärtumor-Diagnose.**

Therapieart	Ausprägung	Häufigkeit	Prozentwert
neoadjuvante Chemotherapie	erhalten	1	1,0
	nicht erhalten	101	99,0
adjuvante Chemotherapie	erhalten	53	53,0
	nicht erhalten	49	48,0
Bestrahlung	erhalten	79	77,5
	nicht erhalten	23	22,5
endokrine Therapie	erhalten	79	77,5
	nicht erhalten	23	22,5
Trastuzumab-Therapie	erhalten	12	11,8
	nicht erhalten	90	88,2

Bei allen 22 Patientinnen, die ein Lokalrezidiv entwickelten, wurde eine operative Therapie durchgeführt. 11 Patientinnen (50%) erhielten eine Mastektomie, 8

Patientinnen (36,7%) eine Tumorexzision (z.B. nach bereits stattgefundener Mastektomie beim Primärtumor). Bei den restlichen Patientinnen wurde eine Brust-erhaltende Therapie durchgeführt. In Abhängigkeit der jeweiligen prognostischen Faktoren und bereits durchgeführter Therapieverfahren wurden im Anschluss an die OP eine Systemtherapie und/oder eine Bestrahlung eingeleitet (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Systemtherapie und Bestrahlung im Rahmen der Lokalrezidiv-Diagnose.**

Therapieart	Ausprägung	Häufigkeit	Prozentwert
adjuvante Chemotherapie	erhalten	10	45,5
	nicht erhalten	12	54,5
Bestrahlung	erhalten	9	40,9
	nicht erhalten	13	59,1
endokrine Therapie	erhalten	11	50,0
	nicht erhalten	11	50,0
Trastuzumab-Therapie	erhalten	3	13,6
	nicht erhalten	19	86,4

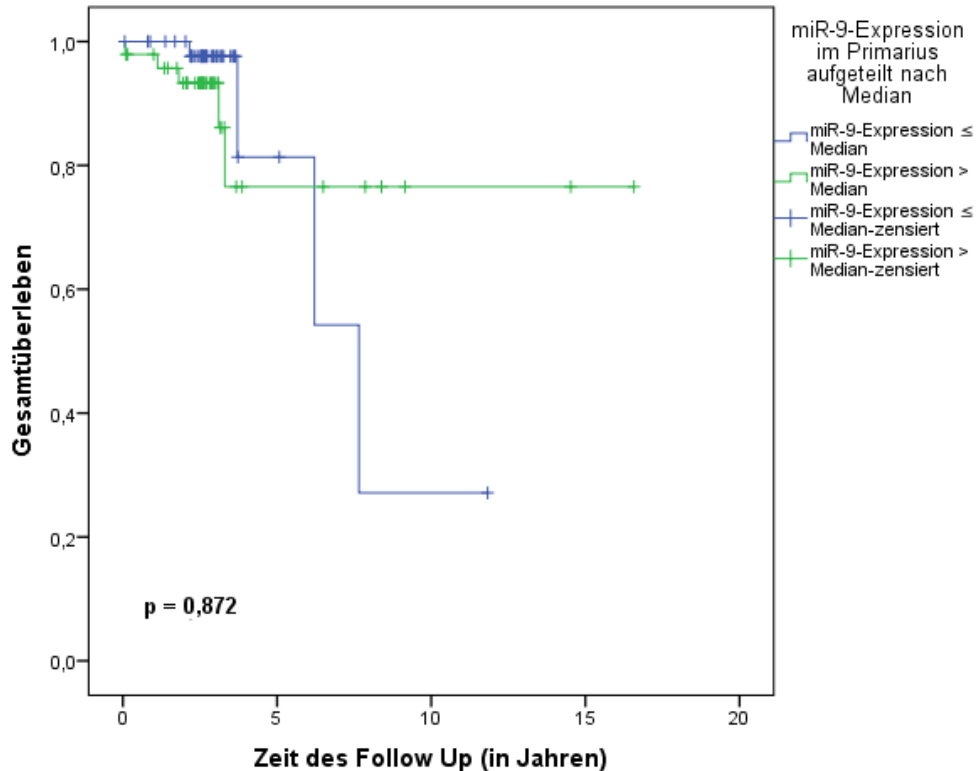
## 4.2 Einfluss der miRNA-Expression auf das Überleben

Bei den Kaplan-Meier-Analysen wurden alle Patientinnen eingeschlossen, bei denen die miRNA-Expression in den Primärtumoren untersucht wurde (n=96). Für die Analysen wurde das Patientenkollektiv anhand der miRNA-Expression in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) unterteilt und einander gegenübergestellt. Signifikanzen bezüglich möglicher Überlebenszeitunterschiede wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen.

### 4.2.1 Einfluss der miRNA-Expression auf das Gesamtüberleben

Zuerst wurde eine Kaplan-Meier-Analyse hinsichtlich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit der miRNA-9-Expression durchgeführt. In einer leichten Tendenz zeigte sich ein geringer Überlebensvorteil für die Patientinnen mit hoher Expression an

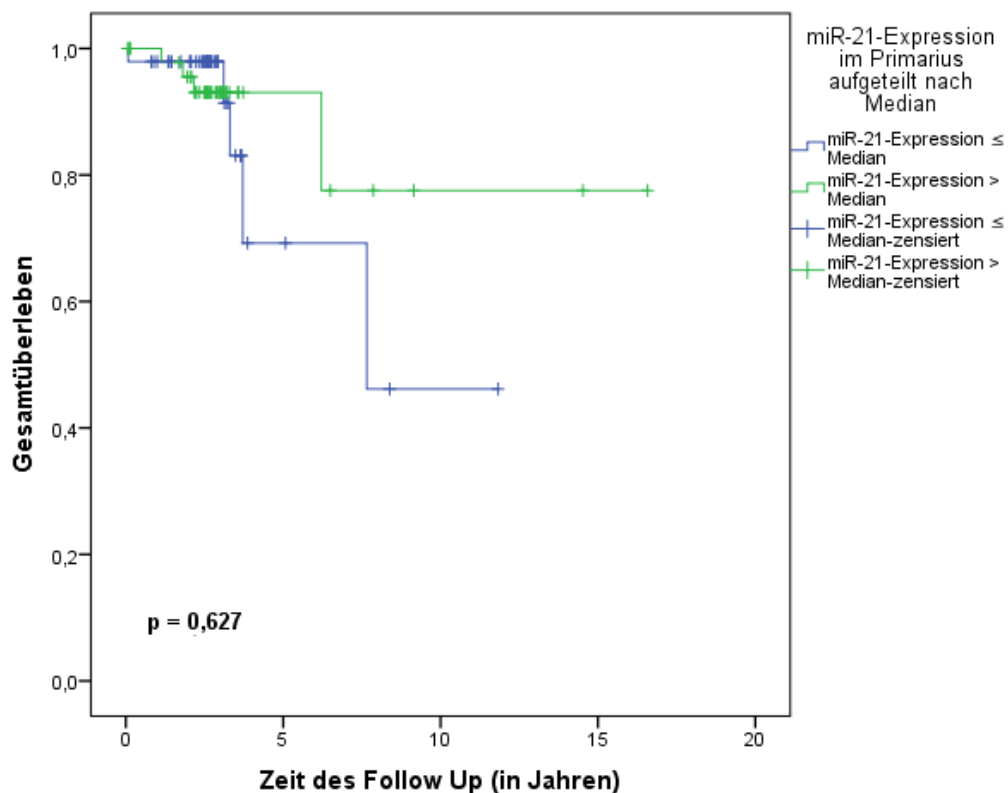
miRNA-9. Dieser Unterschied beruhte jedoch nur auf 2 Todesfällen und ist nicht signifikant ( $p = 0,872$ ) (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-9-Expression und Gesamtüberleben**

Dargestellt ist die Überlebenszeitanalyse des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit der miRNA-9-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) aufgeteilt. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

Bei der Kaplan-Meier-Analyse zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit des miRNA-21-Expressionslevels zeigte sich eine leichte Tendenz, dass Patienten mit einer hohen miRNA-21-Expression langfristig einen Überlebensvorteil gegenüber den Patientinnen mit geringer miRNA-21-Expression haben. Der Unterschied dieser zwei Gruppen ist jedoch ebenfalls nicht signifikant ( $p = 0,627$ ) (Abbildung 9).

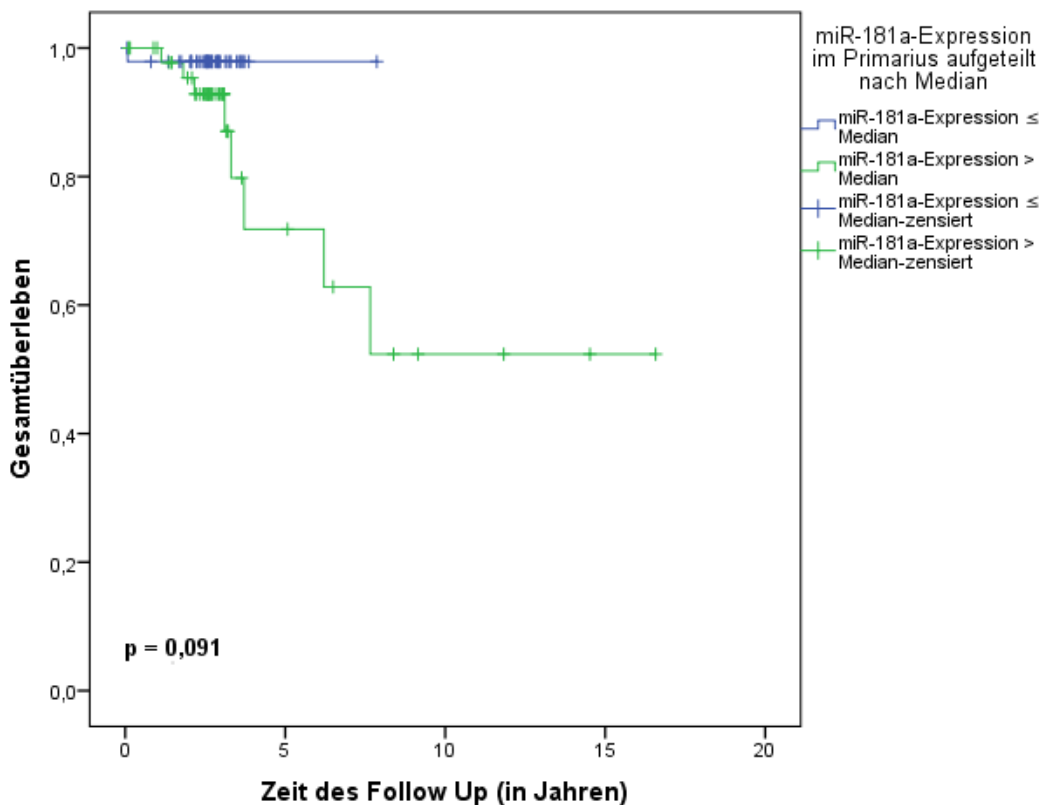


**Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-21-Expression und Gesamtüberleben**

Dargestellt ist die Überlebenszeitanalyse des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit der miRNA-21-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) aufgeteilt. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

Des Weiteren wurde die Überlebenszeit hinsichtlich der miRNA-181a-Expression analysiert. In der Gruppe der Patientinnen mit miRNA-181a-Expression  $\leq$  Median verstarb nur eine von insgesamt 48 Patientinnen (2,1%). Demgegenüber stand die Gruppe mit Expression  $>$  Median mit 8 Todesereignissen (16,7%). Langfristig zeigte sich die Tendenz, dass die Patientinnen mit geringer miRNA-181a-Expression einen Vorteil bezüglich des Überlebens hatten. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p = 0,091$ ) (Abbildung 10).

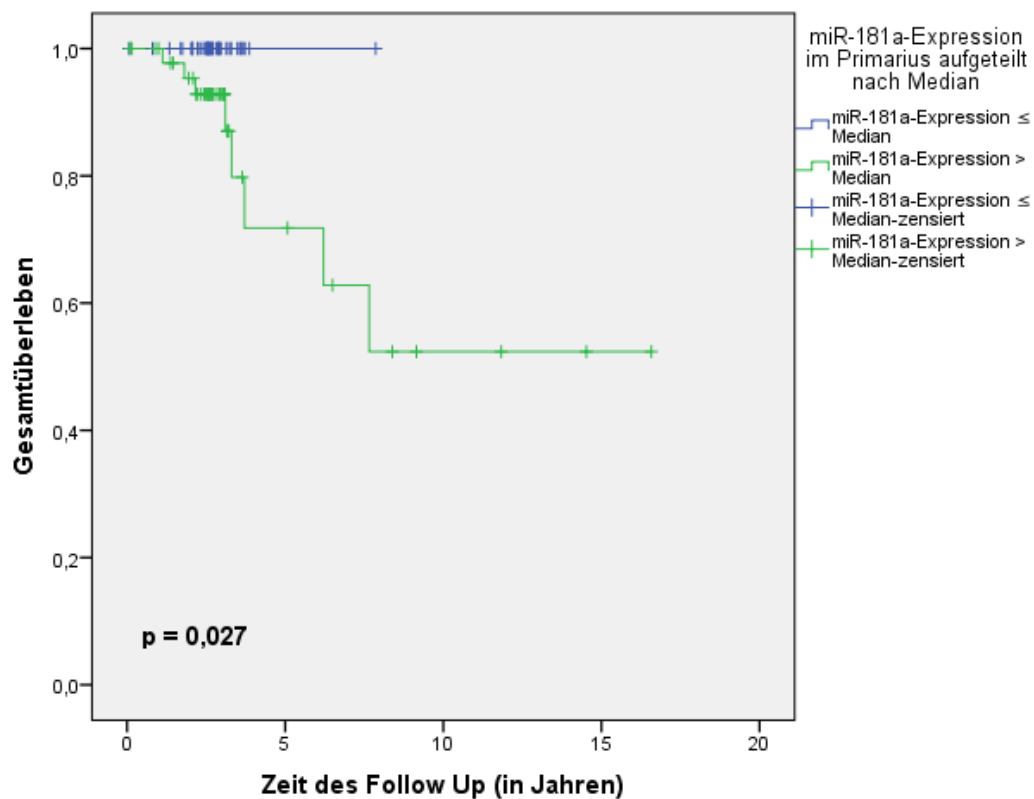




**Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-181a-Expression und Gesamtüberleben**

Dargestellt sind die Überlebenszeitdaten des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit der miRNA-181a-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) unterteilt. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

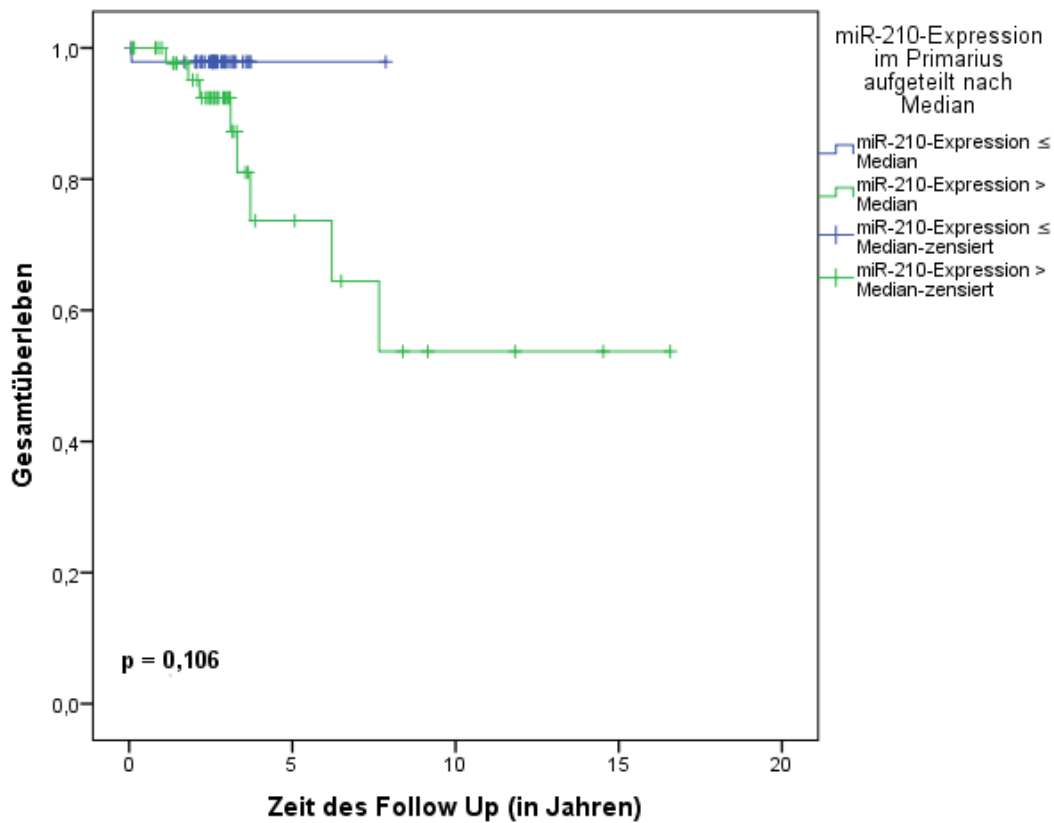
Bei genauerer Betrachtung der vorherigen Überlebenszeitanalyse (Abbildung 10) fällt jedoch auf, dass die einzige verstorbene Patientin der Gruppe mit miRNA-181a-Expression  $\leq$  Median besonders früh verstorben ist. Die Zeitspanne von der Erstdiagnose des Primarius bis zum Todeszeitpunkt lag hier bei weniger als einem Monat, während die Zeitspanne bis zum Versterben bei allen anderen verstorbenen Patientinnen des Kollektivs mindestens 1 Jahr betrug. Bei einer erneuten, modifizierten Analyse des Gesamtüberlebens im Zusammenhang mit der miRNA-181a-Expression unter Nicht-Berücksichtigung der besonders früh verstorbenen Patientin, zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil einer miRNA-181a-Expression  $\leq$  Median ( $p = 0,027$ ) (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Modifizierte Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-181a-Expression und Gesamtüberleben**

Dargestellt sind die modifizierten Überlebenszeitdaten des Patientenkollektivs ohne Berücksichtigung der besonders früh verstorbenen Patientin in Abhängigkeit der miRNA-181a-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) unterteilt. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

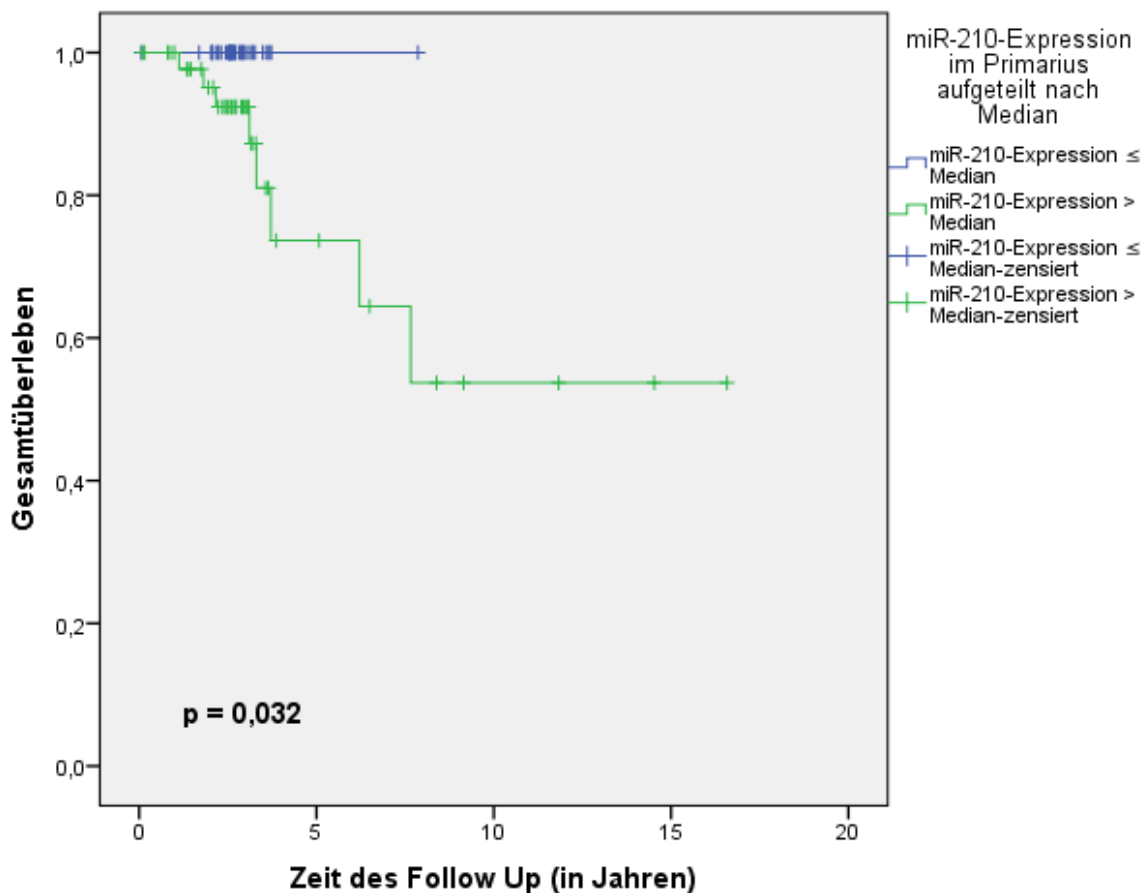
Anschließend wurde eine Kaplan-Meier-Analyse zum Gesamtüberleben in Abhängigkeit der miRNA-210-Expression vorgenommen. Trotz fehlenden Nachweises eines signifikanten Unterschieds ( $p = 0,106$ ) ist eine Tendenz ersichtlich. In der Gruppe mit geringer miRNA-210-Expression (Expression  $\leq$  Median) traten langfristig gesehen weniger Todesfälle ein als in der Gruppe mit hoher miRNA-210-Expression (1 Todesfall versus 8 Todesfälle) (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-210-Expression und Gesamtüberleben**

Dargestellt sind die Überlebenszeitdaten des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit der miRNA-210-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) unterteilt. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

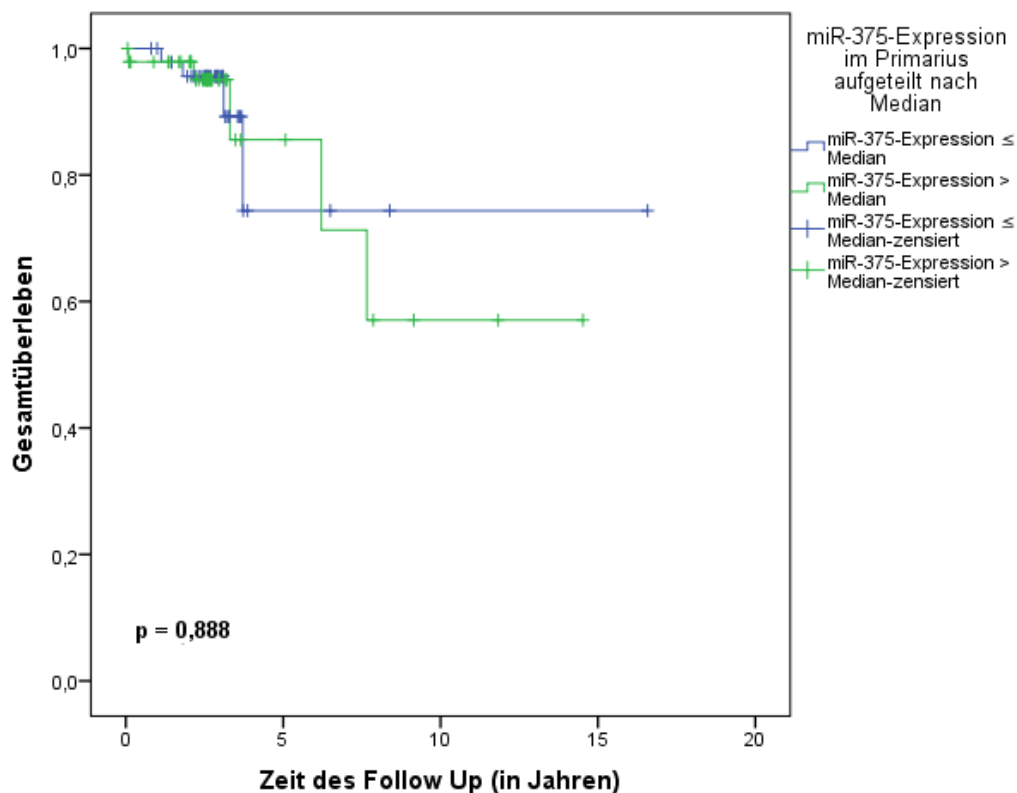
Aufgrund der leichten Tendenz bezüglich eines Überlebensvorteils, wurde auch bei dieser Überlebenszeitanalyse eine Modifizierung des Patientenkollektivs unter Nicht-Berücksichtigung der vorher beschriebenen besonders früh verstorbenen Patientin vorgenommen. Hier zeigte sich ebenfalls in der modifizierten Betrachtung ein Überlebensvorteil der Gruppe mit miRNA-210-Expression  $\leq$  Median ( $p = 0,032$ ) (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Modifizierte Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-210-Expression und Gesamtüberleben**

Dargestellt sind die modifizierten Überlebenszeitdaten des Patientenkollektivs ohne Berücksichtigung der besonders früh verstorbenen Patientin in Abhängigkeit der miRNA-210-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) unterteilt. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

Die Überlebenszeitanalyse bezüglich des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit der miRNA-375-Expression zeigte einen geringen Vorteil des langfristigen Überlebens bei einer niedrigen miRNA-375-Expression. In beiden Gruppen traten etwa gleich viele Todesfälle auf (4 Todesfälle bei Expression  $\leq$  Median versus 5 Todesfälle bei Expression  $>$  Median). Der Unterschied ist sehr gering und statistisch nicht signifikant ( $p = 0,888$ ) (Abbildung 14).

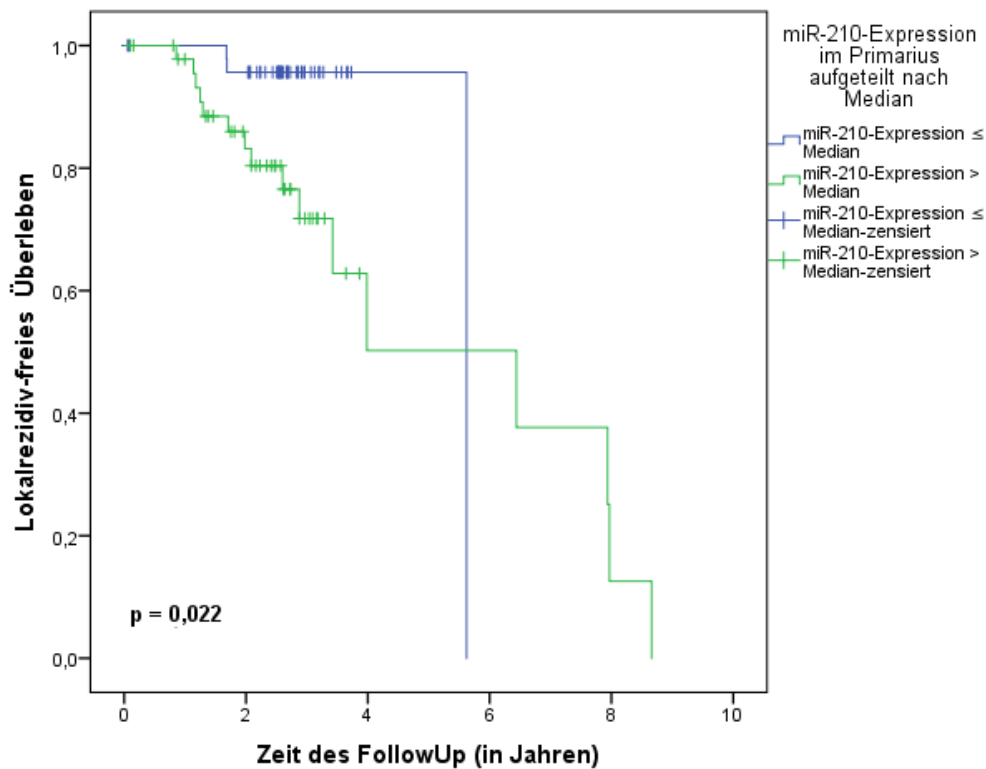


**Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-375-Expression und Gesamtüberleben**

Dargestellt sind die Überlebenszeitdaten des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit der miRNA-375-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) unterteilt. Die Signifikanz wurde mit einem Log-Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

#### 4.2.2 Einfluss der miRNA-Expression auf das Lokalrezidiv-freie Überleben

Die Analyse der Überlebenszeitdaten zeigte einen signifikanten Unterschied des Lokalrezidiv-freien Überlebens in Abhängigkeit der Expression ausschließlich bei miRNA-210 ( $p = 0,022$ ). In der Gruppe mit miRNA-210-Expression unterhalb des Medians ( $n=48$ ) traten lediglich drei Fälle von Lokalrezidiven (6,3%) ein, wohingegen in der Gruppe mit hoher miRNA-210-Expression ( $n=48$ ) 16 Lokalrezidive (33,3%) beobachtet wurden (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-210-Expression und Lokalrezidiv-freiem Überleben**

Dargestellt sind die Lokalrezidiv-freien Überlebenszeitdaten des gesamten Patientenkollektivs in Abhängigkeit der miRNA-210-Expression. Das Kollektiv wurde in zwei Gruppen (Expression  $\leq$  Median versus Expression  $>$  Median) unterteilt. Die Signifikanz wurde mit einem-Log Rank-Test ermittelt und bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Ereignisse sind durch eine Stufe dargestellt. Rechtszensierten Daten werden durch vertikale Striche dargestellt.

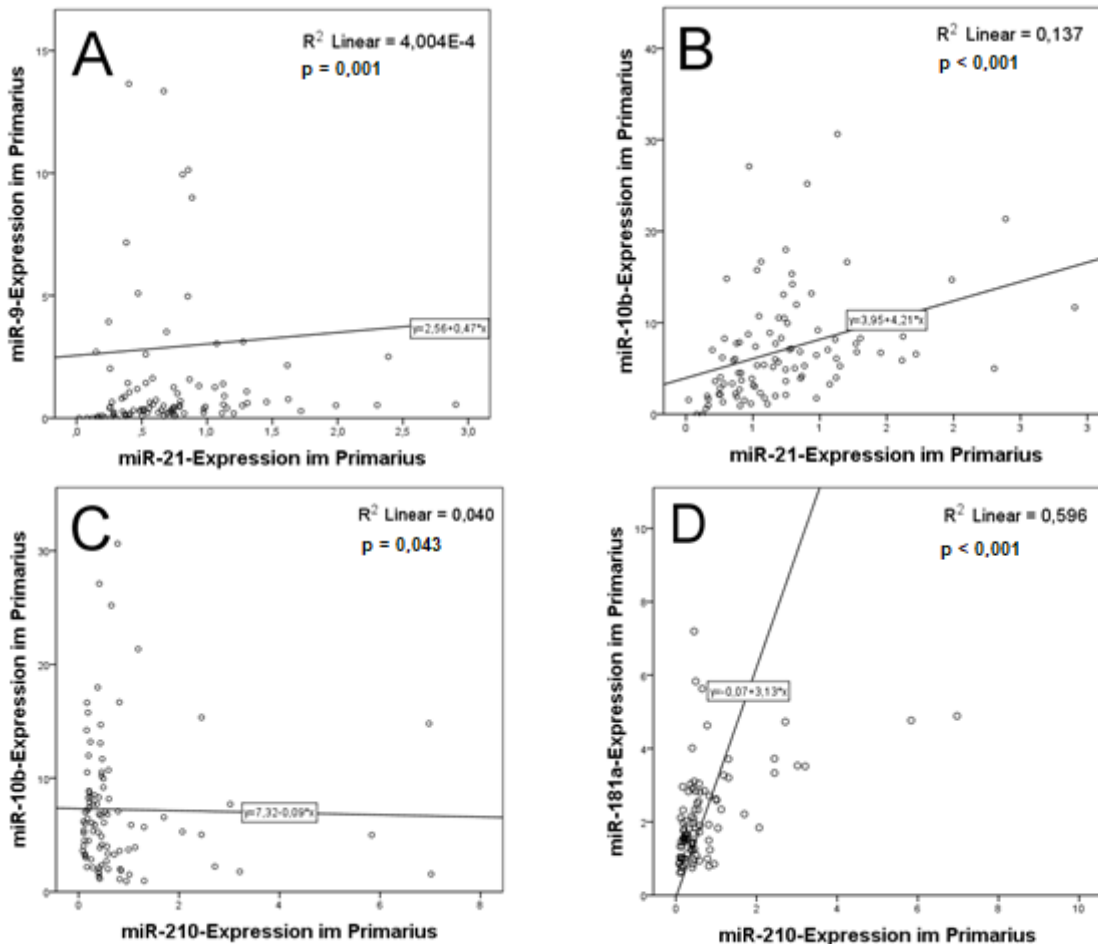
### 4.3 Korrelation der miRNA-Expressionslevel

Mit dem *Spearman-Rho-Test* wurde untersucht, ob Zusammenhänge der miRNA-Expressionen untereinander in den verschiedenen Gewebetypen bestehen. Diese Korrelationsanalysen wurden innerhalb der Gewebetypen, aber auch Gewebeübergreifend vorgenommen. Eine Signifikanz wurde bei einem  $p < 0,05$  angenommen.

#### 4.3.1 Gewebe-gebundene Korrelation der miRNA-Expressionslevel

Im Primärtumorgewebe zeigte sich ein positiver Zusammenhang bei der Expression von miRNA-9 und miRNA-21 ( $r = 0,353$ ,  $R^2 = 0,0004$ ,  $p = 0,001$ ), bei der Expression von miRNA-10b und miRNA-21 ( $r = 0,510$ ,  $R^2 = 0,137$ ,  $p < 0,001$ ) und bei der

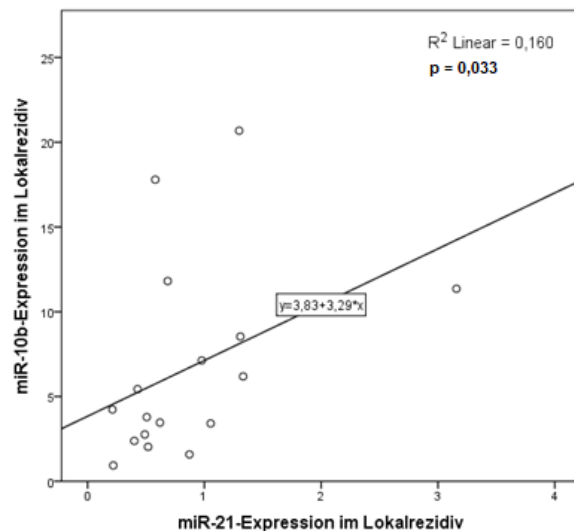
Expression von miRNA-181a und miRNA-210 ( $r = 0,603$ ,  $R^2 = 0,596$ ,  $p < 0,001$ ). Demgegenüber stand eine negative Korrelation der Expression von miRNA-10b und miRNA-210 ( $r = -0,207$ ,  $R^2 = 0,040$ ,  $p = 0,043$ ) (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Korrelationsanalyse der miRNAs im Primarius.**

Dargestellt sind Korrelationsanalysen der miRNAs im Primarius mittels Spearman-Rho-Test. Positive Zusammenhänge zeigten sich bei der Untersuchung der miRNA-9- und miRNA-21-Expression, der miRNA-10b- und miRNA-21-Expression und der miRNA-181a- und miRNA-210-Expression. Ein negativer Zusammenhang bestand bei der Korrelation der Expressionslevel von miRNA-10b und miRNA-210. Extremwerte werden nicht dargestellt.

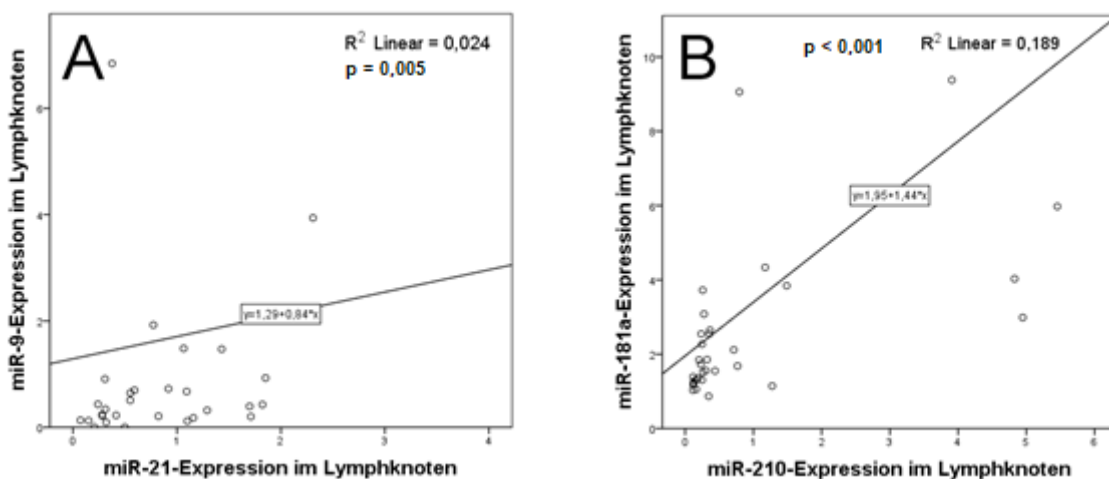
Bei der Betrachtung der miRNA-Expression in den Lokalrezidiv-Gewebeproben ( $n = 17$ ) zeigte sich ein signifikanter positiver Zusammenhang der miRNA-10b- und miRNA-21-Expression ( $r = 0,520$ ,  $R^2 = 0,160$ ,  $p = 0,033$ ) (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Korrelationsanalyse der miRNAs im Lokalrezidiv.**

Dargestellt ist die Korrelationsanalyse der Expressionslevel von miRNA-10b und miRNA-21 im Lokalrezidiv mittels Spearman-Rho-Test. Es besteht ein positiver Zusammenhang ( $r = 0,520$ ,  $R^2 = 0,160$ ,  $p = 0,033$ ). Extremwerte werden nicht dargestellt.

Anschließend wurde noch die miRNA-Expression in den Lymphknoten-Gewebeproben auf Korrelationen geprüft. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl miRNA-9 und miRNA-21 ( $r = 0,476$ ,  $R^2 = 0,024$ ,  $p = 0,005$ ) als auch miRNA-181a und miRNA-210 ( $r = 0,696$ ,  $R^2 = 0,189$ ,  $p < 0,001$ ) im Lymphknotengewebe positiv korrelieren (Abbildung 18).



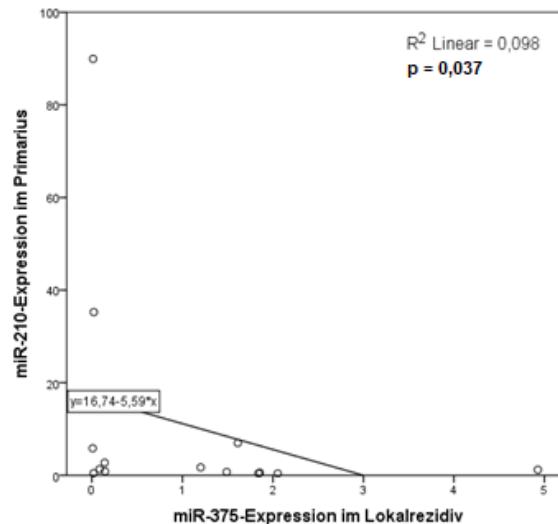
**Abbildung 18: Korrelationsanalyse der miRNAs im Lymphknoten.**

Dargestellt sind die Korrelationsanalysen der miRNAs im Lymphknotengewebe mittels Spearman-Rho-Test. Es korrelieren sowohl miRNA-9 und miRNA-21, als auch miRNA-181a und miRNA-210 positiv miteinander. Extremwerte werden nicht dargestellt.



### 4.3.2 Gewebe-übergreifende Korrelation der miRNA-Expressionslevel

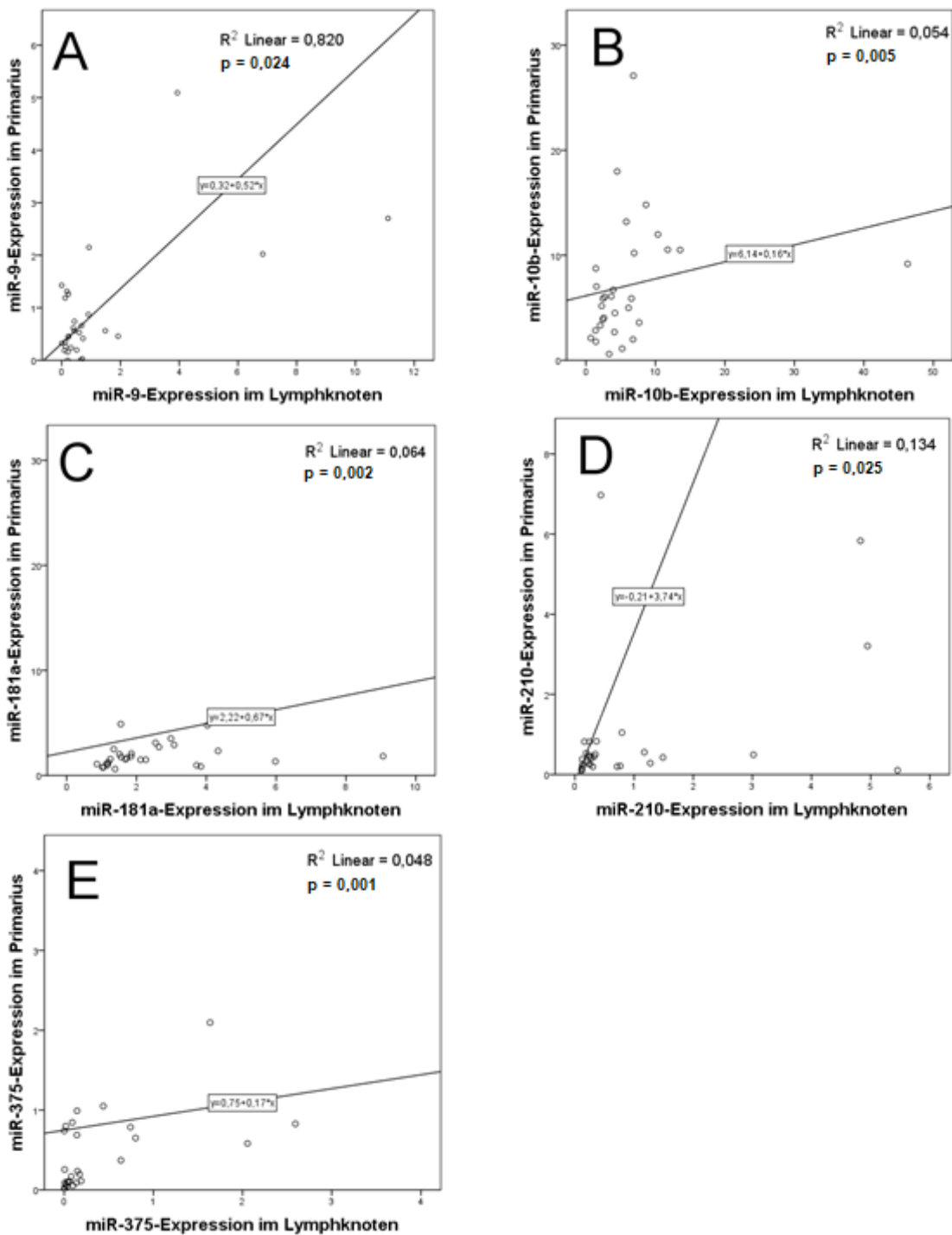
Bei der Gewebe-übergreifenden Korrelationsanalyse zeigte sich ein negativer Zusammenhang der Expression von miRNA-210 im Primarius und der Expression von miRNA-375 im Lokalrezidiv ( $r = -0,560$ ,  $R^2 = 0,098$ ,  $p = 0,037$ ) (Abbildung 19).



**Abbildung 19: Gewebe-übergreifende Korrelationsanalyse der miRNA-Expression im Primarius und im Lokalrezidiv.**

Dargestellt ist der Zusammenhang von miRNA-210-Expression im Primarius und miRNA-375-Expression im Lokalrezidiv mittels Spearman-Rho-Test. Die miRNAs korrelieren negativ miteinander ( $r = -0,560$ ,  $R^2 = 0,098$ ,  $p = 0,037$ ). Extremwerte werden nicht dargestellt.

Anschließend wurde die Expression korrespondierender miRNAs in Primärtumor- und Lymphknoten-Gewebe korreliert ( $n = 30$ ). Hier zeigte sich bei allen untersuchten miRNAs, mit Ausnahme von miRNA-21, ein signifikanter positiver Zusammenhang. Dabei ergaben sich folgende Korrelationen: miRNA-9-Expression im Primarius und Lymphknoten ( $r = 0,410$ ,  $R^2 = 0,820$ ,  $p = 0,024$ ), miRNA-10b-Expression im Primarius und Lymphknoten ( $r = 0,497$ ,  $R^2 = 0,054$ ,  $p = 0,005$ ), miRNA-181a im Primarius und Lymphknoten ( $r = 0,540$ ,  $R^2 = 0,064$ ,  $p = 0,002$ ), miRNA-210 in Primarius und Lymphknoten ( $r = 0,408$ ,  $R^2 = 0,134$ ,  $p = 0,025$ ), miRNA-375 in Primarius und Lymphknoten ( $r = 0,584$ ,  $R^2 = 0,048$ ,  $p = 0,001$ ) (Abbildung 20).

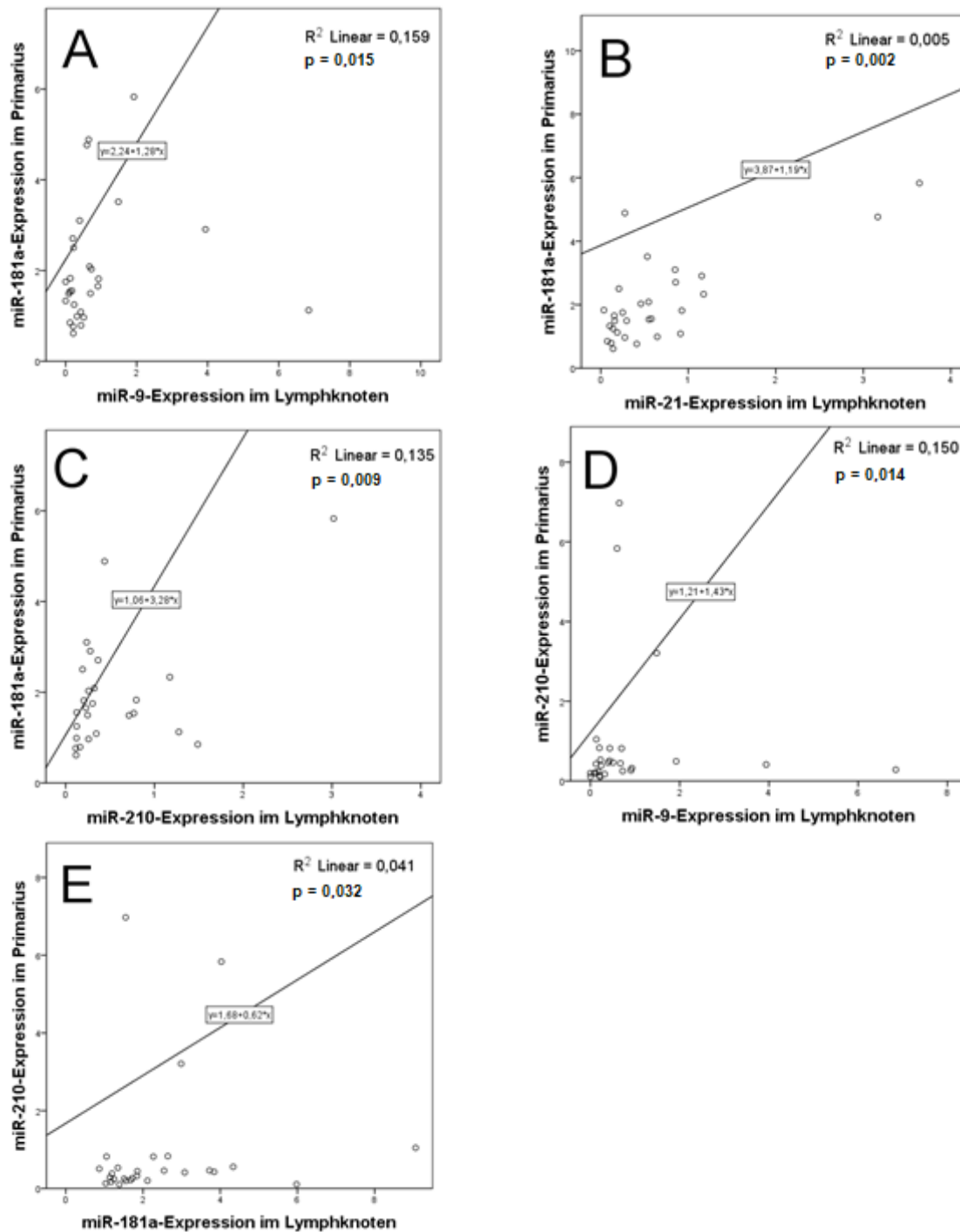


**Abbildung 20: Gewebe-übergreifende Korrelationsanalyse der miRNA-Expression korrespondierender miRNAs im Primarius und im Lymphknoten.**

Dargestellt sind die miRNAs-9, -10b, -181a, -210 und -375 jeweils im Primarius im Zusammenhang mit ihren korrespondierenden miRNAs im Lymphknoten. Alle dargestellten miRNAs korrelieren positiv miteinander. Extremwerte werden nicht dargestellt.

Außerdem zeigten sich bei der Betrachtung von Primarius- und Lymphknoten-Gewebe ebenfalls positive Zusammenhänge der miRNA-181a im Primarius mit folgenden im

Lymphknoten exprimierten miRNAs: miRNA-9 ( $r = 0,439$ ,  $R^2 = 0,159$ ,  $p = 0,015$ ), miRNA-21 ( $r = 0,540$ ,  $R^2 = 0,005$ ,  $p = 0,002$ ) und miRNA-210 ( $r = 0,468$ ,  $R^2 = 0,135$ ,  $p = 0,009$ ). Ebenso konnte ein positiver Zusammenhang von miRNA-210 im Primärtumor mit miRNA-9 ( $r = 0,445$ ,  $R^2 = 0,150$ ,  $p = 0,014$ ) und miRNA-181a ( $r = 0,393$ ,  $R^2 = 0,041$ ,  $p = 0,032$ ) (jeweils im Lymphknoten) gezeigt werden (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Gewebe-übergreifende Korrelationsanalyse der miRNA-Expression im Primarius und im Lymphknoten.**

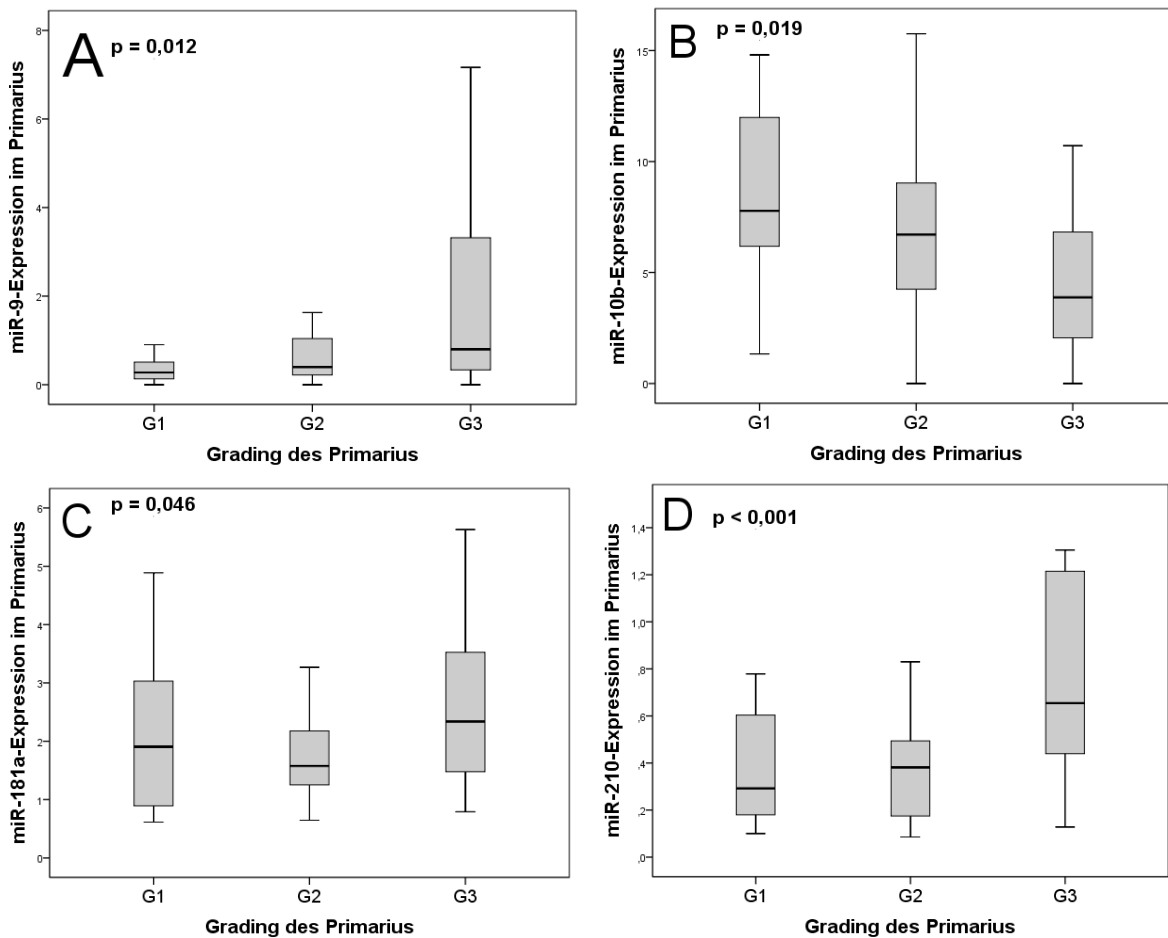
Die miRNA-181a-Expression im Primarius korreliert positiv mit der miRNA-9-Expression, der miRNA-21-Expression und der miRNA-210-Expression im Lymphknoten (Grafik A-C). Ein positiver Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen der miRNA-210-Expression im Primärtumor und der miRNA-9- sowie der miRNA-181a-Expression im Lymphknoten (Grafik D und E). Extremwerte werden nicht dargestellt.

#### **4.4 Korrelation der miRNA-Expression mit Tumormerkmalen**

Die folgenden Analysen untersuchen die miRNA-Expression in den verschiedenen Geweben in Abhängigkeit der Tumormerkmale (z.B. TNM-Status, *Grading* oder Östrogenrezeptorstatus) im Primarius und Lokalrezidiv. Dabei wurden *Mann-Whitney-U-* und *Kruskal-Wallis-Tests* angewendet. Eine Signifikanz wurde bei einem  $p < 0,05$  angenommen. Es wurden nur statistisch signifikante Ergebnisse im folgenden Abschnitt aufgeführt.

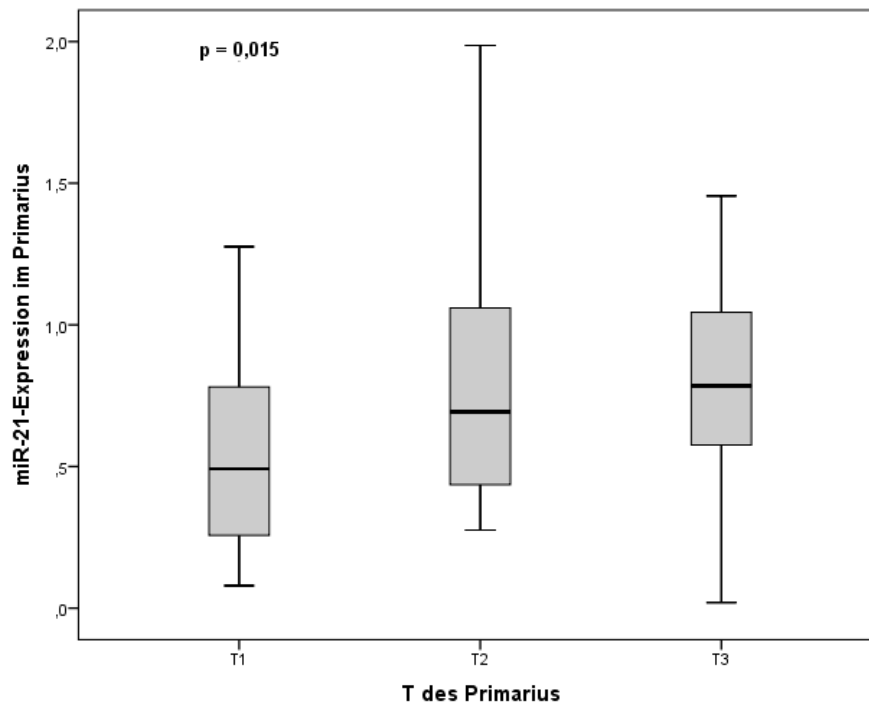
##### **4.4.1 Korrelation der miRNA-Expression des Primarius mit Merkmalen des Primarius**

Die miRNA-Expression in den Primärtumoren von 96 Patientinnen wurde mit den Merkmalen der Primärtumoren korreliert. In dieser Gruppe hatten 10 Patientinnen ein G1-Stadium (10,4%), 47 Patientinnen ein G2-Stadium (49,0%) und 39 Patientinnen ein G3-Stadium (40,6%). Die miRNA-9-Expression nahm mit steigendem G-Stadium zu (G1-Median = 0,38 versus G3-Median = 0,80), wohingegen die miRNA-10b-Expression mit höherem G-Stadium abnahm (G1-Median = 7,78 versus G3-Median = 3,88). Die miRNA-181a-Expression war im G2-Stadium am niedrigsten mit einem Median von 1,58 im Vergleich zum G1-Stadium mit einem Median von 1,91 und zum G3-Stadium mit 2,34. MiRNA-210 zeigt wiederum eine steigende Tendenz mit steigendem G-Stadium (G1-Median = 0,29 versus G3-Stadium = 0,65) (Abbildung 22).



**Abbildung 22: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit des G-Stadiums des Primarius.** Die Korrelation erfolgt mit einem Kruskal-Wallis-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-9-, miRNA-10b-, miRNA-181a- und miRNA-210-Expression im Primarius in Abhängigkeit des G-Stadiums des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

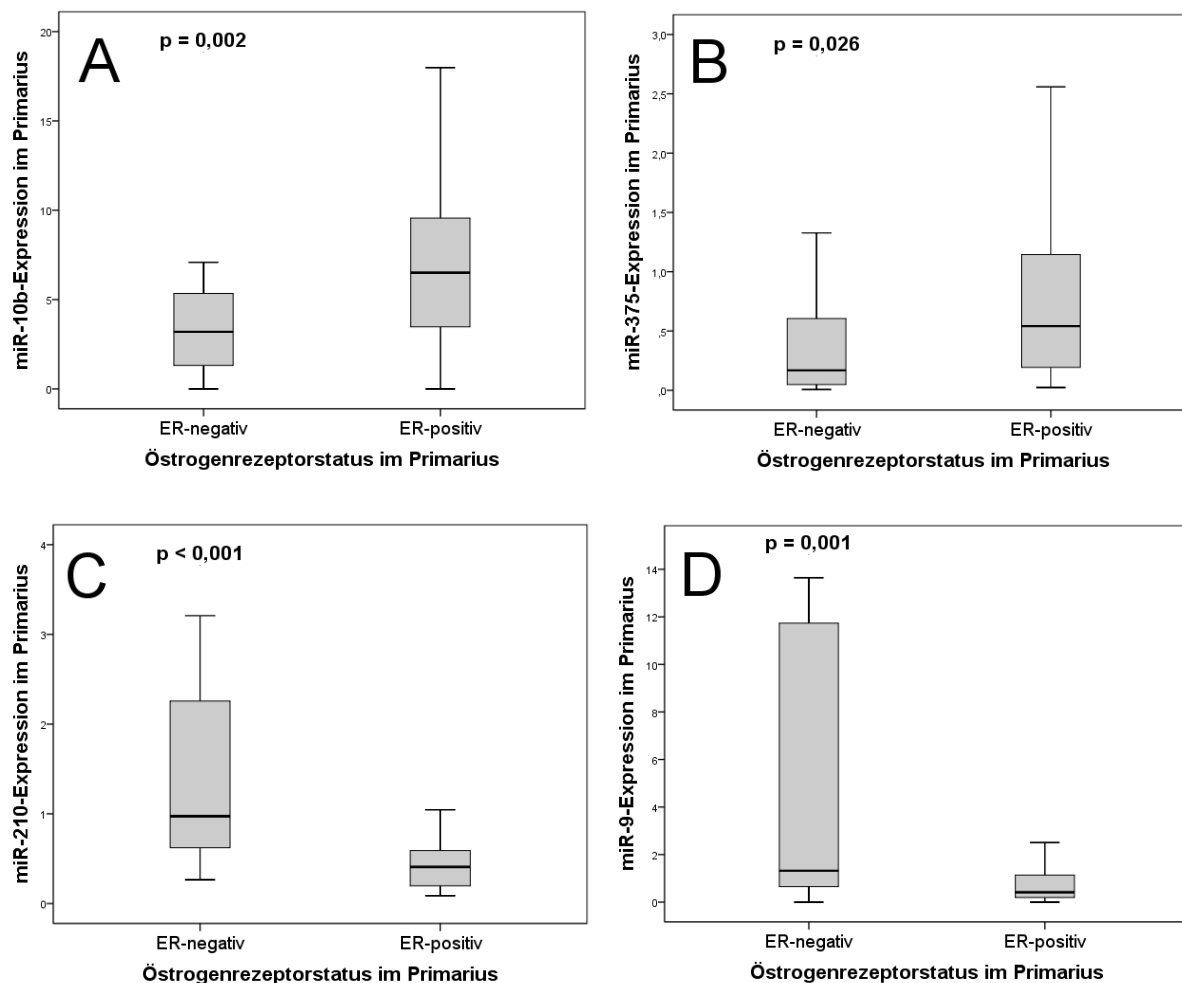
Von den 96 Patientinnen waren bei der Erstdiagnose des Primärtumors 43 Frauen im Stadium T1 (44,8%), 41 im Stadium T2 (42,7%) und 12 im Stadium T3 (12,5%). Keine Patientin des untersuchten Kollektivs wies ein T4-Stadium auf. Die miRNA-21-Expression stand in einem signifikanten Zusammenhang mit dem T-Stadium ( $p = 0,015$ ). Mit steigendem T-Stadium nahm die mediane miRNA-21-Expression zu (T1-Median = 0,49, T2-Median = 0,69, T3-Median = 0,78) (Abbildung 23).



**Abbildung 23: MiRNA-21-Expression im Primarius in Abhängigkeit des T-Stadiums des Primarius.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Kruskal-Wallis-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-21-Expression im Primarius in Abhängigkeit des T-Stadiums des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

Im untersuchten Kollektiv wiesen 16 Patientinnen (16,7%) einen Östrogenrezeptor-negativen Primärtumor und 80 Patientinnen (83,3%) einen Östrogenrezeptor-positiven Primärtumor auf. Zwei miRNAs waren bei Östrogenrezeptor-positiven (ER-positiv) Primärtumoren signifikant höher exprimiert: miRNA-10b (ER-negativ-Median = 3,19 versus ER-positiv-Median = 6,51,  $p = 0,002$ ) und miRNA-375 (ER-negativ-Median = 0,17 versus ER-positiv-Median = 0,54,  $p = 0,026$ ). Dem gegenüber standen zwei miRNAs, die bei Östrogenrezeptor-negativen Primärtumoren signifikant höher exprimiert waren: miRNA-210 (ER-negativ-Median = 0,97 versus ER-positiv-Median = 0,41,  $p < 0,001$ ) und miRNA-9 (ER-negativ-Median = 1,32 versus ER-positiv-Median = 0,41,  $p = 0,001$ ) (Abbildung 24).



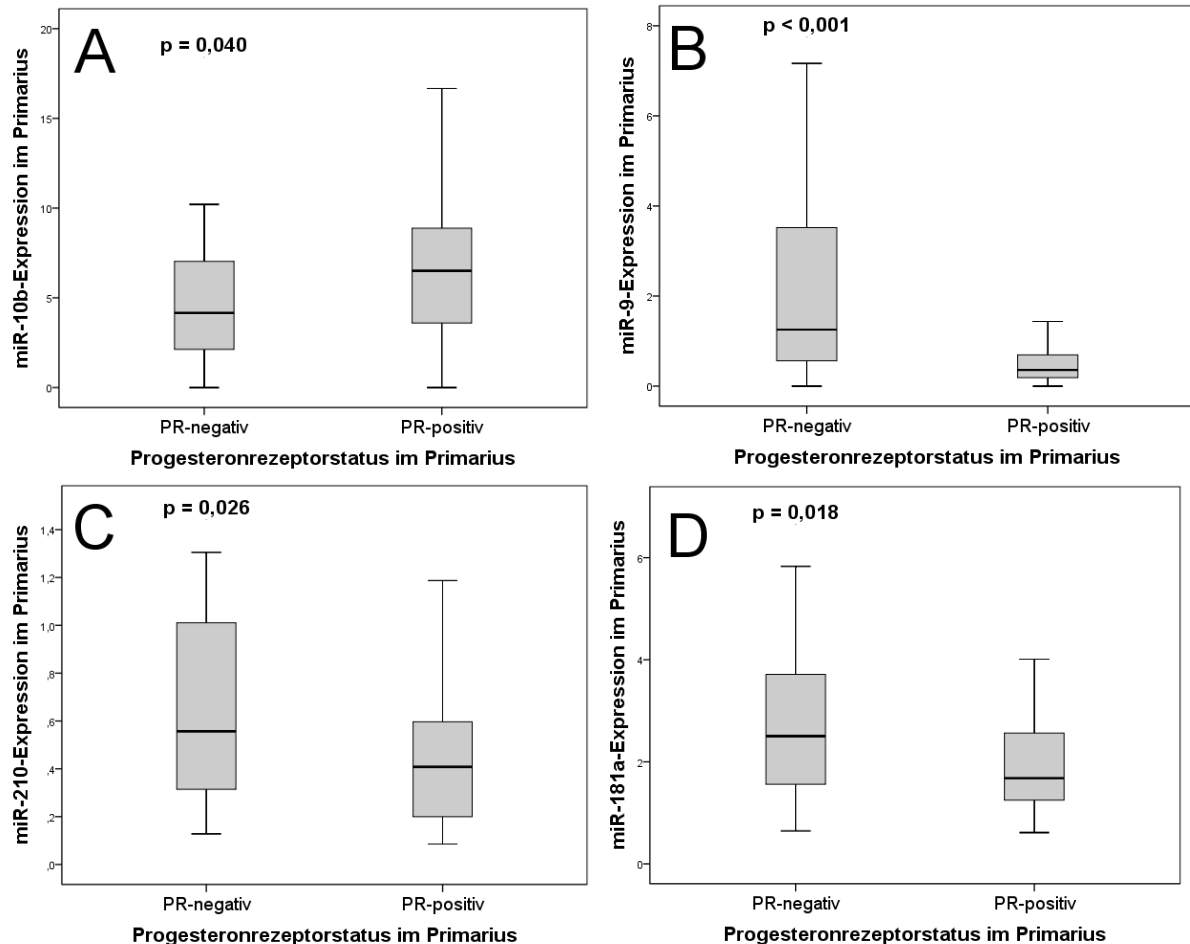
**Abbildung 24: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus im Primarius.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-10b-Expression (Grafik A), der miRNA-375-Expression (Grafik B), der miRNA-210-Expression (Grafik C) und der miRNA-9-Expression (Grafik D) im Primarius in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

Es wurde ebenfalls die miRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus untersucht. Bei 66 Patientinnen (68,8%) war im Primärtumor-Gewebe der Progesteronrezeptorstatus positiv (PR-positiv), bei 29 Patientinnen (30,2%) exprimierte der Primärtumor keinen Progesteronrezeptor. MiRNA-10b zeigte sich bei den Progesteronrezeptor-positiven Primärtumoren signifikant höher exprimiert (Median = 6,51) als bei den Progesteronrezeptor-negativen Primärtumoren (Median = 4,16) ( $p = 0,040$ ). Die drei folgenden miRNAs waren in Progesteronrezeptor-negativen Primärtumoren signifikant höher exprimiert: miRNA-9 (PR-negativ-Median = 1,26 versus PR-positiv-Median = 0,36,  $p < 0,001$ ),



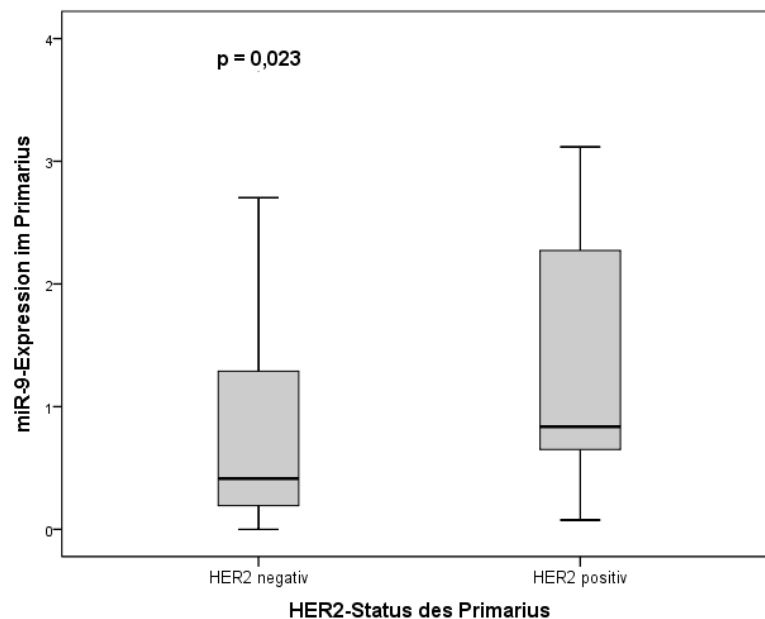
miRNA-210 (PR-negativ-Median = 0,56 versus PR-positiv-Median = 0,41,  $p = 0,026$ ) und miRNA-181a (PR-negativ-Median = 2,50 versus PR-positiv-Median = 1,68,  $p = 0,018$ ) (Abbildung 25).



**Abbildung 25: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus im Primarius.**

Die Korrelationen erfolgten mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-10b-Expression (Grafik A), der miRNA-375-Expression (Grafik B), der miRNA-210-Expression (Grafik C) und der miRNA-9-Expression (Grafik D) im Primarius in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

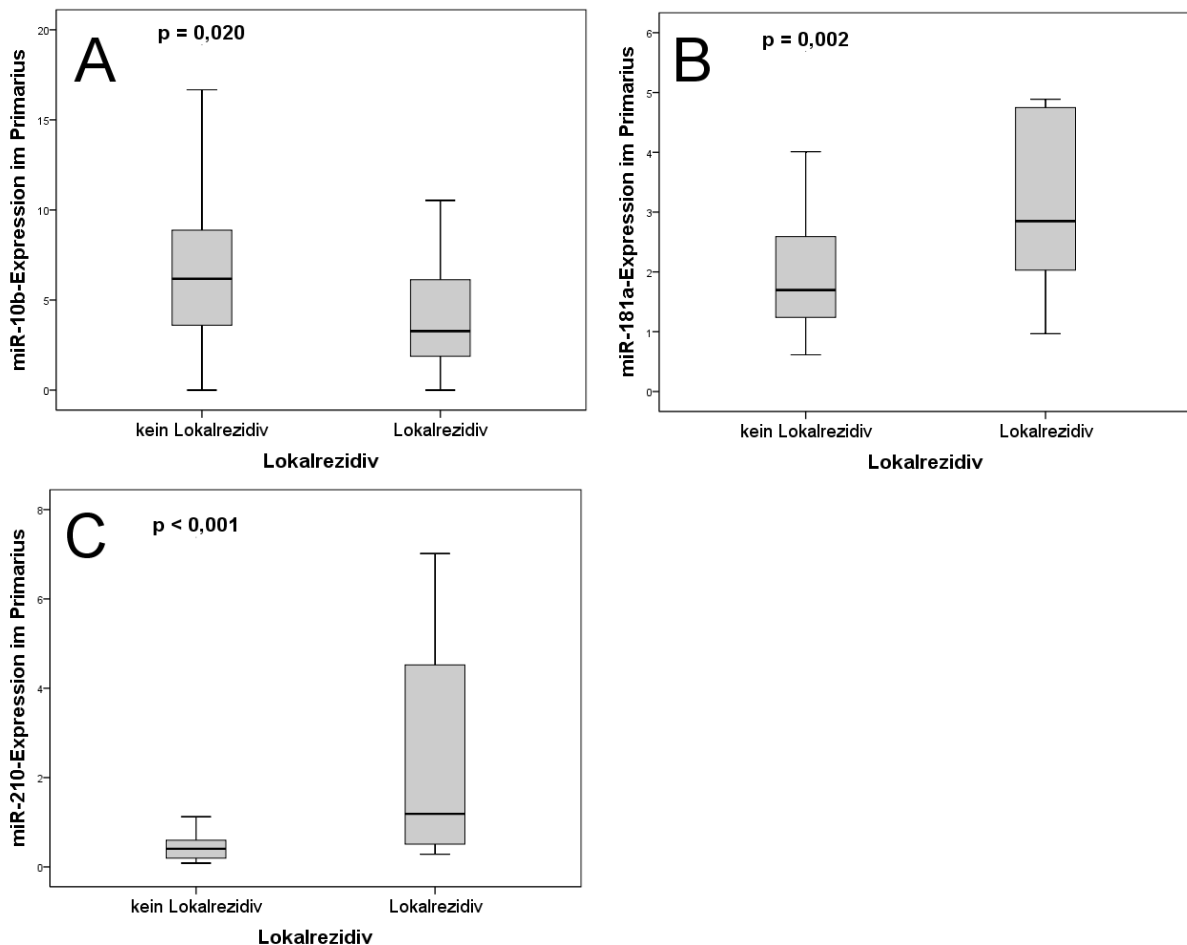
Die Betrachtung des HER2-Status im Primarius zeigte 80 HER2-negative Primärtumoren (83,3%) und 16 HER2-positive Primärtumoren (16,7%). In HER2-positiven Primärtumoren war miRNA-9 etwa 2-fach höher exprimiert (Median = 0,84) als in HER2-negativen Primärtumoren (Median = 0,41) ( $p = 0,023$ ) (Abbildung 26).



**Abbildung 26: MiRNA-9-Expression im Primarius in Abhängigkeit des HER2-Status des Primarius.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-9-Expression im Primarius in Abhängigkeit des HER2-Status des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

Im untersuchten Kollektiv (n = 96) entwickelten 19 Patientinnen (19,8%) im späteren Verlauf ein Lokalrezidiv. 77 Patientinnen (80,2%) blieben frei von Lokalrezidiven. MiRNA-10b war bei Patientinnen, die kein Lokalrezidiv entwickelten, signifikant höher exprimiert (Median = 6,18) als bei Patientinnen, die ein Lokalrezidiv im Verlauf entwickelten (Median = 3,28) (p = 0,020). Zwei miRNAs waren hingegen bei Patientinnen, die ein Lokalrezidiv erlitten, höher exprimiert: miRNA-181a (kein Lokalrezidiv-Median = 1,70 versus Lokalrezidiv-Median = 2,85, p = 0,002) und miRNA-210 (kein Lokalrezidiv-Median = 0,41 versus Lokalrezidiv-Median = 5,83, p < 0,001) (Abbildung 27).

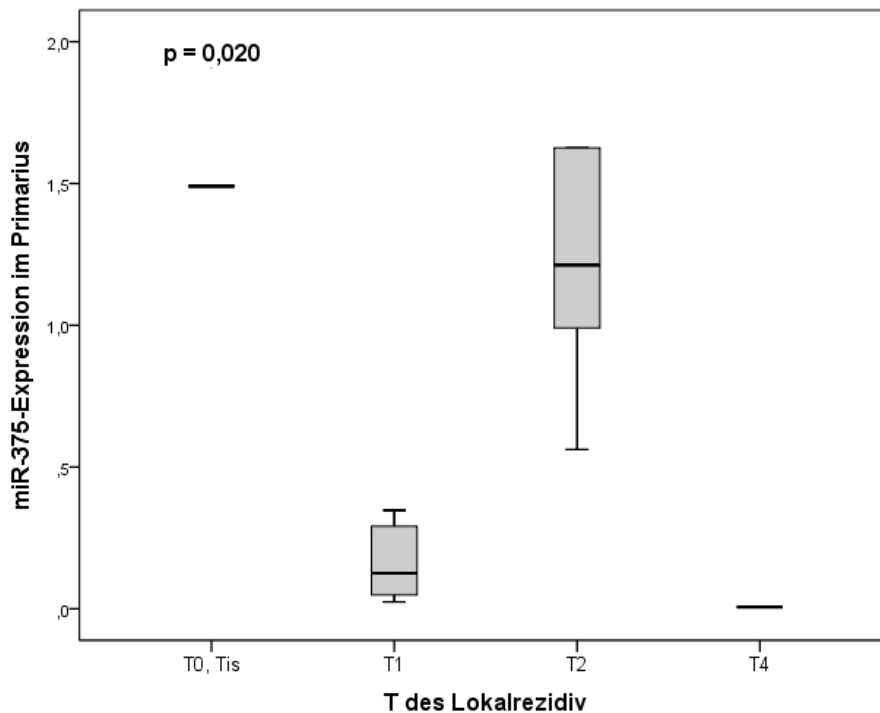


**Abbildung 27: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit der Entwicklung eines nachfolgenden Lokalrezidivs.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-10b, miRNA-181a- und miRNA-210-Expression im Primarius in Abhängigkeit der Entwicklung eines nachfolgenden Lokalrezidivs. Extremwerte werden nicht gezeigt.

#### 4.4.2 Korrelation der miRNA-Expression des Primarius mit Merkmalen des Lokalrezidivs

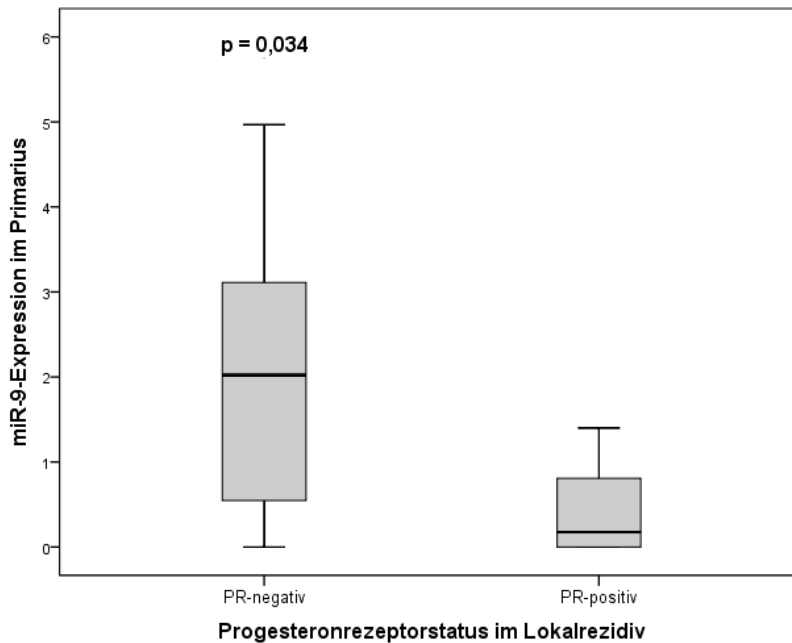
Im Folgenden wurde die miRNA-Expression des Primarius in Abhängigkeit der Merkmale der Lokalrezidive in einem Kollektiv von 19 Patientinnen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von miRNA-375 bei Korrelation mit dem T-Stadium des Lokalrezidivs signifikant verschieden ist. Jeweils eine Patientin befand sich im Stadium T0/Tis bzw. T4, 8 Patientinnen (42,1%) im T1-Stadium und 5 Patientinnen (26,3%) im T2-Stadium. Die miRNA-375-Expression betrug im T1-Stadium im Median 0,13 und im T2-Stadium 1,63 ( $p = 0,020$ ) (Abbildung 28).



**Abbildung 28: MiRNA-375-Expression im Primarius in Korrelation mit dem T-Stadiums des Lokalrezidivs.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Kruskal-Wallis-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-375-Expression im Primarius in Korrelation mit dem T-Stadium des Lokalrezidivs. Im Stadium „T0, Tis“ und „T4“ ist jeweils nur ein Wert in das Testverfahren eingegangen. Extremwerte werden nicht gezeigt.

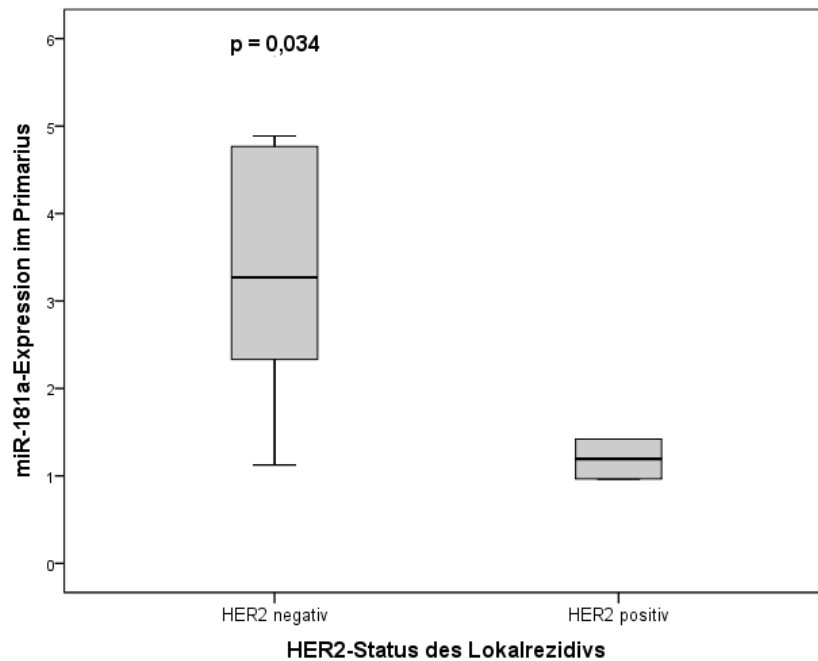
Bezüglich des Progesteronrezeptorstatus (PR-Status) teilte sich das Kollektiv in 11 PR-negative (57,9%) und 8 PR-positive Patientinnen (42,1%) auf. Die miRNA-9-Expression im Primarius war bei den im Lokalrezidiv PR-negativen Patientinnen (Median = 2,02) signifikant höher als bei den im Lokalrezidiv PR-positiven Patientinnen (Median = 0,21,  $p = 0,034$ ) (Abbildung 29).



**Abbildung 29: MiRNA-9-Expression im Primarius in Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus im Lokalrezidiv.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-9-Expression im Primarius in Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus des Lokalrezidivs. Extremwerte werden nicht gezeigt.

Unter den 19 betrachteten Patientinnen waren 17 Patientinnen beim Lokalrezidiv HER2-negativ (89,5%) und 2 Patientinnen HER2-positiv (10,5%). Bei HER2-Negativität im Lokalrezidiv fand sich eine höhere miRNA-181a-Expression des Primarius (Median = 3,27) als bei HER2-Positivität im Lokalrezidiv (Median = 1,19) ( $p = 0,034$ ) (Abbildung 30).

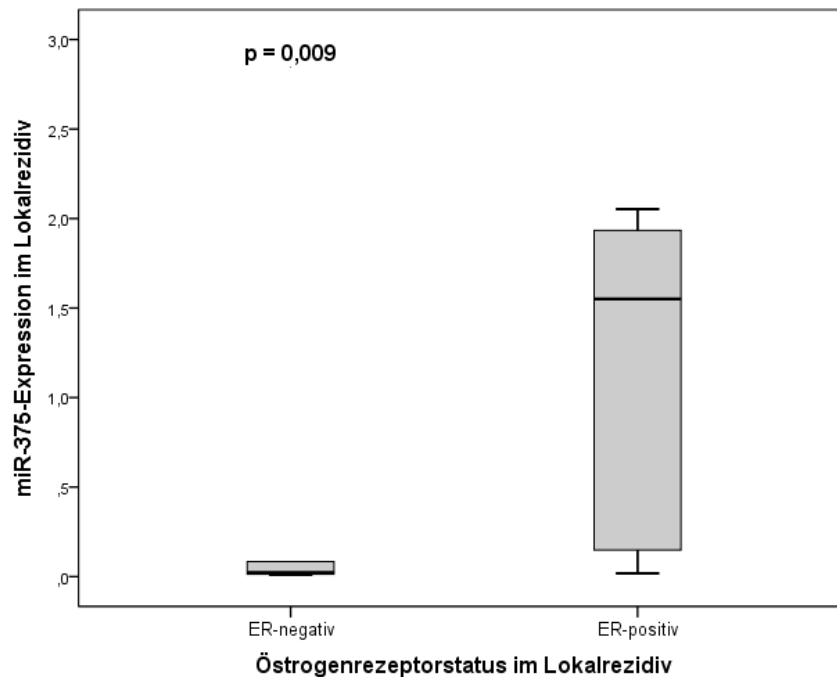


**Abbildung 30: MiRNA-181a-Expression im Primarius in Korrelation mit dem HER2-Status im Lokalrezidiv.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-181a-Expression im Primarius in Korrelation mit dem HER2-Status des Lokalrezidivs. Extremwerte werden nicht gezeigt.

#### 4.4.3 Korrelation der miRNA-Expression des Lokalrezidivs mit Merkmalen des Lokalrezidivs

Es wurden die miRNA-Expressionswerte des Lokalrezidivs von 17 Patientinnen mit den Merkmalen des Lokalrezidivs korreliert. Bei fünf Patientinnen war der Östrogenrezeptorstatus des Lokalrezidivs negativ (29,4%), bei 12 Patientinnen war das Lokalrezidiv-Gewebe ER-positiv (70,6%). In den ER-positiven Lokalrezidiven war die miRNA-375-Expression signifikant höher (Median = 1,55) als in den ER-negativen Tumoren (Median = 0,02) ( $p = 0,009$ ) (Abbildung 31).

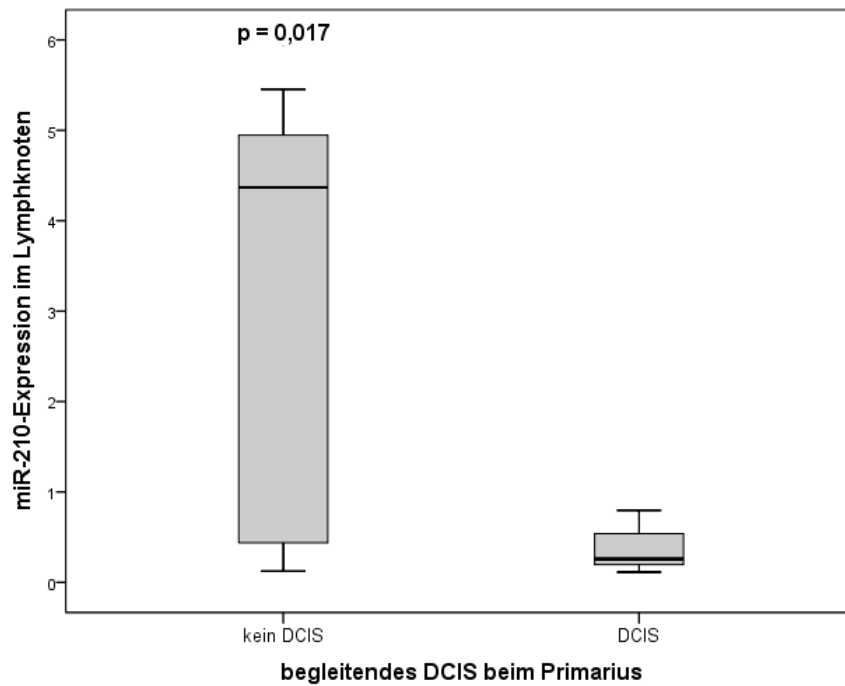


**Abbildung 31: miRNA-375-Expression im Lokalrezidiv in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus im Lokalrezidiv.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-375-Expression im Lokalrezidiv in Östrogenrezeptorstatus des Lokalrezidivs. Extremwerte werden nicht gezeigt.

#### 4.4.4 Korrelation der miRNA-Expression des Lymphknotens mit Merkmalen des Primarius

Bei der Korrelation der miRNA-Expression im Lymphknoten mit Tumormerkmalen des Primarius wurden 33 Patientinnen eingeschlossen. 27 dieser Patientinnen hatten zum Primärtumor ein begleitendes DCIS (81,1%), sechs Patientinnen hatten kein DCIS (18,9%). Bei den Patientinnen ohne begleitendes DCIS konnte eine signifikant höhere miRNA-210-Expression (Median = 4,37) im Lymphknoten im Vergleich zu Patientinnen mit DCIS (Median = 0,26) beobachtet werden ( $p = 0,017$ ) (Abbildung 32).

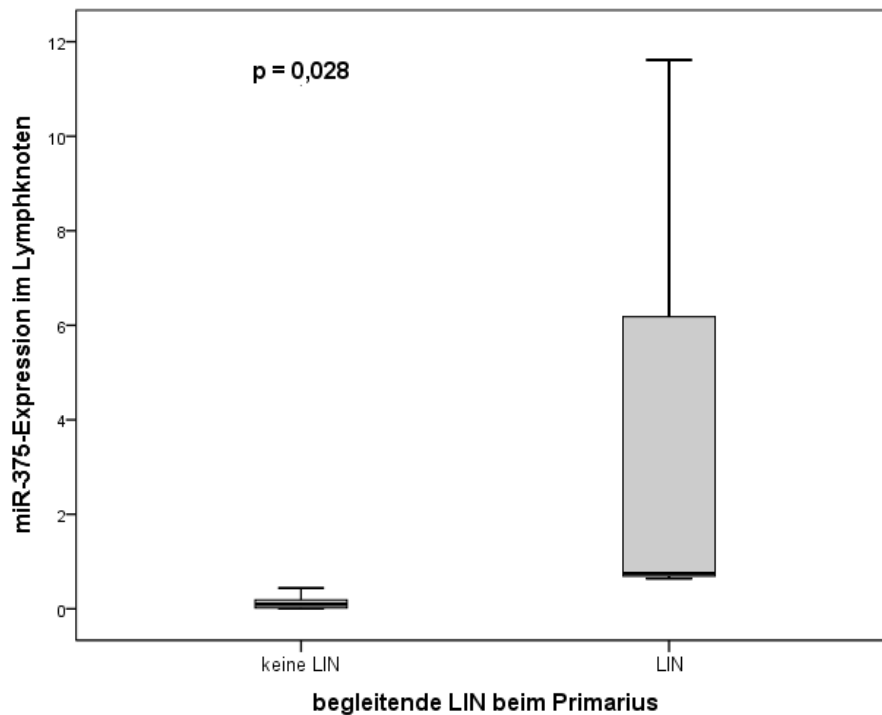


**Abbildung 32: MiRNA-210-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Vorhandensein eines begleitenden DCIS im Primarius.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-210-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Vorhandensein eines begleitenden DCIS im Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

In diesem Kollektiv hatten außerdem 3 Patientinnen (9,9%) beim Primarius eine begleitende lobuläre intraepitheliale Neoplasie (LIN), 30 Patientinnen (90,1%) erlitten keine begleitende LIN. Die Patientinnen mit begleitender LIN exprimierten im Lymphknoten signifikant höhere Werte an miRNA-375 (Median = 0,74) als Patientinnen ohne LIN (Median = 0,09,  $p = 0,028$ ) (Abbildung 33).

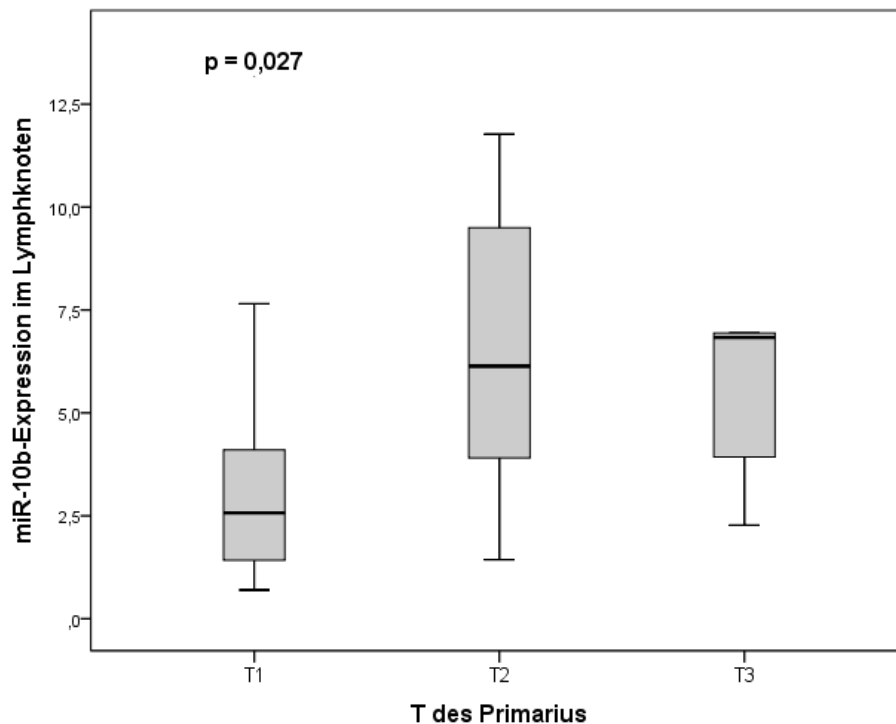




**Abbildung 33: MiRNA-375-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Vorhandensein einer begleitenden LIN im Primarius.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-375-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Vorhandensein einer begleitenden LIN im Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

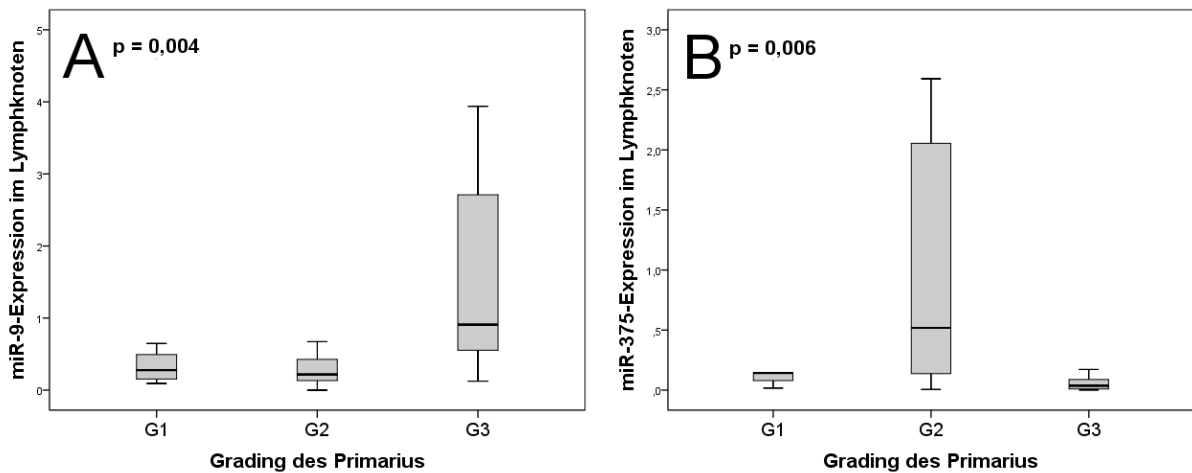
Außerdem konnte eine positive Korrelation der miRNA-10b-Expression im Lymphknoten mit dem T-Stadium des Primarius gezeigt werden. Dreizehn Patientinnen (39,4%) dieses Kollektivs hatten Stadium T1, 15 Patientinnen (45,5%) hatten Stadium T2 und 5 Patientinnen (15,1%) hatten Stadium T3. Die mediane Expression betrug im T1-Stadium 2,57, im T2-Stadium 6,14 und im T3-Stadium 6,83. Die Expression von miRNA-10b im Lymphknoten stieg also mit höherem T-Stadium des Primarius signifikant an ( $p = 0,027$ ) (Abbildung 34).



**Abbildung 34: MiRNA-10b-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem T-Stadium des Primarius.**

Die Korrelation erfolgte mit einem Kruskal-Wallis-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-10b-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem T-Stadium des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

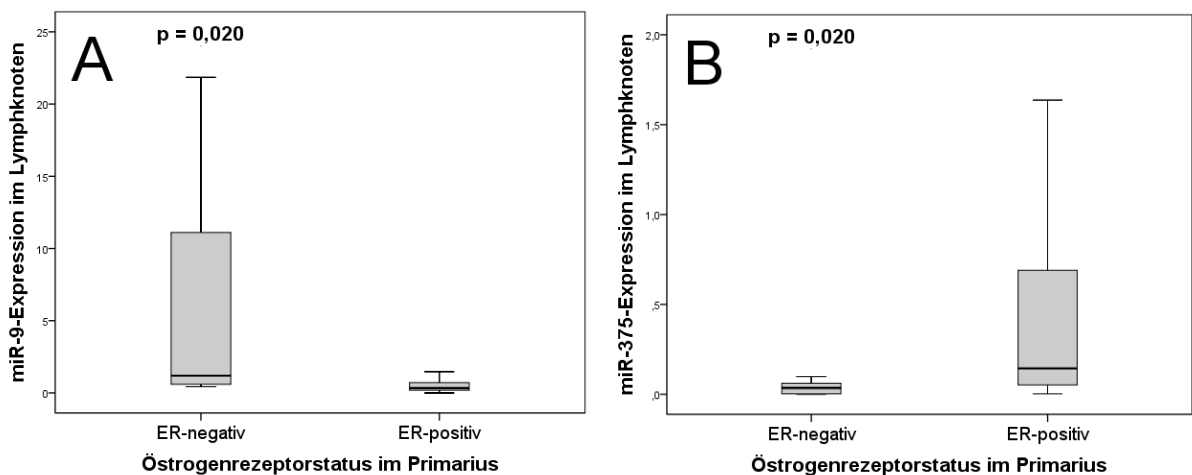
Bei der Korrelation der miRNA-Expression im Lymphknoten mit dem G-Stadium des Primarius zeigten sich miRNA-9 und miRNA-375 als signifikant unterschiedlich in den verschiedenen G-Stadien. So stieg die miRNA-9-Expression mit höherem G-Stadium kontinuierlich an (G1-Median = 0,22 versus G3-Median = 0,91,  $p = 0,004$ ). MiRNA-375 wurde am höchsten in den Gewebeproben des G2-Stadiums exprimiert (Median = 0,52), wohingegen Gewebeproben des G1-Stadiums (Median = 0,14) und G3-Stadiums (Median = 0,04) deutlich weniger miRNA-375 exprimierten ( $p = 0,006$ ) (Abbildung 35).



**Abbildung 35: MiRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Grading des Primarius.**

Die Korrelationen erfolgten mit einem Kruskal-Wallis-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Grading des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

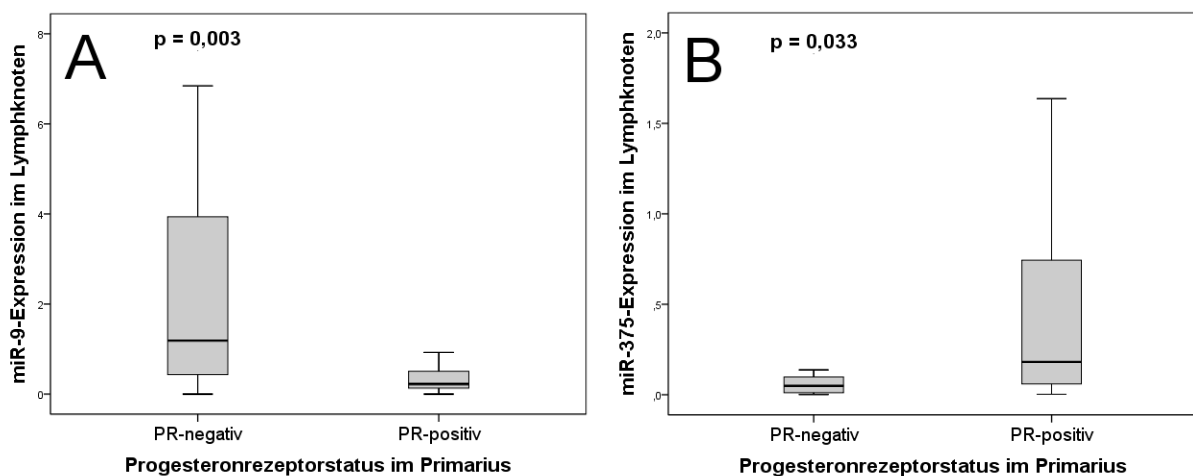
Eine Korrelation von miRNA-9 und -375 fand sich ebenfalls bei der Betrachtung des Östrogenrezeptorstatus des Primarius. MiRNA-9 wird in ER-negativen Primärtumoren (Median = 1,20) signifikant höher exprimiert als in ER-positiven Primärtumoren (Median = 0,72,  $p = 0,020$ ). MiRNA-375 hingegen wird in ER-positiven Primärtumoren (Median = 0,15) stärker exprimiert als in ER-negativen Primärtumoren (Median = 0,04,  $p = 0,020$ ) (Abbildung 36).



**Abbildung 36: MiRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus des Primarius.**

Die Korrelationen erfolgten mit einem Kruskal-Wallis-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

Auch bei der Analyse des Progesteronrezeptorstatus des Primarius konnte eine Korrelation von miRNA-9 und miRNA-375 im Lymphknoten nachgewiesen werden. Auch hier verhielten sich die beiden miRNAs gegenläufig. MiRNA-9 wurde im Lymphknoten bei PR-negativen Primärtumoren (Median = 1,19) signifikant höher exprimiert als bei PR-positiven Primärtumoren (Median = 0,23,  $p = 0,003$ ). Demgegenüber steht miRNA-375 mit einer höheren Expression im Lymphknoten bei PR-positivem Primarius (Median = 0,74) im Vergleich zu PR-negativen Primärtumoren (Median = 0,10,  $p = 0,033$ ) (Abbildung 37).



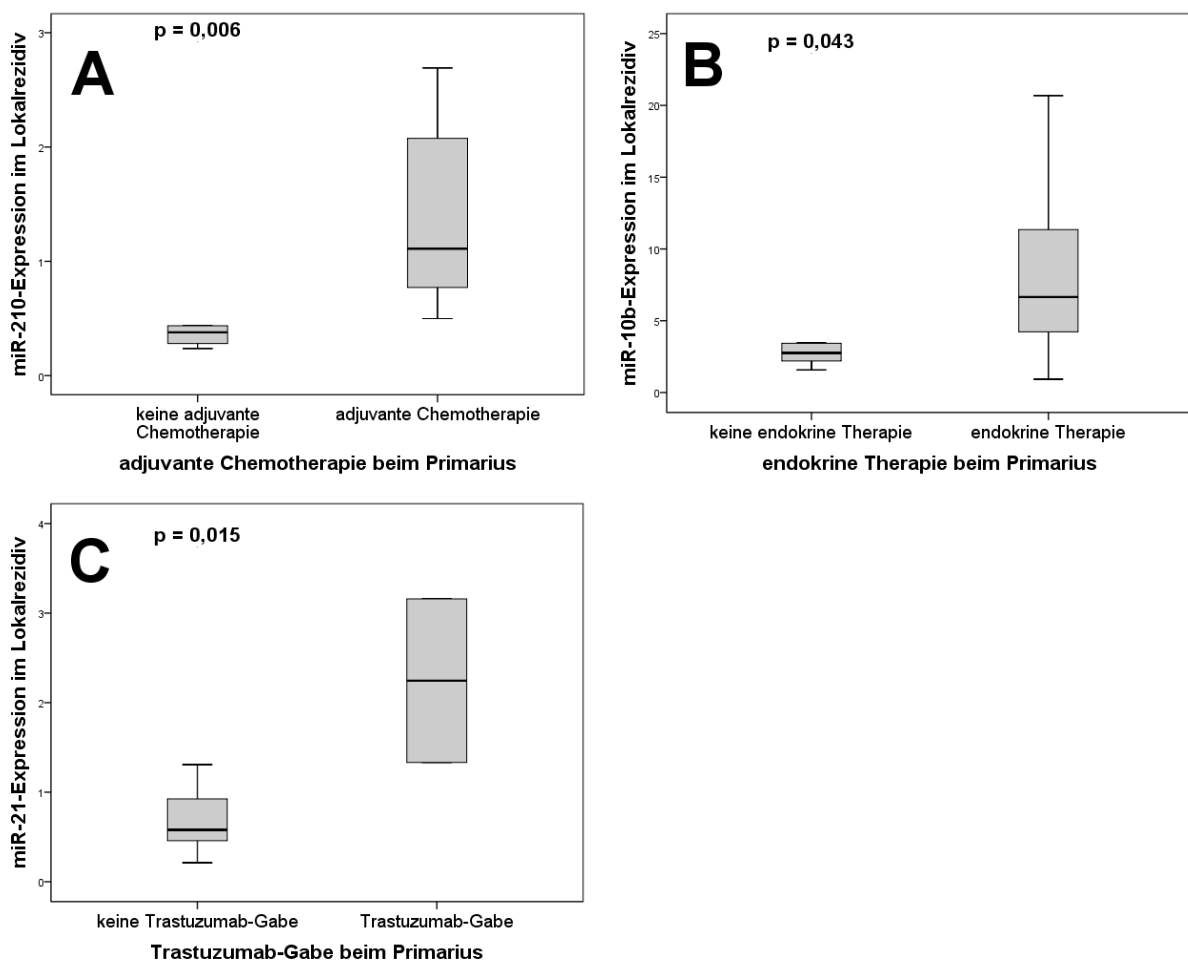
**Abbildung 37: MiRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus des Primarius.**

Die Korrelationen erfolgten mit einem Kruskal-Wallis-Test. Dargestellt sind die Mediane, 25%- und 75%-Quartile, sowie Minimum und Maximum der miRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus des Primarius. Extremwerte werden nicht gezeigt.

#### 4.5 Einfluss der Systemtherapie des Primarius auf die miRNA-Expression im Lokalrezidiv

Es erfolgte eine Betrachtung der miRNA-Expression im Lokalrezidiv nach erfolgter Systemtherapie beim Primarius. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere miRNA-210-Expression im Lokalrezidiv, wenn eine adjuvante Chemotherapie bei Diagnose des Primarius erfolgte (Median = 1,11). Die Expression bei nicht erfolgter Chemotherapie war deutlich geringer (Median = 0,38). MiRNA-10b war signifikant höher exprimiert in Lokalrezidiven mit erfolgter endokriner Therapie des Primarius (Median = 6,65) im Vergleich zu keiner endokrinen Therapie beim Primarius (Median

= 2,76). Bei Patientinnen, die im Rahmen der Primärtumor-Diagnose Trastuzumab erhielten, war die miRNA-21-Expression im Lokalrezidiv signifikant höher exprimiert (Median = 2,24) als bei Patientinnen ohne Trastuzumab-Gabe (Median = 0,58) (Abbildung 38). In diesem Kontext muss jedoch berücksichtigt werden, dass ausschließlich Patientinnen mit positivem Hormonrezeptorstatus eine endokrine Therapie erhalten und nur Patientinnen mit positivem HER2-Rezeptorstatus mit Trastuzumab behandelt werden. In den Korrelationsanalysen B und C der Abbildung 38 stellen sich also die Subgruppen der ER-positiven/ER-negativen bzw. der HER2-positiven/HER2-negativen Patientinnen dar.



**Abbildung 38: Korrelation der miRNA-Expression im Lokalrezidiv in Abhängigkeit der erfolgten Systemtherapie bei Diagnose des Primarius.**

Grafik A zeigt eine signifikant höhere Expression von miRNA-210 im Lokalrezidiv nach adjuvanter Chemotherapie des Primarius ( $p = 0,006$ ). Grafik B stellt die Expression von miRNA-10b in Lokalrezidiven mit und ohne endokrine Therapie beim Primarius dar. Sie ist bei erfolgter endokriner Therapie signifikant erhöht ( $p = 0,043$ ). Grafik C zeigt die signifikant erhöhte Expression von miRNA-21 im Lokalrezidiv nach Trastuzumab-Gabe beim Primarius ( $p = 0,015$ ). Die Signifikanzen wurden jeweils mit dem Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Extremwerte werden in den Grafiken nicht angezeigt.

## 5 Diskussion

Im Jahr 2000 postulierten Hanahan und Weinberg die *hallmarks of cancer* [172]. In der überarbeiteten Version von 2011 werden 10 Eigenschaften beschrieben, die die meisten Krebszellen aufweisen und zu ihrem dysregulierten Verhalten befähigen (Abbildung 39). Dazu gehören die Aufrechterhaltung von Wachstumssignalen, das Umgehen von wachstumshemmenden Signalen, das Verhindern einer Immunantwort, die Befähigung zu replikativer Immortalität, die tumorfördernde Inflammationsreaktion, die Aktivierung von Invasion und Metastasierung, die Förderung der Angiogenese, die Genom-Instabilität und das Vorhandensein von Mutationen, das Verhindern von Apoptose sowie ein dysregulierter Zellmetabolismus [2]. Im Folgenden soll aufgezeigt werden, wie die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs durch den Abbau von mRNAs oder die Inhibition der Translation bestimmter mRNAs auf die *hallmarks of cancer* Einfluss nehmen und so die Progression tumoröser Veränderungen fördern können.

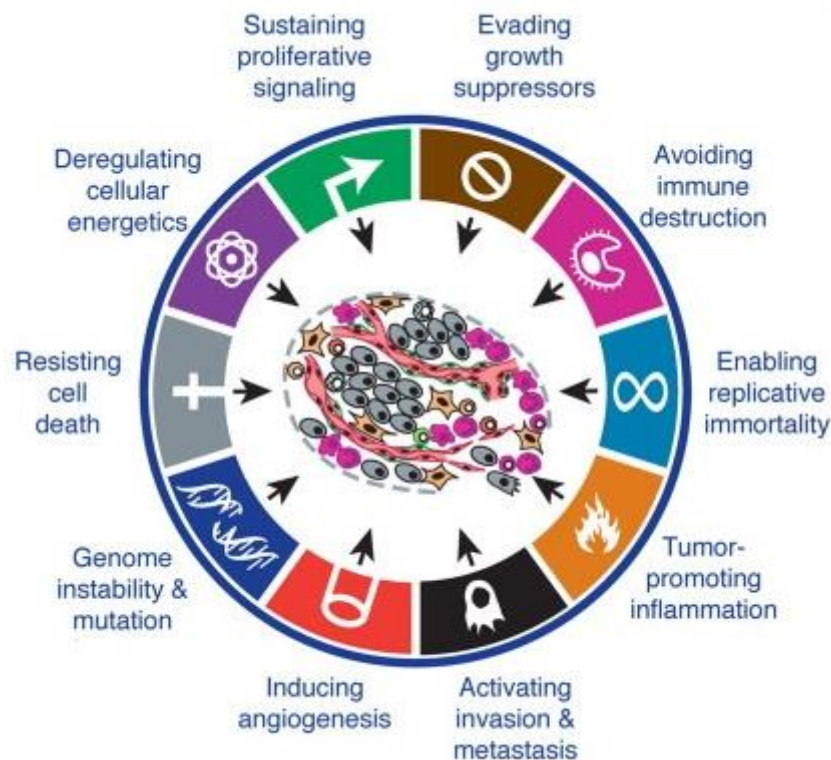


Abbildung 39: *hallmarks of cancer*, modifiziert nach [2]

## 5.1 miRNA-9

Der miRNA-9 wird in der Literatur mehrheitlich eine begünstigende Rolle hinsichtlich des Tumorwachstums und der Tumorprogression zugeschrieben. So inhibiert miRNA-9 beispielsweise die Translation der mRNA des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin, wodurch *in vitro* die Metastasierung begünstigt wird [100, 119, 173, 174]. Aufgrund der hohen miRNA-9-Expression in Mamma-Karzinomen könnte auch *in vivo* ein Metastasierungs-fördernder Effekt durch die miRNA-9 vorliegen. Pillai et al. identifizierten den Östrogenrezeptor als direkte Zielstruktur im Mamma-Karzinom, wodurch sich eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Therapie mit Tamoxifen ergab [122].

Die negative Korrelation der miRNA-9 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nur für den Östrogenrezeptor, sondern auch für den Progesteronrezeptor gezeigt werden. Des Weiteren zeigte sich ein signifikanter Expressionsunterschied der miRNA-9 im Primarius in Abhängigkeit des G-Stadiums im Primarius. Je höher die miRNA-9-Expression gemessen wurde, desto höher war das G-Stadium. In höheren G-Stadien werden Zellen beobachtet, die deutlich stärker vom ursprünglichen Gewebe abweichen und somit ein maligneres Verhalten aufweisen als Zellen eines niedrigeren G-Stadiums bzw. im Vergleich zu gesundem Gewebe [28]. Diese Zellen haben also entweder durch Mutationen oder andere Einflüsse eine Transformation durchlaufen. Im Regelfall wird bei solch dysregulierten Zellen die Apoptose eingeleitet [175]. MiRNA-9 hat jedoch als direkte Zielstruktur FOXO1, ein Transkriptionsfaktor und Schlüsselmolekül im PI3K/AKT-Signalweg, der eine pro-apoptotische Signalkaskade einleitet [176]. Durch die negative Beeinflussung von FOXO1 kann miRNA-9 anti-apoptotische Effekte ausüben. Außerdem inhibiert miRNA-9 die Translation von CK1 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$ , welche Bestandteile des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges sind. Diese beiden Moleküle bilden zusammen mit anderen Proteinen einen inhibitorischen Komplex mit  $\beta$ -Catenin, woraufhin eine Ubiquitinierung und der anschließende Abbau von frei im Cytosol vorliegendem  $\beta$ -Catenin eingeleitet wird. Durch die Bindung des Wnt-Liganden am sog. *Frizzled*-Rezeptor wird eine Signalkaskade eingeleitet, bei der die inhibitorische Wirkung von GSK-3 $\beta$  und CK1 $\alpha$  aufgehoben wird und somit  $\beta$ -Catenin die Transkription verschiedener Zielgene einleiten kann. Wenn allerdings die hemmenden Proteine CK1 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  aufgrund der Repression durch miRNA-9 nur

reduziert vorhanden sind, ist die transkriptionsfördernde Wirkung von  $\beta$ -Catenin unreguliert und konstitutiv aktiv, wodurch sich tumorwachstumsfördernde Effekte ergeben können [177]. Die wachstumsfördernde Wirkung von miRNA-9 könnte außerdem in der negativen Regulation von *Patched* (PTCH1) begründet sein, einem fundamentalen, regulatorischen Bestandteil des *Sonic Hedgehog*-Signalwegs, der bei Abwesenheit des Hedgehog-Liganden die Gentranskription inhibiert. Kommt es jedoch durch miRNA-9 zu einer verminderten *Patched*-Translation, so befindet sich die *Sonic Hedgehog*-Signalkaskade im dauerhaft aktivierten Zustand mit daraus folgender kontinuierlich aktivierter Transkription von proliferations- und angiogenesefördernden Genen [178, 179].

### 5.2 miRNA-10b

Eine hohe miRNA-10b-Expression ist in der Literatur mit einem kürzeren Rezidivfreiem und Gesamtüberleben sowie Metastasierung assoziiert beschrieben [101, 124, 130]. Pro-metastatische Effekte könnten von miRNA-10b durch die Translationshemmung des Transkriptionsfaktors HOXD10 hervorgerufen werden, wodurch die pro-metastatische GTPase RHOC signifikant hochreguliert wird [124, 180, 181]. Das Tumorwachstum und die Entdifferenzierung der Tumorzellen könnten außerdem durch die negative Regulation des *apoptosis protease activating factor-1* (APAF-1) hervorgerufen werden [182-184]. APAF-1 bildet zusammen mit Cytochrom c, dATP und Caspase 9 das Apoptosom und initiiert so die Apoptose von Zellen [185]. Diese Erkenntnisse könnten ebenso mit der Translationshemmung von *Krüppel-like factor 4* (KLF4) erklärt werden. KLF4 agiert als Suppressor des Zellzyklus und bewirkt so eine Hemmung des Zellwachstums. Eine herunterregulierte Expression von KLF4 war in kolorektalen Karzinomen und Osteosarkomen mit höherer Zellproliferation und Metastasierung assoziiert [186-188]. Die miRNA-10b-Expression selbst wird durch den Transkriptionsfaktor TWIST1 induziert [124, 189, 190] und durch TGF- $\beta$ 1 stimuliert [182].

Im Kontrast hierzu stehen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Hohe miRNA-10b-Expressionslevel im Primärtumor korrelieren signifikant mit einem niedrigeren G-Stadium, also mit Tumoren, die sich durch einen geringeren Malignitätsgrad



auszeichnen. Außerdem findet sich eine höhere miRNA-10b-Expression bei Patientinnen mit positivem Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus im Primarius. Daraus ergeben sich bessere Therapiemöglichkeiten mit endokrin wirksamen Therapeutika, wodurch auch das hier beobachtete Nicht-Auftreten von Lokalrezidiven im Verlauf bei hohen miRNA-10b-Expressionsleveln im Primarius begünstigt werden könnte [39]. Dai et al. zeigten, dass miRNA-10b die Expression der *Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha* (PIK3CA) in Fibroblasten hemmt, sodass nachfolgend der PI3K/AKT-Signalweg inhibiert wird. Die PI3K ist eine wichtige Effektor-Kinase innerhalb des PI3K/AKT-Signalwegs, welche unter ATP-Verbrauch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert und damit die proliferationsfördernde und anti-apoptotische Signalkaskade in Gang setzt [191]. Sollte diese Hemmung der PIK3CA ebenfalls in Mamma-Karzinom-Zellen nachweisbar sein, könnte der prognostisch günstige Effekt einer hohen miRNA-10b-Expression dadurch zu erklären sein.

### 5.3 miRNA-21

Die vorliegende Arbeit zeigte höhere miRNA-21-Expressionswerte in Lokalrezidiven von Patientinnen mit positivem HER2-Status des Primarius und somit auch einer Trastuzumab-Gabe im Rahmen der Systemtherapie des Primarius. De Mattos-Arruda et al. zeigten 2015 eine Hochregulierung von miRNA-21 in HER2-positiven Mamma-Karzinomen nach Trastuzumab-Gabe. Patientinnen, bei denen miRNA-21 hochreguliert war, hatten ein schlechteres Therapieansprechen auf Trastuzumab als Patienten mit niedriger miRNA-21-Expression. Deshalb wurde vorgeschlagen, miRNA-21 als spezifischen Biomarker für Trastuzumab-Resistenz zu verwenden [192].

Außerdem wurde als direkte Zielstruktur von miRNA-21 in Brustkrebsgewebe *Phosphatidylinositol-3-kinase regulatory subunit 1* (PIK3R1) identifiziert. Die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) ist eine wichtige Effektorkaskade im PI3K/AKT-Signalweg und besteht aus einer katalytischen, sowie einer regulatorischen Untereinheit. Beim Fehlen entsprechender *upstream*-Signale wird die Aktivität der PI3K durch die regulatorische Untereinheit gehemmt. Bei gehemmter Expression der PIK3R1 kommt es also zur Deregulation der PI3K mit vermehrter Aktivierung von AKT

[193]. Auch *Programmed cell death protein 4* (PDCD4) wird durch miRNA-21 in Mamma-Karzinomen negativ reguliert. In diesem Zusammenhang wird auch mehrfach die Assoziation hoher miRNA-21-Expression mit Resistenz der Mamma-Karzinome gegenüber Chemotherapie und Trastuzumab-Gabe diskutiert [192, 194, 195]. PDCD4 ist ein Initiator der Apoptose und wird auch AKT-vermittelt negativ reguliert [196].

### 5.4 miRNA-181a

Eine höhere miRNA-181a-Expression im Knochenmark von Patientinnen mit Mamma-Karzinom zeigte eine Assoziation mit einem kürzeren Rezidiv-freiem und einem kürzeren Gesamtüberleben [103]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Korrelation von hoher miRNA-181a-Expression im Primarius mit dem Auftreten von Lokalrezidiven gezeigt werden. Es konnte jedoch im Gegensatz zur Studie von Ota et al. kein signifikanter Unterschied im Rahmen der Überlebenszeitanalysen festgestellt werden. Hinsichtlich des Gesamtüberlebens zeigt sich dennoch ein leichter Trend im Sinne einer Überlegenheit bei geringer miRNA-181a-Expression (Expression  $\leq$  Median) im Primärtumor ( $p = 0,091$ ).

Zur Entdifferenzierung von Tumorzellen trägt miRNA-181a bei, indem es u.a. *ataxia teleangiectasia mutated* (ATM) negativ reguliert [147, 197]. ATM gehört zu den wichtigen Schlüsselmolekülen in der DNA-Reparatur. Es wird bei DNA-Doppelstrangbrüchen aktiviert und phosphoryliert weitere Effektoren, wie z.B. p53. Durch die Phosphorylierung von p53 wird dieses wiederum aktiviert und stoppt den Zellzyklus oder leitet die Apoptose ein. Hierdurch werden Zellen mit geschädigter und fehlerhafter DNA eliminiert [198]. *Bcl-2-associated X protein* (BAX) ist ein pro-apoptotischer Faktor und wird negativ durch miRNA-181a reguliert. Eine niedrigere BAX-Expression ist in der *triple-negativen* Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit einem höheren Zellüberleben und Metastasierung assoziiert [199]. Außerdem wird die Translation von *Wnt inhibitory factor-1* (WIF1) durch miRNA-181a gehemmt, was bei akuter lymphatischer Leukämie durch Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs zu verstärktem Zellwachstum führte [200]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass eine Hochregulierung von miRNA-181a auch im Mamma-Karzinom mit einem weniger differenzierten Phänotyp einhergehen könnte. Dies lässt sich jedoch mit den

Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen. Zwar sind die Expressionslevel an miRNA-181a in G3-Primärtumoren höher als in G2-Tumoren, aber auch G1-Tumoren zeigen eine höhere miRNA-181a-Expression als G2-Tumoren.

### 5.5 miRNA-210

Die Transkription von miRNA-210 wird bei hypoxischen Stoffwechsellagen oder in hypoxischen Geweben über den Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) induziert [201-203]. Als direkte Zielstruktur für miRNA-210 wird in der Literatur HIF-3 $\alpha$  diskutiert, welches die Expression von HIF-1 $\alpha$  negativ kontrolliert. Durch die Translationshemmung von HIF-3 $\alpha$  ergibt sich somit ein miRNA-210-vermitteltes positives *Feedback* für HIF-1 $\alpha$  [204, 205]. MiRNA-210 inhibiert außerdem die Expression von *Glycerol-3-phosphat-dehydrogenase 1-like* (GPD1L). Dies ist ein Enzym, das zu einer erhöhten Aktivität der Prolyl-Hydroxylase (PHD)-Aktivität beiträgt. PHD wiederum leitet den Abbau von HIF-1 $\alpha$  durch das Proteasom ein. Auch hieraus ergibt sich ein miRNA-210-vermittelter positiver *Feedback*-Mechanismus für HIF-1 $\alpha$  [206-208]. HIF-1 $\alpha$  ist ein Transkriptionsfaktor, der mehr als 800 Gene reguliert. Durch Regulation seiner Zielgene hat HIF-1 $\alpha$  auch in der Karzinogenese eine entscheidende Rolle. So wird z.B. über die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren oder epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren das Tumorwachstum begünstigt. Ebenfalls sind Metastasierungs-begünstigende Effekte durch die indirekte, negative Regulation von E-Cadherin beschrieben [209, 210]. Eine erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  im Tumorgewebe korreliert bei Patientinnen mit Brustkrebs mit einem höheren Risiko eines Krankheitsrückfalls bezüglich Metastasierung und Lokalrezidiven [211].

*Bcl-2 adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3* (BNIP3), ein pro-apoptotischer Faktor, ist ein weiteres Target der miRNA-210 [212, 213]. *BRCA-associated RING domain protein 1* (BARD1) ist für die Stabilität von BRCA1 von großer Wichtigkeit und bildet mit BRCA1 einen funktionalen Komplex. Sowohl BARD1 als auch BRCA1 werden tumorsuppressive Eigenschaften zugeschrieben. So spielen sie bei DNA-Schädigungen eine große Rolle, da der gebildete Komplex die homologe Rekombination und damit verbunden die DNA-Reparatur einleitet [214]. *BRCA1*-Mutationen sind zusammen mit *BRCA2*-Mutationen hauptursächlich für hereditäre

Mamma- und Ovarial-Karzinome [215]. MiRNA-210 hemmt die Expression von BARD1 [216]. Die geringeren Konzentrationen an BARD1 könnten einen ähnlichen Effekt wie eine *BRCA1*-Mutation haben und so die Entartung von Zellen fördern. Dies würde die Korrelation von hohen miRNA-210-Werten im Primärtumor mit höheren G-Stadien des Primarius erklären.

### **5.5.1 Einfluss von Chemotherapie auf die miRNA-210-Expression im Lokalrezidiv**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich im Lokalrezidiv eine signifikant höhere Expression von miRNA-210 bei Patientinnen, die im Rahmen der Primärtumor-Diagnose eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, als bei Patientinnen ohne Chemotherapie. Eine zytotoxische Therapie (z.B. Platin-haltige Substanzen) induziert bei sich schnell teilenden Zellen DNA-Schäden, woraufhin die Zelle durch Apoptose oder Nekrose untergeht [217]. Pu et al. zeigten in einer Kohorte mit 55 Mamma-Karzinom-Patienten, dass bei 12 Patienten (21,8%) nach Gabe einer Doxorubicin-/Docetaxel-haltigen neoadjuvanten Chemotherapie eine Tumornekrose im entnommenen Tumorpräparat nachgewiesen werden konnte [218]. Außerdem werden durch Zytostatika Endothel-Zellen geschädigt, was sich langfristig meist in kardialen Spätfolgen, wie z.B. arterieller Hypertension oder dem Auftreten von Myokardinfarkten, widerspiegelt. Es wurde aber auch gezeigt, dass die Endothelzell-Dysfunktion eine geringere Relaxationsfähigkeit von Arterien bewirkt [219, 220]. Sowohl durch die Nekrose als auch durch das geschädigte Endothel der Blutgefäße, woraus eine eingeschränkte Vasodilatation resultiert, könnte ein hypoxisches Milieu begünstigt oder sogar verursacht werden. Dabei sind Areale, in denen Tumorzellen aufgrund einer R1-Situation zurückgeblieben sind, prädestiniert für die Ausbildung eines hypoxischen Milieus. Infolge der Hypoxie könnte vermehrt HIF-1 $\alpha$  exprimiert werden, wodurch nachgeschaltet auch miRNA-210 stärker exprimiert wird. Diese Überexpression von miRNA-210 kann durch die unter Kapitel 5.5 genannten tumorwachstumsfördernden Effekte die Bildung eines Lokalrezidivs begünstigen. Ebenso könnte ein Tumorwachstum durch die erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  und dessen nachgeschalteter vermehrter Expression von Zielgenen begünstigt werden. Ein ebenso denkbarer Ansatz wäre die Überlegung, dass ein hypoxisches Milieu auch

durch höhere Tumorstadien gefördert werden könnte. Es konnte jedoch keine Korrelation der miRNA-210-Expression im Primärtumor mit den T-Stadien im Primarius gefunden werden.

### **5.5.2 Einfluss von miRNA-210 auf das Lokalrezidiv-freie Überleben**

Als einzige der sechs untersuchten miRNAs zeigte das Expressionslevel von miRNA-210 einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf das Lokalrezidiv-freie Überleben. Patientinnen mit geringer miRNA-210-Expression (Expression  $\leq$  Median) zeigten eine günstigere Prognose hinsichtlich des Lokalrezidiv-freien Überlebens als Patientinnen mit hoher miRNA-210-Expression (Expression  $>$  Median). Die schlechte Prognose bei hoher miRNA-210-Expression könnte mit der Korrelation mit hohen G-Stadien und dem negativen Hormonrezeptorstatus, sowohl beim Östrogen- als auch beim Progesteronrezeptor, erklärt werden. Die höheren G-Stadien gehen mit einem maligneren Potential der Tumorzellen einher [28, 29]. Der negative Hormonrezeptorstatus ist mit einer schlechteren Therapiemöglichkeit durch endokrin wirksame Medikamente vergesellschaftet [39]. Diese Faktoren begünstigen die Entstehung eines Lokalrezidivs.

Außerdem zeigte sich eine negative Korrelation von miRNA-10b- und miRNA-210-Expressionsleveln im Primärtumor. Dies könnte in einer indirekten negativen Regulation von miRNA-10b durch miRNA-210 begründet sein. MiRNA-210 hemmt die Translation des Transkriptionsfaktors TWIST1 [154], welcher die Transkription von miRNA-10b induziert [189, 190]. Außerdem wird SMAD4 als direkte Zielstruktur von miRNA-210 beschrieben [221]. SMAD4 ist ein Co-Faktor der Signaltransduktionskaskade des TGF- $\beta$ -Signalwegs. Bei Bindung von TGF- $\beta$  an den TGF- $\beta$ -Rezeptor kommt es zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von SMAD2 und SMAD3. Diese lagern sich dann mit SMAD4 zusammen, translozieren in den Zellkern und aktivieren die Transkription [222]. Hierbei wird unter anderem auch die Transkription von miRNA-10b induziert [182]. Durch die miRNA-210-vermittelte negative Regulation von SMAD4 kommt es also nachfolgend auch zu einer geringeren miRNA-10b-Expression. Die ungünstigen prognostischen Effekte von miRNA-210 könnten also zum einen durch die hohe Expression von miRNA-210 und der damit verbundenen Regulation tumorsuppressiver Zielstrukturen erklärt werden (Absatz 5.5). Zum anderen könnte

aber auch die negative Regulation von miRNA-10b und den mit niedriger miRNA-10b-Expression verbundenen ungünstigen Effekten ursächlich für die progressive Wirkung hoher miRNA-210-Expressionslevel sein.

### 5.6 miRNA-375

In der Literatur bestehen kontroverse Ansichten, was die Expression von miRNA-375 im Mamma-Karzinom anbelangt. Im Vergleich zu gesundem Brustgewebe scheint miRNA-375 höher exprimiert zu sein [105]; es wird jedoch auch von geringeren miRNA-375-Expressionsleveln im Mamma-Karzinom berichtet [166, 167]. Einigkeit besteht jedoch darin, dass die Dysregulation der miRNA-375-Expression das Tumorwachstum begünstigt.

Für die Annahme, dass miRNA-375 als Onkogen angesehen werden sollte, sprechen die Erkenntnisse von Mussnich et al. Sie zeigten, dass miRNA-375 in Cetuximab-resistenten Colon-Karzinomzellen höher exprimiert war als in Cetuximab-sensitiven Zellen. Als direkte Zielstruktur wurde *PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 1* (PHLPP1) identifiziert. Dieses Molekül hemmt die Aktivität von AKT im PI3K/AKT-Signalweg, wodurch Proliferation und Zellüberleben verringert werden. Im Falle der Hemmung von PHLPP1 durch miRNA-375-vermittelte Translationshemmung, würde die Hemmung des PI3K/AKT-Signalwegs jedoch wegfallen [223].

Für eine tumorsuppressive Rolle von miRNA-375 würde sprechen, dass miRNA-375 in Plattenepithelkarzinomen im Bereich von Kopf und Hals *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) negativ reguliert [224]. *Programmed cell death protein 1* (PD-1) ist ein Oberflächenrezeptor, der von Immunzellen, bspw. zytotoxischen T-Zellen, exprimiert wird. Der entsprechende Ligand PD-L1 wird unter anderem auch von Tumorzellen auf ihrer Oberfläche exprimiert. Bei Bindung des Liganden an PD-1 wird die Immunzelle inaktiviert. Somit kann die Tumorzelle einer Immunantwort entgehen. PD-L1 kann auch auf der Oberfläche von einem Teil der Mamma-Karzinomzellen bestimmt werden. Die Bestimmung dieses Merkmals findet aber noch keine breite Anwendung [225].

Sowohl im hepatozellulären Karzinom (HCC) als auch im papillären Schilddrüsen-Karzinom konnte der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2 als direkte Zielstruktur der miRNA-375 identifiziert werden. In den untersuchten Tumoren wurde eine geringe miRNA-375-Expression mit folgender Überexpression von HER2 beobachtet, was mit einer höheren Zellproliferation und Zellmigration assoziiert war [226, 227]. In Mamma-Karzinomen findet sich in 15 % der Fälle eine Überexpression von HER2, dies sind die sog. HER2-positiven Mamma-Karzinome [228]. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keine signifikanten Expressionsunterschiede des HER2-Status in Abhängigkeit der miRNA-375-Expression gefunden werden. Daher erscheint es sinnvoll, noch weitere Untersuchungen bezüglich der Regulation von HER2 durch miRNA-375 im Mamma-Karzinom anzustellen. In diesem Zusammenhang betrachtet könnten von der miRNA-375 tumorsuppressive Effekte ausgehen.

Auch Metadherin (MTDH) wird in der Literatur als direkte Zielstruktur von miRNA-375 in verschiedenen Tumorentitäten, wie kolorektalen, Cervix- und auch Mamma-Karzinomen, beschrieben. MTDH ist in vielen Tumorentitäten hochreguliert und aktiviert nachgeschaltete proliferationsfördernde und anti-apoptische Signalkaskaden (NF $\kappa$ B- und PI3K/AKT-Signalweg). So ist MTDH mit einem schlechteren klinischen *Outcome*, einem höheren Risiko für Metastasierung und auch Resistenz gegenüber Chemotherapie assoziiert [229-231]. Ward et al. konnten niedrigere miRNA-375-Expressionslevel in Tamoxifen-resistenten MCF-7-Brustkrebszellen im Vergleich zu Wildtyp-MCF-7-Zellen nachweisen. In den Tamoxifen-resistenten Zellen war miRNA-375 signifikant herunterreguliert und MTDH zeigte eine deutliche Überexpression. Durch Re-Expression von miRNA-375 sowie durch RNA-Interferenzvermitteltes *Silencing* von MTDH konnten die Zellen wieder für Tamoxifen sensibilisiert werden [232]. Die Re-Sensibilisierung für Tamoxifen könnte jedoch auch an der indirekten Regulation des Östrogenrezeptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) durch miRNA-375 liegen. *Ras-dexamethasone induced 1* (RASD1) ist ein negativer Regulator der ER $\alpha$ -Expression. Die RASD1-Translation wird jedoch von miRNA-375 negativ reguliert, sodass hohe miRNA-375-Expressionslevel mit einer hohen Rezeptordichte an ER $\alpha$  auf MCF-7-Zellen assoziiert sind [164]. Zellinger et al. zeigten ebenfalls, dass miRNA-375 direkt

RASD1 negativ reguliert und dass erhöhte Expressionswerte von miRNA-375 signifikant mit einem erhöhten Auftreten von Lokalrezidiven korrelierten [233].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ebenfalls signifikante Korrelationen von miRNA-375 mit dem Östrogenrezeptorstatus. In ER-positiven Primärtumoren lagen signifikant höhere miRNA-375-Expressionswerte im Vergleich zu ER-negativen Primärtumoren vor. Dieser Sachverhalt zeigt sich auch bei der miRNA-375-Expression im Lokalrezidiv und dem Östrogenrezeptorstatus im Lokalrezidiv. Eine höhere Östrogenrezeptor-Expression fördert das Zellwachstum, da Östrogenrezeptoren selbst bei der Bindung von Östrogen als Ligand als Transkriptionsfaktoren wirken und dadurch die Transkription aktivieren können [234]. So könnte der miRNA-375 in diesem Zusammenhang eher eine onkogene Rolle zugeschrieben werden. Die erhöhte Expression von Östrogen-Rezeptoren bietet allerdings ebenso den potentiellen Vorteil eines erhöhten Ansprechens des Tumors auf eine endokrine Therapie.

In den Überlebenszeitanalysen finden sich bezüglich der miRNA-375-Expression keine signifikanten Unterschiede. Es ist jedoch ein minimaler Trend bezüglich des Gesamtüberlebens sichtbar. Anhand der Kaplan-Meier-Kurven kann vermutet werden, dass eine geringe miRNA-375-Expression (Expression  $\leq$  Median) einen Überlebensvorteil im Vergleich zu hoher miRNA-375-Expression (Expression  $>$  Median) bietet. Dieser Sachverhalt würde die These unterstützen, dass miRNA-375 eine onkogene Wirkung hat.

### **5.7 miRNAs als Biomarker**

MiRNAs können aus verschiedensten Körperflüssigkeiten, wie z.B. Blutserum oder Blutplasma, Urin, Muttermilch, Speichel und Peritonealflüssigkeit isoliert werden [235]. Die miRNAs sind extrazellulär sehr stabil und RNase-resistent, weil sie in Exosomen, Proteinkomplexen mit *Argonaute2*, Mikrovesikeln oder Lipidkomplexen vorliegen. Gerade das Vorkommen von miRNAs in einem Komplex mit Argonaute2 lässt die Vermutung zu, dass funktionelle RISC-Komplexe auch im Blut vorliegen [99, 236, 237]. Blutanalysen könnten als Biomarker für Brustkrebs fungieren [238]. Die Ergebnisse



der vorliegenden Arbeit zeigten einen signifikanten Unterschied im Auftreten von Lokalrezidiven in Abhängigkeit der Expressionslevel von miRNA-10b, miRNA-181a und miRNA-210 im Primärtumor. Bei hoher Expression von miRNA-181a und miRNA-210 und erniedrigter Expression von miRNA-10b traten häufiger Lokalrezidive auf. Nur für eine erhöhte Expression von miRNA-210 im Primärtumor konnte auch in den Kaplan-Meier-Analysen ein signifikanter Nachteil im Lokalrezidiv-freien, jedoch nicht im Gesamtüberleben, gezeigt werden. So liegt es nahe, dass zumindest miRNA-210 als Biomarker zur Prognose des Auftretens von Lokalrezidiven fungieren könnte. Relevant wäre dieser Sachverhalt vor allem für die Planung der Tumor-Nachsorge. Schließlich stellt sich die Frage, ob sich ähnliche Korrelationen der Tumoreigenschaften mit miRNAs ergeben, die beispielsweise aus Blutplasma isoliert wurden. Für miRNA-9 und miRNA-10b zeigte sich kürzlich in anderen Studien, dass erhöhte Serumwerte für die jeweilige miRNA im Serum von Mamma-Karzinom-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen bestimmt werden konnten [239-241]. Die von Liu et al. beschriebene positive Korrelation der miRNA-21-Expressionslevel in Gewebeproben und Plasmaexosomen unterstützen den Ansatz, miRNAs als Biomarker zu nutzen [242]. Lopes et al. schlagen die Bestimmung von miRNA-210 im Plasma zur Nutzung als liquid biopsy vor [243]. Insgesamt erscheint daher eine anschließende Expressionsanalyse von miRNA-210, miRNA-10b und miRNA-181a im Blutplasma der Patientinnen des Studienkollektivs sinnvoll.

### **5.8 miRNAs als Therapeutikum**

Aufgrund der Vielzahl neuer Erkenntnisse bezüglich miRNAs, ihrer Zielstrukturen und der Auswirkungen von miRNAs auf verschiedenste Krankheiten rücken miRNAs immer weiter in den Fokus zur Entwicklung neuer Therapieoptionen. Dabei könnten zum einen miRNAs als Angriffspunkt neuer medikamentöser Therapien fungieren und zum anderen könnten miRNAs selbst als Therapeutikum eingesetzt werden [244]. Dazu müssen allerdings Transportsysteme für die miRNAs geschaffen werden, um diese im aktiven Zustand selektiv nur zu den Zielzellen zu bringen, ohne dass physiologische Prozesse beeinflusst werden. Außerdem müssen diese *Carrier* biologisch abbaubar oder renal auszuscheiden sein [245]. In der Zukunft könnten eventuell Lipid-basierte Nanopartikel als *Carrier* zum Einsatz kommen. So konnten im Mausmodell schon

erfolgreich miRNAs über Lipid-Komplexe zu kanzerösen Geweben gebracht werden, um dort ihre spezifischen Funktionen auszuüben [246, 247]. Dieser Sachverhalt könnte im Kontext der miRNA-375 therapeutischen Nutzen bringen. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass miRNA-375 die Expression des Östrogen-Rezeptors  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) indirekt über die Regulation von RASD1 positiv reguliert [164]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern diese Annahme ebenfalls. Tamoxifen-resistente Brustkrebszellen der MCF-7-Zelllinie konnten *in vitro* durch Re-Expression von miRNA-375 und der daraus folgenden erhöhten Expression von Östrogenrezeptoren wieder gegenüber Tamoxifen, welches ein kompetitiver Antagonist des Östrogenrezeptors ist, sensibilisiert werden [232]. Daher sollten *in vivo*-Untersuchungen erfolgen, um die Relevanz der Verabreichung von miRNA-375 zur Therapie einer bestehenden Tamoxifen-Resistenz bei negativem Östrogenrezeptorstatus zu klären. Dies ist vor allem interessant, da das Risiko der Entwicklung eines Lokalrezidivs signifikant höher ist, wenn keine suffiziente Hormon-Therapie bei ER-positiven Tumoren erfolgt [38, 40]. Andererseits sollte jedoch im Rahmen dieser Studien zunächst *in vitro* kritisch eine möglicherweise auftretende übermäßige Proliferation der Tumorzellen unter Re-Expression des Östrogenrezeptors betrachtet werden. Andreano et al. zeigten außerdem, dass die Potenz von Antagonisten des Östrogenrezeptors in Zellen, die mutierte Östrogenrezeptoren exprimierten, reduziert war, sofern die Expression der mutierten ER im Vergleich zu den Wildtyp-ER erhöht war. Durch Erhöhung der Wildtyp-ER-Expression normalisierte sich die Wirkung der mutierten Östrogenrezeptoren. Die genaue Wirkweise ist hier allerdings noch ungeklärt [248]. Auch in diesem Kontext wäre die Erprobung von miRNA-375 in einem therapeutischen Ansatz interessant, um eine Wirkverstärkung von ER-Antagonisten, wie z.B. Tamoxifen, zu untersuchen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse könnte auch eine Untersuchung der therapeutischen Gabe von miRNA-10b erwogen werden. Obwohl andere Studien in der Vergangenheit ein besseres *Outcome* hinsichtlich des Überlebens bei niedrigen miRNA-10b-Expressionsleveln zeigten [101, 124, 130], korreliert die erhöhte Expression von miRNA-10b in der vorliegenden Arbeit signifikant positiv mit dem Östrogenrezeptorstatus. Falls eine direkte oder indirekte Regulation des Östrogenrezeptors durch miRNA-10b in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden kann, könnte ebenfalls eine Tamoxifen-Sensibilisierung bei der therapeutischen Gabe von miRNA-10b untersucht werden.

Einen anderen Ansatz zum therapeutischen Einsatz von miRNAs stellen sog. „anti-miRNAs“ dar. Dies sind Oligonukleotide, die komplementär an eine spezifische miRNA binden. Somit wird die Anlagerung der miRNA an ihre Ziel-mRNA verhindert und die spezifische Funktion der miRNA herabgesetzt [249]. Anti-miRNAs können ebenso die Freisetzung von miRNAs aus dem RISC, also dem aktiven RNA-interferierenden Komplex, bewirken [250]. Diese Wirkweisen könnten man sich bei onkogen wirkenden miRNAs, wie z.B. miRNA-9, zunutze machen. Diese miRNA wird als negativer Regulator des Östrogenrezeptors beschrieben [122], was ebenfalls durch die Ergebnisse einer negativen Korrelation der miRNA-9-Expression mit dem Östrogenrezeptor der vorliegenden Arbeit untermauert werden kann. Mithilfe des Einsatzes einer anti-miRNA-9 könnte die Östrogenrezeptordichte auf den Tumorzellen erhöht und der Tumor somit für die Therapie mit selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM), wie Tamoxifen, sensibilisiert werden. Hier müsste jedoch zuerst *in vitro* ein tumorwachstumsfördernder Effekt durch die anti-miRNA-9-vermittelte Hochregulation der Östrogenrezeptoren auf den Tumorzellen ausgeschlossen werden.

### 5.9 Methodenkritik

Tumorgewebe ist sehr heterogen aufgebaut [251]. Eine wie hier erfolgte Analyse von 10 µm dicken Gewebeschnitten kann also nicht die Gesamtheit der miRNA-Expression des Tumors allumfassend widerspiegeln. Daher wäre eine Variation der Ergebnisse bei Verwendung anderer Gewebeschnitte des gleichen Tumors nicht auszuschließen.

Die Zeit der Lagerung der Paraffinschnitte könnte einen Einfluss auf die Menge der isolierten miRNAs gehabt haben. Boisen et al. zeigten, dass eine längere Aufbewahrungsdauer von Paraffin-fixiertem Pankreas-Karzinomgewebe einen signifikanten Effekt auf die miRNA-Expressionslevel hatte [252]. Die Lagerungszeit der verwendeten Gewebeproben variierte zwischen einem und 18 Jahren. Die Verwendung frischen Tumorgewebes könnte bezüglich der verringerten Expressionslevel infolge einer verlängerten Lagerungszeit von Vorteil sein. Grundsätzlich konnte aber kein signifikanter Unterschied bei der Expressionsanalyse

verschiedener miRNAs in frischem und Formalin-fixiertem Paraffingewebe gezeigt werden [253, 254]. Daher erscheint die Verwendung von Paraffingewebe, welches eine möglichst kurze Lagerungszeit aufweist, am sinnvollsten, da sich Paraffingewebe durch eine breite Verfügbarkeit in vielen Biobanken auszeichnet.

Die Verwendung von Paraffingewebe, welches eine möglichst kurze Lagerungszeit aufwies, bedingte im Rahmen der Nachverfolgung der Patientinnen eine kürzere *Follow Up*-Zeit als allgemein üblich. Die mediane Nachbeobachtungsdauer beträgt in der vorliegenden Arbeit 2,6 Jahre. Im Hinblick auf die mediane Zeit bis zur Entwicklung eines Lokalrezidivs von 2,7 Jahren scheint ein erneutes Erheben des *Follow Ups* nach z.B. insgesamt 5 Jahren höchst sinnvoll zu sein. Hieraus könnten sich neue Erkenntnisse bezüglich der prognostischen Aussagekraft der miRNA-Expression im Hinblick auf die Progression des Mamma-Karzinoms ergeben.

### 5.10 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Expression von sechs miRNAs auf die Progression des Mamma-Karzinoms untersucht. Es zeigte sich, dass die Expressionslevel der miRNAs mit einigen Merkmalen des Tumors signifikant korrelieren. Bei einer hohen Expression von miRNA-210 konnte zudem ein signifikanter Effekt auf das Lokalrezidiv-freie Überleben von Brustkrebs-Patientinnen beobachtet werden. Daher bietet sich die weitere Evaluation von miRNA-210 als mögliches *Screening*-Instrument im Hinblick auf das Auftreten von Lokalrezidiven an. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit von Blutproben sollte der Fokus der Untersuchungen auf der Expressionsanalyse von miRNAs im Blutplasma liegen. Die Isolation von miRNAs aus Blutplasma ist prinzipiell möglich [235]. In den nachfolgenden Versuchen sollte geklärt werden, ob die vorliegenden Ergebnisse mit der miRNA-Expression im Blutplasma der betroffenen Patientinnen übereinstimmen. Plasmaproben aller Patientinnen, deren Tumorgewebe untersucht wurde, liegen vor und könnten zu diesem Zweck verwendet werden. Der Vorteil dieser *Screening*-Methode wäre die Möglichkeit des kontinuierlichen Monitorings der Patientinnen und der möglichst frühen Einleitung einer adäquaten Therapie.

Die Hochregulation von miRNA-210 in Lokalrezidiven nach erfolgter Chemotherapie-Gabe bei der Primärtumor-Therapie gibt Anlass dazu, den Zusammenhang eines hypoxischen Tumormilieus und der wechselseitigen Beeinflussung von HIF-1 $\alpha$  und miRNA-210 weiter zu untersuchen [204, 205].

Ebenso muss die Möglichkeit eines therapeutischen Einsatzes von miRNAs untersucht werden. Einen guten Ansatz in diesem Kontext bietet miRNA-375. Es zeigte sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation des Östrogenrezeptor-Status mit dem Expressionslevel von miRNA-375. Vorhergehende Studien beschrieben eine indirekte, positive Regulation von ER  $\alpha$  durch miRNA-375 [164]. Besonders bei *triple-negativen* Mamma-Karzinomen, welche eine vergleichsweise schlechte Prognose aufgrund der eingeschränkten Therapiezugänglichkeit haben [28], könnte ein therapeutischer Einsatz von miRNAs zur Erhöhung der Sensibilität gegenüber einer endokrinen Therapie eine weitreichende Prognoseverbesserung bewirken.

Außerdem sollte die Expression von miRNA-10b in Mamma-Karzinomen nochmal genau untersucht werden, da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Gegensatz zu den Erkenntnissen vorhergehender Studien stehen. Die vorliegenden Ergebnisse lassen allesamt einen vorteilhaften Zusammenhang einer hohen miRNA-10b-Expression bezüglich der Tumormerkmale und der Prognose von Brustkrebs vermuten, während in der Literatur ein schlechteres *Outcome* bei hohen miRNA-10b-Expressionsleveln beobachtet wurde [124, 130].

Die hier vorgeschlagenen anschließenden Untersuchungen könnten dazu beitragen, das Auftreten von Lokalrezidiven früher zu erkennen und den Patientenkomfort durch Reduzierung der Invasivität diagnostischer Maßnahmen zu erhöhen.

## 6 Zusammenfassung

Jährlich erkranken etwa 70.000 Menschen in Deutschland an Brustkrebs. Das Mamma-Karzinom ist mit einem Anteil von ca. 30% aller Krebserkrankungen die häufigste Tumorerkrankung bei Frauen. Sobald bei einer Frau ein Lokalrezidiv auftritt, verringert sich das 5-Jahres-Überleben von 88% auf etwa 50-65%. Es sind verschiedene Risikofaktoren für die Entstehung eines Lokalrezidivs bekannt. Dazu zählen unter anderem ein junges Alter bei Erstdiagnose, ein hohes *Grading* des Primärtumors, eine postoperative R1-Situation und eine ausgebliebene Bestrahlung der Restbrust nach erfolgter Brust-erhaltender Therapie. Da ca. 30% der Patientinnen bei Erstdiagnose jünger als 55 Jahre alt sind, ist es wichtig, Einflussfaktoren für die Progression des Mamma-Karzinoms zu kennen. Zudem ist es sinnvoll, *Screening*-Instrumente zu entwickeln, um das Risiko des Auftretens von Lokalrezidiven zuverlässig und frühzeitig abschätzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit sollte hierzu der Zusammenhang der Expression von miRNAs und dem *Outcome* von Brustkrebs-Patientinnen untersucht werden. Es wurden 6 miRNAs ausgewählt, deren Expressionslevel in Mamma-Karzinomen in vorhergehenden Studien als dysreguliert beschrieben und denen progressions-fördernde Eigenschaften zugeschrieben wurden. Die Expression dieser 6 miRNAs wurde im Brustkrebsgewebe von Mamma-Karzinom-Patientinnen der Universitätsmedizin Mainz untersucht und mit dem *Follow Up* der Patientinnen korreliert. Hierzu erfolgte die Isolation von Gesamt-RNA einschließlich der miRNA aus Paraffingewebeschnitten von Primärtumoren, befallenen Lymphknoten und Lokalrezidiven. Mittels einer qRT-PCR erfolgte die Analyse der Expressionslevel von 6 miRNAs: miRNA-9, miRNA-10b, miRNA-21, miRNA-181a, miRNA-210 und miRNA-375.

Es zeigten sich signifikante Korrelationen der miRNA-Expressionslevel im Primarius mit Tumormerkmalen, wie z.B. *Grading*, ER- und PR-Status und HER2-Status. Zudem korrelierte die Expression von 3 miRNAs im Primärtumor signifikant mit dem Auftreten eines Lokalrezidivs im Verlauf der Erkrankung. Bei hohen Expressionsleveln von miRNA-181a und miRNA-210 und niedriger miRNA-10b-Expression trat häufiger ein Lokalrezidiv auf. Eine Kaplan-Meier-Analyse des Lokalrezidiv-freien Überlebens in

Abhängigkeit der miRNA-210-Expression zeigte einen signifikanten Unterschied. Diese Ergebnisse geben Anlass dazu, miRNA-210 im Hinblick auf die Nutzung als *Screening*-Parameter für Lokalrezidive weiter zu untersuchen. Da eine signifikante Überexpression von miRNA-210 in Lokalrezidiven nach Chemotherapie-Gabe bei der Primärtumordiagnose gezeigt wurde, sollte auch der Einfluss eines hypoxischen Tumormilieus und dem daraus folgenden positiven *Feedback*-Mechanismus von HIF-1 $\alpha$  und miRNA-210 bezüglich der möglichen Progression des Mamma-Karzinoms und der Entstehung eines Lokalrezidivs untersucht werden. Außerdem wurden signifikante Korrelationen von 4 miRNAs (miRNA-9, miRNA-10b, miRNA-210 und miRNA-375) mit dem Östrogenrezeptorstatus beobachtet. Dies gibt Anlass zu Überlegungen, die entsprechenden miRNAs als therapeutische *Targets* oder die miRNA selbst als Therapieform zu betrachten. Insbesondere die in der Literatur beschriebene positive Regulation des Östrogenrezeptors durch miRNA-375, welche mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen, sollte Anlass für weitere Analysen bezüglich des möglichen Einsatzes dieser miRNA zur Erhöhung der Sensibilität für endokrine Therapien des Mamma-Karzinoms geben.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. *Krebs in Deutschland für 2013/2014*. 2017;11. Ausgabe.
2. Hanahan D., Weinberg R. A. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. 2011;144(5):646-674.
3. Fisher B., Anderson S., Bryant J., Margolese R. G., Deutsch M., Fisher E. R., Jeong J. H., Wolmark N. *Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer*. N Engl J Med. 2002;347(16):1233-1241.
4. Antoniadis Sophie. *Facharztwissen Gynäkologie*. In: Fehm T, Hancke K, Scholz C, Janni W, Rack B, editors. 2. Auflage ed. München2017.
5. Lannin D. R., Haffty B. G. *End results of salvage therapy after failure of breast-conservation surgery*. Oncology (Williston Park). 2004;18(3):272-279; discussion 280-272, 285-276, 292.
6. Committee AGO Breast. *Diagnosis and Treatment of Patients with Primary and Metastatic Breast Cancer. Recommendations 2019*. 2019 Abgerufen am 23.08.2019. Verfügbar auf [www.ago-online.de](http://www.ago-online.de).
7. Untch M., Harbeck N., Thomssen C. *Colloquium Senologie 2017/2018*. München2017.
8. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell. 1993;75(5):843-854.
9. Lau N. C., Lim L. P., Weinstein E. G., Bartel D. P. *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science. 2001;294(5543):858-862.
10. *miRBase: the microRNA database* abgerufen am: 05.05.2022. Verfügbar auf <http://www.mirbase.org/>.
11. 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. *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(9):2999-3004.
12. Mens M. M. J., Ghanbari M. *Cell Cycle Regulation of Stem Cells by MicroRNAs*. Stem Cell Rev Rep. 2018;14(3):309-322.
13. Iorio M. V., Ferracin M., Liu C. G., Veronese A., Spizzo R., Sabbioni S., Magri E., Pedriali M., Fabbri M., Campiglio M., Menard S., Palazzo J. P., Rosenberg A., Musiani P., Volinia S., Nenci I., Calin G. A., Querzoli P., Negrini M., Croce C. M. *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer Res. 2005;65(16):7065-7070.



14. Sun H., Shao Y., Huang J., Sun S., Liu Y., Zhou P., Yang H. *Prognostic value of microRNA-9 in cancers: a systematic review and meta-analysis*. *Oncotarget*. 2016;7(41):67020-67032.
15. Rothe F., Ignatiadis M., Chaboteaux C., Haibe-Kains B., Kheddoumi N., Majjaj S., Badran B., Fayyad-Kazan H., Desmedt C., Harris A. L., Piccart M., Sotiriou C. *Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer*. *PLoS One*. 2011;6(6):e20980.
16. Merino Bonilla J. A., Torres Tabanera M., Ros Mendoza L. H. *Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies*. *Radiologia*. 2017;59(5):368-379.
17. Robert-Koch-Institut. *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016.
18. Beral V., Million Women Study Collaborators. *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. *Lancet*. 2003;362(9382):419-427.
19. Group Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative, Key T. J., Appleby P. N., Reeves G. K., Travis R. C., Alberg A. J., Barricarte A., Berrino F., Krogh V., Sieri S., Brinton L. A., Dorgan J. F., Dossus L., Dowsett M., Eliassen A. H., Fortner R. T., Hankinson S. E., Helzlsouer K. J., Hoff man-Bolton J., Comstock G. W., Kaaks R., Kahle L. L., Muti P., Overvad K., Peeters P. H., Riboli E., Rinaldi S., Rollison D. E., Stanczyk F. Z., Trichopoulos D., Tworoger S. S., Vineis P. *Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies*. *Lancet Oncol*. 2013;14(10):1009-1019.
20. Danaei G., Vander Hoorn S., Lopez A. D., Murray C. J., Ezzati M., Comparative Risk Assessment collaborating group. *Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors*. *Lancet*. 2005;366(9499):1784-1793.
21. Hamajima N., Hirose K., Tajima K., Rohan T., Calle E. E., Heath C. W., Jr., Coates R. J., Liff J. M., Talamini R., Chantarakul N., Koetsawang S., Rachawat D., Morabia A., Schuman L., Stewart W., Szklo M., Bain C., Schofield F., Siskind V., Band P., Coldman A. J., Gallagher R. P., Hislop T. G., Yang P., Kolonel L. M., Nomura A. M., Hu J., Johnson K. C., Mao Y., De Sanjose S., Lee N., Marchbanks P., Ory H. W., Peterson H. B., Wilson H. G., Wingo P. A., Ebeling K., Kunde D., Nishan P., Hopper J. L., Colditz G., Gajalanski V., Martin N., Pardthaisong T., Silpisornkosol S., Theetranont C., Boosiri B., Chutivongse S., Jimakorn P., Virutamasen P., Wongsrichanalai C., Ewertz M., Adami H. O., Bergkvist L., Magnusson C., Persson I., Chang-Claude J., Paul C., Skegg D. C., Spears G. F., Boyle P., Evstifeeva T., Daling J. R., Hutchinson W. B., Malone K., Noonan E. A., Stanford J. L., Thomas D. B., Weiss N. S., White E., Andrieu N., Bremond A., Clavel F., Gairard B., Lansac J., Piana L., Renaud R., Izquierdo A., Viladiu P., Cuevas H. R., Ontiveros P., Palet A., Salazar S. B., Aristizabel N., Cuadros A., Tryggvadottir L., Tulinius H., Bachelot A., Le M. G., Peto J., Franceschi S., Lubin F., Modan B., Ron E., Wax Y., Friedman G. D., Hiatt R. A.,

- Levi F., Bishop T., Kosmelj K., Primic-Zakelj M., Ravnihar B., Stare J., Beeson W. L., Fraser G., Bullbrook R. D., Cuzick J., Duffy S. W., Fentiman I. S., Hayward J. L., Wang D. Y., McMichael A. J., McPherson K., Hanson R. L., Leske M. C., Mahoney M. C., Nasca P. C., Varma A. O., Weinstein A. L., Moller T. R., Olsson H., Ranstam J., Goldbohm R. A., van den Brandt P. A., Apelo R. A., Baens J., de la Cruz J. R., Javier B., Lacaya L. B., Ngelangel C. A., La Vecchia C., Negri E., Marubini E., Ferraroni M., Gerber M., Richardson S., Segala C., Gatei D., Kenya P., Kungu A., Mati J. G., Brinton L. A., Hoover R., Schairer C., Spirtas R., Lee H. P., Rookus M. A., van Leeuwen F. E., Schoenberg J. A., McCredie M., Gammon M. D., Clarke E. A., Jones L., Neil A., Vessey M., Yeates D., Appleby P., Banks E., Beral V., Bull D., Crossley B., Goodill A., Green J., Hermon C., Key T., Langston N., Lewis C., Reeves G., Collins R., Doll R., Peto R., Mabuchi K., Preston D., Hannaford P., Kay C., Rosero-Bixby L., Gao Y. T., Jin F., Yuan J. M., Wei H. Y., Yun T., Zhiheng C., Berry G., Cooper Booth J., Jelihovsky T., MacLennan R., Shearman R., Wang Q. S., Baines C. J., Miller A. B., Wall C., Lund E., Stalsberg H., Shu X. O., Zheng W., Katsouyanni K., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Dabancens A., Martinez L., Molina R., Salas O., Alexander F. E., Anderson K., Folsom A. R., Hulka B. S., Bernstein L., Enger S., Haile R. W., Paganini-Hill A., Pike M. C., Ross R. K., Ursin G., Yu M. C., Longnecker M. P., Newcomb P., Bergkvist L., Kalache A., Farley T. M., Holck S., Meirik O., Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease*. Br J Cancer. 2002;87(11):1234-1245.
22. Lopez-Urrutia E., Salazar-Rojas V., Brito-Elias L., Coca-Gonzalez M., Silva-Garcia J., Sanchez-Marin D., Campos-Parra A. D., Perez-Plasencia C. *BRCA mutations: is everything said?* Breast Cancer Res Treat. 2019;173(1):49-54.
23. McCormack V. A., dos Santos Silva I. *Breast density and parenchymal patterns as markers of breast cancer risk: a meta-analysis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(6):1159-1169.
24. Page D. L., Schuyler P. A., Dupont W. D., Jensen R. A., Plummer W. D., Jr., Simpson J. F. *Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study*. Lancet. 2003;361(9352):125-129.
25. Sun Y. S., Zhao Z., Yang Z. N., Xu F., Lu H. J., Zhu Z. Y., Shi W., Jiang J., Yao P. P., Zhu H. P. *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. Int J Biol Sci. 2017;13(11):1387-1397.
26. Brierley James, Gospodarowicz M. K., Wittekind Ch. *TNM classification of malignant tumours*. Eighth edition. ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2017.
27. Blohmer Jens- U., David Matthias, Henrich Wolfgang, Sehouli J., Charité (Hospital : Berlin Germany). *Charité Compendium Gynäkologie*. Berlin ; Boston: De Gruyter; 2018. p. 343.

28. Böcker Werner, Denk Helmut , Heitz Philipp U., Höfler Gerald, Kreipe Hans, Moch Holger. *Pathologie*. 5. Auflage ed. München: Elsevier, Urban & Fisher; 2012. p. 1064.
29. Riede Ursus-Nikolaus, Werner Martin. *Allgemeine und Spezielle Pathologie*. 2. Auflage ed. Berlin: Springer; 2017. p. 893.
30. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft Deutsche Krebshilfe, AWMF). *S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* 2018. AWMF Registernummer: 032-045OL. Abgerufen am 21.08.2019. Version 4.1:[Verfügbar auf <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>].
31. Weyerstahl Thomas, Stauber Manfred, Andergassen Ulrich. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 4. Auflage ed. Stuttgart: Thieme; 2013. p. 732.
32. Steller Joachim, Valet Axel, Goerke Kay, Dormann Arno. *Klinikleitfaden Gynäkologie Geburtshilfe*. 10. Auflage ed. München: Elsevier Urban & Fisher; 2018. p. 710.
33. Veronesi U., Boyle P., Goldhirsch A., Orecchia R., Viale G. *Breast cancer*. Lancet. 2005;365(9472):1727-1741.
34. Mammographie Kooperationsgemeinschaft. *Jahresbericht Evaluation 2016. Deutsches Mammographie-Screening-Programm*. Berlin 2018.
35. Clarke M., Collins R., Darby S., Davies C., Elphinstone P., Evans V., Godwin J., Gray R., Hicks C., James S., MacKinnon E., McGale P., McHugh T., Peto R., Taylor C., Wang Y., Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet. 2005;366(9503):2087-2106.
36. Bartelink H., Maingon P., Poortmans P., Weltens C., Fourquet A., Jager J., Schinagel D., Oei B., Rodenhuis C., Horiot J. C., Struikmans H., Van Limbergen E., Kirova Y., Elkhuizen P., Bongartz R., Miralbell R., Morgan D., Dubois J. B., Remouchamps V., Mirimanoff R. O., Collette S., Collette L., European Organisation for Research, Treatment of Cancer Radiation Oncology, Breast Cancer Groups. *Whole-breast irradiation with or without a boost for patients treated with breast-conserving surgery for early breast cancer: 20-year follow-up of a randomised phase 3 trial*. Lancet Oncol. 2015;16(1):47-56.
37. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Peto R., Davies C., Godwin J., Gray R., Pan H. C., Clarke M., Cutter D., Darby S., McGale P., Taylor C., Wang Y. C., Bergh J., Di Leo A., Albain K., Swain S., Piccart M., Pritchard K. *Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer: meta-analyses of long-term outcome among 100,000 women in 123 randomised trials*. Lancet. 2012;379(9814):432-444.

38. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials*. Lancet. 2005;365(9472):1687-1717.
39. Cuzick J., Sestak I., Baum M., Buzdar A., Howell A., Dowsett M., Forbes J. F., investigators Atac Latte. *Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial*. Lancet Oncol. 2010;11(12):1135-1141.
40. Curigliano G., Burstein H. J., Winer E. P., Gnant M., Dubsy P., Loibl S., Colleoni M., Regan M. M., Piccart-Gebhart M., Senn H. J., Thurlimann B., St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer, Andre F., Baselga J., Bergh J., Bonnefoi H., Brucker S. Y., Cardoso F., Carey L., Ciruelos E., Cuzick J., Denkert C., Di Leo A., Ejlertsen B., Francis P., Galimberti V., Garber J., Gulluoglu B., Goodwin P., Harbeck N., Hayes D. F., Huang C. S., Huober J., Hussein K., Jassem J., Jiang Z., Karlsson P., Morrow M., Orecchia R., Osborne K. C., Pagani O., Partridge A. H., Pritchard K., Ro J., Rutgers E. J. T., Sedlmayer F., Semiglazov V., Shao Z., Smith I., Toi M., Tutt A., Viale G., Watanabe T., Whelan T. J., Xu B. *De-escalating and escalating treatments for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Expert Consensus Conference on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2017*. Ann Oncol. 2017;28(8):1700-1712.
41. (TRM) Tumorregister München. *ICD-10 C50: Mammakarzinom (Frauen). Survival*. 2017 Abgerufen am 22.08.2019. Verfügbar auf [https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC50f\\_G-ICD-10-C50-Mammakarzinom-Frauen-Survival.pdf](https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/sC50f_G-ICD-10-C50-Mammakarzinom-Frauen-Survival.pdf).
42. Inwald E. C., Klinkhammer-Schalke M., Hofstadter F., Zeman F., Koller M., Gerstenhauer M., Ortmann O. *Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry*. Breast Cancer Res Treat. 2013;139(2):539-552.
43. Harbeck N., Schmitt M., Meisner C., Friedel C., Untch M., Schmidt M., Sweep C. G., Lisboa B. W., Lux M. P., Beck T., Hasmuller S., Kiechle M., Janicke F., Thomssen C., Chemo N. Study Group. *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*. Eur J Cancer. 2013;49(8):1825-1835.
44. Look M. P., van Putten W. L., Duffy M. J., Harbeck N., Christensen I. J., Thomssen C., Kates R., Spyrtos F., Ferno M., Eppenberger-Castori S., Sweep C. G., Ulm K., Peyrat J. P., Martin P. M., Magdelenat H., Brunner N., Duggan C., Lisboa B. W., Bendahl P. O., Quillien V., Daver A., Ricolleau G., Meijer-van Gelder M. E., Manders P., Fiets W. E., Blankenstein M. A., Broet P., Romain S., Daxenbichler G., Windbichler G., Cufer T., Borstnar S., Kueng W., Beex L. V., Klijn J. G., O'Higgins N., Eppenberger U., Janicke F., Schmitt M., Foekens J. A. *Pooled analysis of prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in 8377 breast cancer patients*. J Natl Cancer Inst. 2002;94(2):116-128.

45. Wong S. M., Golshan M. *Management of In-Breast Tumor Recurrence*. Ann Surg Oncol. 2018;25(10):2846-2851.
46. Smith T. E., Lee D., Turner B. C., Carter D., Haffty B. G. *True recurrence vs. new primary ipsilateral breast tumor relapse: an analysis of clinical and pathologic differences and their implications in natural history, prognoses, and therapeutic management*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000;48(5):1281-1289.
47. Colleoni M., Sun Z., Price K. N., Karlsson P., Forbes J. F., Thurlimann B., Gianni L., Castiglione M., Gelber R. D., Coates A. S., Goldhirsch A. *Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V*. J Clin Oncol. 2016;34(9):927-935.
48. Morrow M. *Personalizing extent of breast cancer surgery according to molecular subtypes*. Breast. 2013;22 Suppl 2:S106-109.
49. Vicini F. A., Kestin L., Huang R., Martinez A. *Does local recurrence affect the rate of distant metastases and survival in patients with early-stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy?* Cancer. 2003;97(4):910-919.
50. Arciero C., Thompson P., Meisel J. L., Taylor C. E., Torres M. A., Wood W. C. *Multidisciplinary Approaches to Chest Wall Recurrences of Breast Cancer*. Oncology (Williston Park). 2018;32(8):392-396, 417.
51. Wapnir I. L., Price K. N., Anderson S. J., Robidoux A., Martin M., Nortier J. W. R., Paterson A. H. G., Rimawi M. F., Lang I., Baena-Canada J. M., Thurlimann B., Mamounas E. P., Geyer C. E., Jr., Gelber S., Coates A. S., Gelber R. D., Rastogi P., Regan M. M., Wolmark N., Aebi S., International Breast Cancer Study Group, Nrg Oncology Geicam Spanish Breast Cancer Group Boog Dutch Breast Cancer Trialists' Group, Breast International Group. *Efficacy of Chemotherapy for ER-Negative and ER-Positive Isolated Locoregional Recurrence of Breast Cancer: Final Analysis of the CALOR Trial*. J Clin Oncol. 2018;36(11):1073-1079.
52. Tay T. K. Y., Tan P. H. *Liquid Biopsy in Breast Cancer: A Focused Review*. Arch Pathol Lab Med. 2021;145(6):678-686.
53. Ebeling F. G., Stieber P., Untch M., Nagel D., Konecny G. E., Schmitt U. M., Fateh-Moghadam A., Seidel D. *Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer*. Br J Cancer. 2002;86(8):1217-1222.
54. Hall C., Clarke L., Pal A., Buchwald P., Eglinton T., Wakeman C., Frizelle F. *A Review of the Role of Carcinoembryonic Antigen in Clinical Practice*. Ann Coloproctol. 2019;35(6):294-305.
55. Ibrahim A. M., Said M. M., Hilal A. M., Medhat A. M., Abd Elsalam I. M. *Candidate circulating microRNAs as potential diagnostic and predictive biomarkers for the monitoring of locally advanced breast cancer patients*. Tumour Biol. 2020;42(10):1010428320963811.

56. Wightman B., Ha I., Ruvkun G. *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell. 1993;75(5):855-862.
57. Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G. *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature. 2000;403(6772):901-906.
58. Pasquinelli A. E., Reinhart B. J., Slack F., Martindale M. Q., Kuroda M. I., Maller B., Hayward D. C., Ball E. E., Degnan B., Muller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G. *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature. 2000;408(6808):86-89.
59. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T. *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science. 2001;294(5543):853-858.
60. Lee R. C., Ambros V. *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science. 2001;294(5543):862-864.
61. Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L., Bradley A. *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res. 2004;14(10A):1902-1910.
62. Aravin A. A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., Zavolan M., Marks D., Snyder B., Gaasterland T., Meyer J., Tuschl T. *The small RNA profile during Drosophila melanogaster development*. Dev Cell. 2003;5(2):337-350.
63. Filipowicz W., Bhattacharyya S. N., Sonenberg N. *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet. 2008;9(2):102-114.
64. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K. H., Lee S., Baek S. H., Kim V. N. *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J. 2004;23(20):4051-4060.
65. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V. N. *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature. 2003;425(6956):415-419.
66. Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N. *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J. 2002;21(17):4663-4670.
67. Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev. 2003;17(24):3011-3016.
68. Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A. E., Balint E., Tuschl T., Zamore P. D. *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science. 2001;293(5531):834-838.

69. Grishok A., Pasquinelli A. E., Conte D., Li N., Parrish S., Ha I., Baillie D. L., Fire A., Ruvkun G., Mello C. C. *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing.* Cell. 2001;106(1):23-34.
70. Ketting R. F., Fischer S. E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G. J., Plasterk R. H. *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans.* Genes Dev. 2001;15(20):2654-2659.
71. Diederichs S., Haber D. A. *Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression.* Cell. 2007;131(6):1097-1108.
72. Hutvagner G., Zamore P. D. *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.* Science. 2002;297(5589):2056-2060.
73. Grimson A., Farh K. K., Johnston W. K., Garrett-Engele P., Lim L. P., Bartel D. P. *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.* Mol Cell. 2007;27(1):91-105.
74. Lewis B. P., Shih I. H., Jones-Rhoades M. W., Bartel D. P., Burge C. B. *Prediction of mammalian microRNA targets.* Cell. 2003;115(7):787-798.
75. Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M., Song J. J., Hammond S. M., Joshua-Tor L., Hannon G. J. *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.* Science. 2004;305(5689):1437-1441.
76. Forman J. J., Legesse-Miller A., Collier H. A. *A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(39):14879-14884.
77. Ma E., MacRae I. J., Kirsch J. F., Doudna J. A. *Autoinhibition of human dicer by its internal helicase domain.* J Mol Biol. 2008;380(1):237-243.
78. Tang R., Li L., Zhu D., Hou D., Cao T., Gu H., Zhang J., Chen J., Zhang C. Y., Zen K. *Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system.* Cell Res. 2012;22(3):504-515.
79. Acunzo M., Romano G., Wernicke D., Croce C. M. *MicroRNA and cancer--a brief overview.* Adv Biol Regul. 2015;57:1-9.
80. Wang Y., Medvid R., Melton C., Jaenisch R., Blelloch R. *DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal.* Nat Genet. 2007;39(3):380-385.
81. Bernstein E., Kim S. Y., Carmell M. A., Murchison E. P., Alcorn H., Li M. Z., Mills A. A., Elledge S. J., Anderson K. V., Hannon G. J. *Dicer is essential for mouse development.* Nat Genet. 2003;35(3):215-217.

82. Shekar P. C., Naim A., Sarathi D. P., Kumar S. *Argonaute-2-null embryonic stem cells are retarded in self-renewal and differentiation.* J Biosci. 2011;36(4):649-657.
83. Schratt G. M., Tuebing F., Nigh E. A., Kane C. G., Sabatini M. E., Kiebler M., Greenberg M. E. *A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development.* Nature. 2006;439(7074):283-289.
84. Kole A. J., Swahari V., Hammond S. M., Deshmukh M. *miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis.* Genes Dev. 2011;25(2):125-130.
85. Griggs E. M., Young E. J., Rumbaugh G., Miller C. A. *MicroRNA-182 regulates amygdala-dependent memory formation.* J Neurosci. 2013;33(4):1734-1740.
86. Yi R., Poy M. N., Stoffel M., Fuchs E. *A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'.* Nature. 2008;452(7184):225-229.
87. Zhou B., Wang S., Mayr C., Bartel D. P., Lodish H. F. *miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(17):7080-7085.
88. Vigorito E., Perks K. L., Abreu-Goodger C., Bunting S., Xiang Z., Kohlhaas S., Das P. P., Miska E. A., Rodriguez A., Bradley A., Smith K. G., Rada C., Enright A. J., Toellner K. M., Maclennan I. C., Turner M. *microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells.* Immunity. 2007;27(6):847-859.
89. Cheng Y., Zhang C. *MicroRNA-21 in cardiovascular disease.* J Cardiovasc Transl Res. 2010;3(3):251-255.
90. Ikeda S., He A., Kong S. W., Lu J., Bejar R., Bodyak N., Lee K. H., Ma Q., Kang P. M., Golub T. R., Pu W. T. *MicroRNA-1 negatively regulates expression of the hypertrophy-associated calmodulin and Mef2a genes.* Mol Cell Biol. 2009;29(8):2193-2204.
91. Roggli E., Gattesco S., Caille D., Briet C., Boitard C., Meda P., Regazzi R. *Changes in microRNA expression contribute to pancreatic beta-cell dysfunction in prediabetic NOD mice.* Diabetes. 2012;61(7):1742-1751.
92. Kim J., Inoue K., Ishii J., Vanti W. B., Voronov S. V., Murchison E., Hannon G., Abeliovich A. *A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons.* Science. 2007;317(5842):1220-1224.
93. Sonkoly E., Wei T., Janson P. C., Saaf A., Lundeberg L., Tengvall-Linder M., Norstedt G., Alenius H., Homey B., Scheynius A., Stahle M., Pivarcsi A. *MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?* PLoS One. 2007;2(7):e610.
94. Stanczyk J., Pedrioli D. M., Brentano F., Sanchez-Pernaute O., Kolling C., Gay R. E., Detmar M., Gay S., Kyburz D. *Altered expression of MicroRNA in synovial*



- fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*. 2008;58(4):1001-1009.
95. Pauley K. M., Satoh M., Chan A. L., Bubb M. R., Reeves W. H., Chan E. K. *Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients*. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(4):R101.
  96. Nakasa T., Miyaki S., Okubo A., Hashimoto M., Nishida K., Ochi M., Asahara H. *Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue*. *Arthritis Rheum*. 2008;58(5):1284-1292.
  97. Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M. *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-15529.
  98. Merritt W. M., Lin Y. G., Han L. Y., Kamat A. A., Spannuth W. A., Schmandt R., Urbauer D., Pennacchio L. A., Cheng J. F., Nick A. M., Deavers M. T., Mourad-Zeidan A., Wang H., Mueller P., Lenburg M. E., Gray J. W., Mok S., Birrer M. J., Lopez-Berestein G., Coleman R. L., Bar-Eli M., Sood A. K. *Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer*. *N Engl J Med*. 2008;359(25):2641-2650.
  99. Zubor P., Kubatka P., Dankova Z., Gondova A., Kajo K., Hatok J., Samec M., Jagelkova M., Krivus S., Holubekova V., Bujnak J., Laucekova Z., Zelinova K., Stastny I., Nachajova M., Danko J., Golubnitschaja O. *miRNA in a multiomic context for diagnosis, treatment monitoring and personalized management of metastatic breast cancer*. *Future Oncol*. 2018;14(18):1847-1867.
  100. Ma L., Young J., Prabhala H., Pan E., Mestdagh P., Muth D., Teruya-Feldstein J., Reinhardt F., Onder T. T., Valastyan S., Westermann F., Speleman F., Vandesompele J., Weinberg R. A. *miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis*. *Nat Cell Biol*. 2010;12(3):247-256.
  101. Wang N., Chen P., Huang L. P., Wang T. Z. *Prognostic significance of microRNA-10b overexpression in breast cancer: a meta-analysis*. *Genet Mol Res*. 2016;15(2).
  102. 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. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257-2261.
  103. Ota D., Mimori K., Yokobori T., Iwatsuki M., Kataoka A., Masuda N., Ishii H., Ohno S., Mori M. *Identification of recurrence-related microRNAs in the bone marrow of breast cancer patients*. *Int J Oncol*. 2011;38(4):955-962.
  104. Toyama T., Kondo N., Endo Y., Sugiura H., Yoshimoto N., Iwasa M., Takahashi S., Fujii Y., Yamashita H. *High expression of microRNA-210 is an independent*

- factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients.* Jpn J Clin Oncol. 2012;42(4):256-263.
105. Zehentmayr F., Hauser-Kronberger C., Zellinger B., Hlubek F., Schuster C., Bodenhofer U., Fastner G., Deutschmann H., Steininger P., Reitsamer R., Fischer T., Sedlmayer F. *Hsa-miR-375 is a predictor of local control in early stage breast cancer.* Clin Epigenetics. 2016;8:28.
106. Amirfallah A., Knutsdottir H., Arason A., Hilmarsdottir B., Johannsson O. T., Agnarsson B. A., Barkardottir R. B., Reynisdottir I. *Hsa-miR-21-3p associates with breast cancer patient survival and targets genes in tumor suppressive pathways.* PLoS One. 2021;16(11):e0260327.
107. Tavanafar F., Safaralizadeh R., Hosseinpour-Feizi M. A., Mansoori B., Shanebandi D., Mohammadi A., Baradaran B. *Restoration of miR-143 expression could inhibit migration and growth of MDA-MB-468 cells through down-regulating the expression of invasion-related factors.* Biomed Pharmacother. 2017;91:920-924.
108. Shen R., Wang Y., Wang C. X., Yin M., Liu H. L., Chen J. P., Han J. Q., Wang W. B. *MiRNA-155 mediates TAM resistance by modulating SOCS6-STAT3 signalling pathway in breast cancer.* Am J Transl Res. 2015;7(10):2115-2126.
109. Wei Y., Lai X., Yu S., Chen S., Ma Y., Zhang Y., Li H., Zhu X., Yao L., Zhang J. *Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells.* Breast Cancer Res Treat. 2014;147(2):423-431.
110. Miska E. A., Alvarez-Saavedra E., Townsend M., Yoshii A., Sestan N., Rakic P., Constantine-Paton M., Horvitz H. R. *Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain.* Genome Biol. 2004;5(9):R68.
111. Sempere L. F., Freemantle S., Pitha-Rowe I., Moss E., Dmitrovsky E., Ambros V. *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation.* Genome Biol. 2004;5(3):R13.
112. Krichevsky A. M., Sonntag K. C., Isacson O., Kosik K. S. *Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis.* Stem Cells. 2006;24(4):857-864.
113. Coolen M., Thieffry D., Drivenes O., Becker T. S., Bally-Cuif L. *miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors.* Dev Cell. 2012;22(5):1052-1064.
114. Leucht C., Stigloher C., Wizenmann A., Klafke R., Folchert A., Bally-Cuif L. *MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary.* Nat Neurosci. 2008;11(6):641-648.
115. Bonev B., Stanley P., Papalopulu N. *MicroRNA-9 Modulates Hes1 ultradian oscillations by forming a double-negative feedback loop.* Cell Rep. 2012;2(1):10-18.

116. Kageyama R., Ohtsuka T., Kobayashi T. *Roles of Hes genes in neural development*. Dev Growth Differ. 2008;50 Suppl 1:S97-103.
117. Shibata M., Nakao H., Kiyonari H., Abe T., Aizawa S. *MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by targeting multiple transcription factors*. J Neurosci. 2011;31(9):3407-3422.
118. Coolen M., Katz S., Bally-Cuif L. *miR-9: a versatile regulator of neurogenesis*. Front Cell Neurosci. 2013;7:220.
119. Lu M. H., Huang C. C., Pan M. R., Chen H. H., Hung W. C. *Prospero homeobox 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells by inhibiting E-cadherin via miR-9*. Clin Cancer Res. 2012;18(23):6416-6425.
120. Rotkrua P., Akiyama Y., Hashimoto Y., Otsubo T., Yuasa Y. *MiR-9 downregulates CDX2 expression in gastric cancer cells*. Int J Cancer. 2011;129(11):2611-2620.
121. Wilting S. M., Snijders P. J., Verlaat W., Jaspers A., van de Wiel M. A., van Wieringen W. N., Meijer G. A., Kenter G. G., Yi Y., le Sage C., Agami R., Meijer C. J., Steenbergen R. D. *Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis*. Oncogene. 2013;32(1):106-116.
122. Pillai M. M., Gillen A. E., Yamamoto T. M., Kline E., Brown J., Flory K., Hesselberth J. R., Kabos P. *HITS-CLIP reveals key regulators of nuclear receptor signaling in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat. 2014;146(1):85-97.
123. Sheedy P., Medarova Z. *The fundamental role of miR-10b in metastatic cancer*. Am J Cancer Res. 2018;8(9):1674-1688.
124. Ma L., Teruya-Feldstein J., Weinberg R. A. *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. Nature. 2007;449(7163):682-688.
125. Li G., Wu Z., Peng Y., Liu X., Lu J., Wang L., Pan Q., He M. L., Li X. P. *MicroRNA-10b induced by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 promotes the metastasis of human nasopharyngeal carcinoma cells*. Cancer Lett. 2010;299(1):29-36.
126. Xiao H., Li H., Yu G., Xiao W., Hu J., Tang K., Zeng J., He W., Zeng G., Ye Z., Xu H. *MicroRNA-10b promotes migration and invasion through KLF4 and HOXD10 in human bladder cancer*. Oncol Rep. 2014;31(4):1832-1838.
127. Liu Y., Zhao J., Zhang P. Y., Zhang Y., Sun S. Y., Yu S. Y., Xi Q. S. *MicroRNA-10b targets E-cadherin and modulates breast cancer metastasis*. Med Sci Monit. 2012;18(8):BR299-308.
128. Min W., Wang B., Li J., Han J., Zhao Y., Su W., Dai Z., Wang X., Ma Q. *The expression and significance of five types of miRNAs in breast cancer*. Med Sci Monit Basic Res. 2014;20:97-104.

129. Huang Q., Song Q., Zhong W., Chen Y., Liang L. *MicroRNA-10b and the clinical outcomes of various cancers: A systematic review and meta-analysis*. Clin Chim Acta. 2017;474:14-22.
130. Eissa S., Matboli M., Shehata H. H., Essawy N. O. *MicroRNA-10b and minichromosome maintenance complex component 5 gene as prognostic biomarkers in breast cancer*. Tumour Biol. 2015;36(6):4487-4494.
131. Si M. L., Zhu S., Wu H., Lu Z., Wu F., Mo Y. Y. *miR-21-mediated tumor growth*. Oncogene. 2007;26(19):2799-2803.
132. Chan J. A., Krichevsky A. M., Kosik K. S. *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res. 2005;65(14):6029-6033.
133. Loffler D., Brocke-Heidrich K., Pfeifer G., Stocsits C., Hackermuller J., Kretzschmar A. K., Burger R., Gramatzki M., Blumert C., Bauer K., Cvijic H., Ullmann A. K., Stadler P. F., Horn F. *Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer*. Blood. 2007;110(4):1330-1333.
134. Zhu S., Wu H., Wu F., Nie D., Sheng S., Mo Y. Y. *MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis*. Cell Res. 2008;18(3):350-359.
135. Hatley M. E., Patrick D. M., Garcia M. R., Richardson J. A., Bassel-Duby R., van Rooij E., Olson E. N. *Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21*. Cancer Cell. 2010;18(3):282-293.
136. Buscaglia L. E., Li Y. *Apoptosis and the target genes of microRNA-21*. Chin J Cancer. 2011;30(6):371-380.
137. Wang P., Zou F., Zhang X., Li H., Dulak A., Tomko R. J., Jr., Lazo J. S., Wang Z., Zhang L., Yu J. *microRNA-21 negatively regulates Cdc25A and cell cycle progression in colon cancer cells*. Cancer Res. 2009;69(20):8157-8165.
138. Lu Z., Liu M., Stribinskis V., Klinge C. M., Ramos K. S., Colburn N. H., Li Y. *MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene*. Oncogene. 2008;27(31):4373-4379.
139. Meng F., Henson R., Lang M., Wehbe H., Maheshwari S., Mendell J. T., Jiang J., Schmittgen T. D., Patel T. *Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines*. Gastroenterology. 2006;130(7):2113-2129.
140. Meng F., Henson R., Wehbe-Janek H., Ghoshal K., Jacob S. T., Patel T. *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology. 2007;133(2):647-658.
141. Yang C. H., Yue J., Fan M., Pfeffer L. M. *IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback on IFN-induced apoptosis*. Cancer Res. 2010;70(20):8108-8116.

142. Wang G., Wang L., Sun S., Wu J., Wang Q. *Quantitative measurement of serum microRNA-21 expression in relation to breast cancer metastasis in Chinese females*. Ann Lab Med. 2015;35(2):226-232.
143. Chen C. Z., Li L., Lodish H. F., Bartel D. P. *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. Science. 2004;303(5654):83-86.
144. Li Q. J., Chau J., Ebert P. J., Sylvester G., Min H., Liu G., Braich R., Manoharan M., Soutschek J., Skare P., Klein L. O., Davis M. M., Chen C. Z. *miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection*. Cell. 2007;129(1):147-161.
145. Kazenwadel J., Michael M. Z., Harvey N. L. *Prox1 expression is negatively regulated by miR-181 in endothelial cells*. Blood. 2010;116(13):2395-2401.
146. Henao-Mejia J., Williams A., Goff L. A., Staron M., Licona-Limon P., Kaech S. M., Nakayama M., Rinn J. L., Flavell R. A. *The microRNA miR-181 is a critical cellular metabolic rheostat essential for NKT cell ontogenesis and lymphocyte development and homeostasis*. Immunity. 2013;38(5):984-997.
147. Wang Y., Yu Y., Tsuyada A., Ren X., Wu X., Stubblefield K., Rankin-Gee E. K., Wang S. E. *Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM*. Oncogene. 2011;30(12):1470-1480.
148. Kastan M. B., Lim D. S. *The many substrates and functions of ATM*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2000;1(3):179-186.
149. Zhu Y., Wu J., Li S., Ma R., Cao H., Ji M., Jing C., Tang J. *The function role of miR-181a in chemosensitivity to adriamycin by targeting Bcl-2 in low-invasive breast cancer cells*. Cell Physiol Biochem. 2013;32(5):1225-1237.
150. Jiao X., Zhao L., Ma M., Bai X., He M., Yan Y., Wang Y., Chen Q., Zhao X., Zhou M., Cui Z., Zheng Z., Wang E., Wei M. *MiR-181a enhances drug sensitivity in mitoxantone-resistant breast cancer cells by targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Breast Cancer Res Treat. 2013;139(3):717-730.
151. Crosby M. E., Kulshreshtha R., Ivan M., Glazer P. M. *MicroRNA regulation of DNA repair gene expression in hypoxic stress*. Cancer Res. 2009;69(3):1221-1229.
152. Huang X., Ding L., Bennewith K. L., Tong R. T., Welford S. M., Ang K. K., Story M., Le Q. T., Giaccia A. J. *Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation*. Mol Cell. 2009;35(6):856-867.
153. Benson F. E., Baumann P., West S. C. *Synergistic actions of Rad51 and Rad52 in recombination and DNA repair*. Nature. 1998;391(6665):401-404.
154. Yoshino H., Yonemori M., Miyamoto K., Tatarano S., Kofuji S., Nohata N., Nakagawa M., Enokida H. *microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9*

- promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma.* Oncotarget. 2017;8(13):20881-20894.
155. Ren D., Yang Q., Dai Y., Guo W., Du H., Song L., Peng X. *Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF-kappaB signaling pathway.* Mol Cancer. 2017;16(1):117.
156. Gou D., Ramchandran R., Peng X., Yao L., Kang K., Sarkar J., Wang Z., Zhou G., Raj J. U. *miR-210 has an antiapoptotic effect in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2012;303(8):L682-691.
157. Volinia S., Galasso M., Sana M. E., Wise T. F., Palatini J., Huebner K., Croce C. M. *Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(8):3024-3029.
158. Shao B., Wang X., Zhang L., Li D., Liu X., Song G., Cao H., Zhu J., Li H. *Plasma microRNAs Predict Chemoresistance in Patients With Metastatic Breast Cancer.* Technol Cancer Res Treat. 2019;18:1533033819828709.
159. Poy M. N., Eliasson L., Krutzfeldt J., Kuwajima S., Ma X., Macdonald P. E., Pfeffer S., Tuschl T., Rajewsky N., Rorsman P., Stoffel M. *A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion.* Nature. 2004;432(7014):226-230.
160. El Ouaamari A., Baroukh N., Martens G. A., Lebrun P., Pipeleers D., van Obberghen E. *miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells.* Diabetes. 2008;57(10):2708-2717.
161. Ding L., Xu Y., Zhang W., Deng Y., Si M., Du Y., Yao H., Liu X., Ke Y., Si J., Zhou T. *MiR-375 frequently downregulated in gastric cancer inhibits cell proliferation by targeting JAK2.* Cell Res. 2010;20(7):784-793.
162. Kong K. L., Kwong D. L., Chan T. H., Law S. Y., Chen L., Li Y., Qin Y. R., Guan X. Y. *MicroRNA-375 inhibits tumour growth and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through repressing insulin-like growth factor 1 receptor.* Gut. 2012;61(1):33-42.
163. Yan J. W., Lin J. S., He X. X. *The emerging role of miR-375 in cancer.* Int J Cancer. 2014;135(5):1011-1018.
164. de Souza Rocha Simonini P., Breiling A., Gupta N., Malekpour M., Youns M., Omranipour R., Malekpour F., Volinia S., Croce C. M., Najmabadi H., Diederichs S., Sahin O., Mayer D., Lyko F., Hoheisel J. D., Riazalhosseini Y. *Epigenetically deregulated microRNA-375 is involved in a positive feedback loop with estrogen receptor alpha in breast cancer cells.* Cancer Res. 2010;70(22):9175-9184.
165. Jonsdottir K., Janssen S. R., Da Rosa F. C., Gudlaugsson E., Skaland I., Baak J. P., Janssen E. A. *Validation of expression patterns for nine miRNAs in 204 lymph-node negative breast cancers.* PLoS One. 2012;7(11):e48692.

166. Fu H., Fu L., Xie C., Zuo W. S., Liu Y. S., Zheng M. Z., Yu J. M. *miR-375 inhibits cancer stem cell phenotype and tamoxifen resistance by degrading HOXB3 in human ER-positive breast cancer*. *Oncol Rep*. 2017;37(2):1093-1099.
167. Zou Q., Yi W., Huang J., Fu F., Chen G., Zhong D. *MicroRNA-375 targets PAX6 and inhibits the viability, migration and invasion of human breast cancer MCF-7 cells*. *Exp Ther Med*. 2017;14(2):1198-1204.
168. Scientific Thermo Fischer. *NanoDrop One Bedienungsanleitung*. 2016:21-24.
169. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-273.
170. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sindelka R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N. *The real-time polymerase chain reaction*. *Mol Aspects Med*. 2006;27(2-3):95-125.
171. Quantabio. *qScript microRNA cDNA Synthesis Kit* [Internetquelle]. Abgerufen am 14.03.2019, 12:24 Uhr. Verfügbar auf <https://www.quantabio.com/qscript-microna-cdna-synthesis-kit>.
172. Hanahan D., Weinberg R. A. *The hallmarks of cancer*. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
173. Song Y., Li J., Zhu Y., Dai Y., Zeng T., Liu L., Li J., Wang H., Qin Y., Zeng M., Guan X. Y., Li Y. *MicroRNA-9 promotes tumor metastasis via repressing E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma*. *Oncotarget*. 2014;5(22):11669-11680.
174. Xu X. Z., Li X. A., Luo Y., Liu J. F., Wu H. W., Huang G. *MiR-9 promotes synovial sarcoma cell migration and invasion by directly targeting CDH1*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2019;112:61-71.
175. D'Arcy M. S. *Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy*. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-592.
176. Chen X., Zhu L., Ma Z., Sun G., Luo X., Li M., Zhai S., Li P., Wang X. *Oncogenic miR-9 is a target of erlotinib in NSCLCs*. *Sci Rep*. 2015;5:17031.
177. Li X., He L., Yue Q., Lu J., Kang N., Xu X., Wang H., Zhang H. *MiR-9-5p promotes MSC migration by activating beta-catenin signaling pathway*. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017;313(1):C80-C93.
178. Chen X., Yang F., Zhang T., Wang W., Xi W., Li Y., Zhang D., Huo Y., Zhang J., Yang A., Wang T. *MiR-9 promotes tumorigenesis and angiogenesis and is activated by MYC and OCT4 in human glioma*. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):99.
179. Skoda A. M., Simovic D., Karin V., Kardum V., Vranic S., Serman L. *The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review*. *Bosn J Basic Med Sci*. 2018;18(1):8-20.

180. Lang S., Busch H., Boerries M., Brummer T., Timme S., Lassmann S., Aktories K., Schmidt G. *Specific role of RhoC in tumor invasion and metastasis*. *Oncotarget*. 2017;8(50):87364-87378.
181. Wang Y., Li Z., Zhao X., Zuo X., Peng Z. *miR-10b promotes invasion by targeting HOXD10 in colorectal cancer*. *Oncol Lett*. 2016;12(1):488-494.
182. Ma C., Wei F., Xia H., Liu H., Dong X., Zhang Y., Luo Q., Liu Y., Li Y. *MicroRNA-10b mediates TGF-beta1-regulated glioblastoma proliferation, migration and epithelial-mesenchymal transition*. *Int J Oncol*. 2017;50(5):1739-1748.
183. Ru Q., Li W. L., Xiong Q., Chen L., Tian X., Li C. Y. *Voltage-gated potassium channel blocker 4-aminopyridine induces glioma cell apoptosis by reducing expression of microRNA-10b-5p*. *Mol Biol Cell*. 2018;29(9):1125-1136.
184. Gallego I., Beaumont J., Lopez B., Ravassa S., Gomez-Doblas J. J., Moreno M. U., Valencia F., de Teresa E., Diez J., Gonzalez A. *Potential role of microRNA-10b down-regulation in cardiomyocyte apoptosis in aortic stenosis patients*. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130(23):2139-2149.
185. Dorn G. W., 2nd. *Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling*. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):465-473.
186. Xie Y., Zhao J., Liang Y., Chen M., Luo Y., Cui X., Jiang B., Peng L., Wang X. *MicroRNA-10b controls the metastasis and proliferation of colorectal cancer cells by regulating Kruppel-like factor 4*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2019;47(1):1722-1729.
187. Wang J., Wang B., Chen L. Q., Yang J., Gong Z. Q., Zhao X. L., Zhang C. Q., Du K. L. *miR-10b promotes invasion by targeting KLF4 in osteosarcoma cells*. *Biomed Pharmacother*. 2016;84:947-953.
188. Ghaleb A. M., Yang V. W. *Kruppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know*. *Gene*. 2017;611:27-37.
189. Tsukerman P., Yamin R., Seidel E., Khawaled S., Schmiedel D., Bar-Mag T., Mandelboim O. *MiR-520d-5p directly targets TWIST1 and downregulates the metastamiR miR-10b*. *Oncotarget*. 2014;5(23):12141-12150.
190. Menendez-Menendez J., Hermida-Prado F., Granda-Diaz R., Gonzalez A., Garcia-Pedrero J. M., Del-Rio-Ibiate N., Gonzalez-Gonzalez A., Cos S., Alonso-Gonzalez C., Martinez-Campa C. *Deciphering the Molecular Basis of Melatonin Protective Effects on Breast Cells Treated with Doxorubicin: TWIST1 a Transcription Factor Involved in EMT and Metastasis, a Novel Target of Melatonin*. *Cancers (Basel)*. 2019;11(7).
191. Dai G., Yao X., Zhang Y., Gu J., Geng Y., Xue F., Zhang J. *Colorectal cancer cell-derived exosomes containing miR-10b regulate fibroblast cells via the PI3K/Akt pathway*. *Bull Cancer*. 2018;105(4):336-349.



192. De Mattos-Arruda L., Bottai G., Nuciforo P. G., Di Tommaso L., Giovannetti E., Peg V., Losurdo A., Perez-Garcia J., Masci G., Corsi F., Cortes J., Seoane J., Calin G. A., Santarpia L. *MicroRNA-21 links epithelial-to-mesenchymal transition and inflammatory signals to confer resistance to neoadjuvant trastuzumab and chemotherapy in HER2-positive breast cancer patients.* *Oncotarget.* 2015;6(35):37269-37280.
193. Yan L. X., Liu Y. H., Xiang J. W., Wu Q. N., Xu L. B., Luo X. L., Zhu X. L., Liu C., Xu F. P., Luo D. L., Mei P., Xu J., Zhang K. P., Chen J. *PIK3R1 targeting by miR-21 suppresses tumor cell migration and invasion by reducing PI3K/AKT signaling and reversing EMT, and predicts clinical outcome of breast cancer.* *Int J Oncol.* 2016;48(2):471-484.
194. Abdulhussain M. M., Hasan N. A., Hussain A. G. *Interrelation of the Circulating and Tissue MicroRNA-21 with Tissue PDCD4 Expression and the Invasiveness of Iraqi Female Breast Tumors.* *Indian J Clin Biochem.* 2019;34(1):26-38.
195. Tao L., Wu Y. Q., Zhang S. P. *MiR-21-5p enhances the progression and paclitaxel resistance in drug-resistant breast cancer cell lines by targeting PDCD4.* *Neoplasma.* 2019;66(5):746-755.
196. Zhao M., Zhu N., Hao F., Song Y., Wang Z., Ni Y., Ding L. *The Regulatory Role of Non-coding RNAs on Programmed Cell Death Four in Inflammation and Cancer.* *Front Oncol.* 2019;9:919.
197. Liu X., Liao W., Peng H., Luo X., Luo Z., Jiang H., Xu L. *miR-181a promotes G1/S transition and cell proliferation in pediatric acute myeloid leukemia by targeting ATM.* *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016;142(1):77-87.
198. Awasthi P., Foiani M., Kumar A. *ATM and ATR signaling at a glance.* *J Cell Sci.* 2016;129(6):1285.
199. Niu J., Xue A., Chi Y., Xue J., Wang W., Zhao Z., Fan M., Yang C. H., Shao Z. M., Pfeffer L. M., Wu J., Wu Z. H. *Induction of miRNA-181a by genotoxic treatments promotes chemotherapeutic resistance and metastasis in breast cancer.* *Oncogene.* 2016;35(10):1302-1313.
200. Lyu X., Li J., Yun X., Huang R., Deng X., Wang Y., Chen Y., Xiao G. *miR-181a-5p, an inducer of Wnt-signaling, facilitates cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia.* *Oncol Rep.* 2017;37(3):1469-1476.
201. Lu Y., Li Y., Wang Z., Xie S., Wang Q., Lei X., Ruan Y., Li J. *Downregulation of RGMA by HIF-1A/miR-210-3p axis promotes cell proliferation in oral squamous cell carcinoma.* *Biomed Pharmacother.* 2019;112:108608.
202. Merlo A., de Quiros S. B., Secades P., Zambrano I., Balbin M., Astudillo A., Scola B., Aristegui M., Suarez C., Chiara M. D. *Identification of a signaling axis HIF-1alpha/microRNA-210/ISCU independent of SDH mutation that defines a subgroup of head and neck paragangliomas.* *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(11):E2194-2200.

203. Merlo A., de Quiros S. B., de Santa-Maria I. S., Pitiot A. S., Balbin M., Astudillo A., Scola B., Aristegui M., Quer M., Suarez C., Chiara M. D. *Identification of somatic VHL gene mutations in sporadic head and neck paragangliomas in association with activation of the HIF-1alpha/miR-210 signaling pathway.* J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(10):E1661-1666.
204. Silakit R., Kitirat Y., Thongchot S., Loilome W., Techasen A., Ungarreevittaya P., Khuntikeo N., Yongvanit P., Yang J. H., Kim N. H., Yook J. I., Namwat N. *Potential role of HIF-1-responsive microRNA210/HIF3 axis on gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma cells.* PLoS One. 2018;13(6):e0199827.
205. Gits C. M., van Kuijk P. F., de Rijck J. C., Muskens N., Jonkers M. B., van IJcken W. F., Mathijssen R. H., Verweij J., Sleijfer S., Wiemer E. A. *MicroRNA response to hypoxic stress in soft tissue sarcoma cells: microRNA mediated regulation of HIF3alpha.* BMC Cancer. 2014;14:429.
206. Costales M. G., Haga C. L., Velagapudi S. P., Childs-Disney J. L., Phinney D. G., Disney M. D. *Small Molecule Inhibition of microRNA-210 Reprograms an Oncogenic Hypoxic Circuit.* J Am Chem Soc. 2017;139(9):3446-3455.
207. Kelly T. J., Souza A. L., Clish C. B., Puigserver P. *A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1alpha stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like.* Mol Cell Biol. 2011;31(13):2696-2706.
208. Du Y., Wei N., Ma R., Jiang S., Song D. *A miR-210-3p regulon that controls the Warburg effect by modulating HIF-1alpha and p53 activity in triple-negative breast cancer.* Cell Death Dis. 2020;11(9):731.
209. Liu Z. J., Semenza G. L., Zhang H. F. *Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis.* J Zhejiang Univ Sci B. 2015;16(1):32-43.
210. Semenza G. L. *Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy.* Trends Pharmacol Sci. 2012;33(4):207-214.
211. Dales J. P., Garcia S., Meunier-Carpentier S., Andrac-Meyer L., Haddad O., Lavaut M. N., Allasia C., Bonnier P., Charpin C. *Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha predicts early relapse in breast cancer: retrospective study in a series of 745 patients.* Int J Cancer. 2005;116(5):734-739.
212. Luan Y., Zhang X., Zhang Y., Dong Y. *MicroRNA-210 Protects PC-12 Cells Against Hypoxia-Induced Injury by Targeting BNIP3.* Front Cell Neurosci. 2017;11:285.
213. Wang F., Xiong L., Huang X., Zhao T., Wu L. Y., Liu Z. H., Ding X., Liu S., Wu Y., Zhao Y., Wu K., Zhu L. L., Fan M. *miR-210 suppresses BNIP3 to protect against the apoptosis of neural progenitor cells.* Stem Cell Res. 2013;11(1):657-667.
214. Billing D., Horiguchi M., Wu-Baer F., Taglialatela A., Leuzzi G., Nanez S. A., Jiang W., Zha S., Szabolcs M., Lin C. S., Ciccica A., Baer R. *The BRCT Domains*

- of the BRCA1 and BARD1 Tumor Suppressors Differentially Regulate Homology-Directed Repair and Stalled Fork Protection.* Mol Cell. 2018;72(1):127-139 e128.
215. Foulkes W. D. *Inherited susceptibility to common cancers.* N Engl J Med. 2008;359(20):2143-2153.
216. Dai Y., Lin X., Xu W., Lin X., Huang Q., Shi L., Pan Y., Zhang Y., Zhu Y., Li C., Liu L., Zhang S. *MiR-210-3p protects endometriotic cells from oxidative stress-induced cell cycle arrest by targeting BARD1.* Cell Death Dis. 2019;10(2):144.
217. Rixe O., Fojo T. *Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient?* Clin Cancer Res. 2007;13(24):7280-7287.
218. Pu R. T., Schott A. F., Sturtz D. E., Griffith K. A., Kleer C. G. *Pathologic features of breast cancer associated with complete response to neoadjuvant chemotherapy: importance of tumor necrosis.* Am J Surg Pathol. 2005;29(3):354-358.
219. Soultati A., Mountzios G., Avgerinou C., Papaxoinis G., Pectasides D., Dimopoulos M. A., Papadimitriou C. *Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications.* Cancer Treat Rev. 2012;38(5):473-483.
220. Cameron A. C., Touyz R. M., Lang N. N. *Vascular Complications of Cancer Chemotherapy.* Can J Cardiol. 2016;32(7):852-862.
221. Phuah N. H., Azmi M. N., Awang K., Nagoor N. H. *Down-Regulation of MicroRNA-210 Confers Sensitivity towards 1'S-1'-Acetoxychavicol Acetate (ACA) in Cervical Cancer Cells by Targeting SMAD4.* Mol Cells. 2017;40(4):291-298.
222. Derynck R., Akhurst R. J., Balmain A. *TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression.* Nat Genet. 2001;29(2):117-129.
223. Mussnich P., Rosa R., Bianco R., Fusco A., D'Angelo D. *MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1.* Expert Opin Ther Targets. 2015;19(8):1017-1026.
224. Wu Q., Zhao Y., Sun Y., Yan X., Wang P. *miR-375 inhibits IFN-gamma-induced programmed death 1 ligand 1 surface expression in head and neck squamous cell carcinoma cells by blocking JAK2/STAT1 signaling.* Oncol Rep. 2018;39(3):1461-1468.
225. Stovgaard E. S., Dyhl-Polk A., Roslind A., Balslev E., Nielsen D. *PD-L1 expression in breast cancer: expression in subtypes and prognostic significance: a systematic review.* Breast Cancer Res Treat. 2019;174(3):571-584.
226. Wang X. Z., Hang Y. K., Liu J. B., Hou Y. Q., Wang N., Wang M. J. *Over-expression of microRNA-375 inhibits papillary thyroid carcinoma cell*

- proliferation and induces cell apoptosis by targeting ERBB2*. J Pharmacol Sci. 2016;130(2):78-84.
227. Li L., Jia L., Ding Y. *Upregulation of miR-375 inhibits human liver cancer cell growth by modulating cell proliferation and apoptosis via targeting ErbB2*. Oncol Lett. 2018;16(3):3319-3326.
228. Figueroa-Magalhaes M. C., Jelovac D., Connolly R., Wolff A. C. *Treatment of HER2-positive breast cancer*. Breast. 2014;23(2):128-136.
229. Salem S. M., Hamed A. R., Mosaad R. M. *MTDH and MAP3K1 are direct targets of apoptosis-regulating miRNAs in colorectal carcinoma*. Biomed Pharmacother. 2017;94:767-773.
230. Jayamohan S., Kannan M., Moorthy R. K., Rajasekaran N., Jung H. S., Shin Y. K., Arockiam A. J. V. *Dysregulation of miR-375/AEG-1 Axis by Human Papillomavirus 16/18-E6/E7 Promotes Cellular Proliferation, Migration, and Invasion in Cervical Cancer*. Front Oncol. 2019;9:847.
231. Hu C., Lv L., Peng J., Liu D., Wang X., Zhou Y., Huo J. *MicroRNA-375 suppresses esophageal cancer cell growth and invasion by repressing metadherin expression*. Oncol Lett. 2017;13(6):4769-4775.
232. Ward A., Balwierz A., Zhang J. D., Kublbeck M., Pawitan Y., Hielscher T., Wiemann S., Sahin O. *Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer*. Oncogene. 2013;32(9):1173-1182.
233. Zellinger B., Bodenhofer U., Englander I. A., Kronberger C., Strasser P., Grambozov B., Fastner G., Stana M., Reitsamer R., Sotlar K., Sedlmayer F., Zehentmayr F. *Hsa-miR-375/RASD1 Signaling May Predict Local Control in Early Breast Cancer*. Genes (Basel). 2020;11(12).
234. Ranganathan P., Nadig N., Nambiar S. *Non-canonical Estrogen Signaling in Endocrine Resistance*. Front Endocrinol (Lausanne). 2019;10:708.
235. Weber J. A., Baxter D. H., Zhang S., Huang D. Y., Huang K. H., Lee M. J., Galas D. J., Wang K. *The microRNA spectrum in 12 body fluids*. Clin Chem. 2010;56(11):1733-1741.
236. Valadi H., Ekstrom K., Bossios A., Sjostrand M., Lee J. J., Lotvall J. O. *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol. 2007;9(6):654-659.
237. Arroyo J. D., Chevillet J. R., Kroh E. M., Ruf I. K., Pritchard C. C., Gibson D. F., Mitchell P. S., Bennett C. F., Pogosova-Agadjanyan E. L., Stirewalt D. L., Tait J. F., Tewari M. *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(12):5003-5008.

238. Matamala N., Vargas M. T., Gonzalez-Campora R., Minambres R., Arias J. I., Menendez P., Andres-Leon E., Gomez-Lopez G., Yanowsky K., Calvete-Candenas J., Inglada-Perez L., Martinez-Delgado B., Benitez J. *Tumor microRNA expression profiling identifies circulating microRNAs for early breast cancer detection*. Clin Chem. 2015;61(8):1098-1106.
239. Li X., Tang X., Li K., Lu L. *Evaluation of Serum MicroRNAs (miR-9-5p, miR-17-5p, and miR-148a-3p) as Potential Biomarkers of Breast Cancer*. Biomed Res Int. 2022;2022:9961412.
240. Chen X., Li X., Wang J., Zhao L., Peng X., Zhang C., Liu K., Huang G., Lai Y. *Breast invasive ductal carcinoma diagnosis with a three-miRNA panel in serum*. Biomark Med. 2021;15(12):951-963.
241. Mohamed A. A., Allam A. E., Aref A. M., Mahmoud M. O., Eldesoky N. A., Fawazy N., Sakr Y., Sobeih M. E., Albogami S., Fayad E., Althobaiti F., Jafri I., Alsharif G., El-Sayed M., Abdelgeliel A. S., Abdel Aziz R. S. *Evaluation of Expressed MicroRNAs as Prospective Biomarkers for Detection of Breast Cancer*. Diagnostics (Basel). 2022;12(4).
242. Liu M., Mo F., Song X., He Y., Yuan Y., Yan J., Yang Y., Huang J., Zhang S. *Exosomal hsa-miR-21-5p is a biomarker for breast cancer diagnosis*. PeerJ. 2021;9:e12147.
243. Lopes B. C., Braga C. Z., Ventura F. V., de Oliveira J. G., Kato-Junior E. M., Bordin-Junior N. A., Zuccari Dapc. *miR-210 and miR-152 as Biomarkers by Liquid Biopsy in Invasive Ductal Carcinoma*. J Pers Med. 2021;11(1).
244. Abba M. L., Patil N., Leupold J. H., Moniuszko M., Utikal J., Niklinski J., Allgayer H. *MicroRNAs as novel targets and tools in cancer therapy*. Cancer Lett. 2017;387:84-94.
245. Ben-Shushan D., Markovsky E., Gibori H., Tiram G., Scomparin A., Satchi-Fainaro R. *Overcoming obstacles in microRNA delivery towards improved cancer therapy*. Drug Deliv Transl Res. 2014;4(1):38-49.
246. Wu Y., Crawford M., Mao Y., Lee R. J., Davis I. C., Elton T. S., Lee L. J., Nana-Sinkam S. P. *Therapeutic Delivery of MicroRNA-29b by Cationic Lipoplexes for Lung Cancer*. Mol Ther Nucleic Acids. 2013;2:e84.
247. Pramanik D., Campbell N. R., Karikari C., Chivukula R., Kent O. A., Mendell J. T., Maitra A. *Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice*. Mol Cancer Ther. 2011;10(8):1470-1480.
248. Andreano K. J., Baker J. G., Park S., Safi R., Artham S., Oesterreich S., Jeselsohn R., Brown M., Sammons S., Wardell S. E., Chang C. Y., Norris J. D., McDonnell D. P. *The Dysregulated Pharmacology of Clinically Relevant ESR1 Mutants is Normalized by Ligand-activated WT Receptor*. Mol Cancer Ther. 2020;19(7):1395-1405.

249. Lennox K. A., Vakulskas C. A., Behlke M. A. *Non-nucleotide Modification of Anti-miRNA Oligonucleotides*. *Methods Mol Biol*. 2017;1517:51-69.
250. Ariyoshi J., Matsuyama Y., Kobori A., Murakami A., Sugiyama H., Yamayoshi A. *Effective Anti-miRNA Oligonucleotides Show High Releasing Rate of MicroRNA from RNA-Induced Silencing Complex*. *Nucleic Acid Ther*. 2017;27(5):303-308.
251. Marusyk A., Polyak K. *Tumor heterogeneity: causes and consequences*. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1805(1):105-117.
252. Boisen M. K., Dehlendorff C., Linnemann D., Schultz N. A., Jensen B. V., Hogdall E. V., Johansen J. S. *MicroRNA Expression in Formalin-fixed Paraffin-embedded Cancer Tissue: Identifying Reference MicroRNAs and Variability*. *BMC Cancer*. 2015;15:1024.
253. Xi Y., Nakajima G., Gavin E., Morris C. G., Kudo K., Hayashi K., Ju J. *Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples*. *RNA*. 2007;13(10):1668-1674.
254. Szafranska A. E., Davison T. S., Shingara J., Doleshal M., Riggenbach J. A., Morrison C. D., Jewell S., Labourier E. *Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling*. *J Mol Diagn*. 2008;10(5):415-423.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

ACR	<i>American College of Radiology</i>
ADH	atypische duktale Hyperplasie
AKT	Gen, codierend für Proteinkinase B
APAF-1	<i>apoptosis protease activating factor-1</i>
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
BARD1	<i>BRCA-associated RING domain protein 1</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
BET	Brust-erhaltende Therapie
BI-RADS	<i>Breast Imaging-Reporting And Data System</i>
BMI	<i>body mass index</i>
BNIP3	<i>Bcl-2 adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3</i>
BRCA	<i>Breast cancer 1/2, early onset</i> , Tumorsuppressorgene
bzw.	beziehungsweise
Ca	Karzinom
ca.	circa
CDC25A	<i>Cell division cycle 25A</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CK1 $\alpha$	Caseinkinase 1 $\alpha$
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCIS	duktales <i>Carcinoma in situ</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
ER $\alpha$	Östrogen-Rezeptor $\alpha$

FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
FOXP1	<i>forkhead box protein G1</i>
FOXP1	<i>forkhead box protein O1</i>
GnRH	<i>Gonadotropin releasing hormone</i>
GPD1L	<i>Glycerol-3-phosphatdehydrogenase 1-like</i>
GSK-3 $\beta$	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
GSX2	<i>GS Homeobox 2</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatasen
HCC	hepatocelluläres Carcinom
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HER5	<i>hairy-related 5</i>
HER6	<i>hairy-related 6</i>
HES1	<i>hairy and enhancer of split-1</i>
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 $\alpha$
HIF-3 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer Faktor 3 $\alpha$
HOXD10	<i>Homeobox D10</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor receptor 1</i>
JAK2	Januskinase 2
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LIN	lobuläre intraepitheliale Neoplasie
LMP1	<i>Epstein-Barr-Virus latent membrane protein 1</i>
LR	Lokalrezidiv
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> (Brustkrebszelllinie)
MDA-MB-231	humane Brustkrebszelllinie, Adenokarzinom
MDR	<i>multi drug resistance</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTDH	Metadherin
neg.	negativ
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>



NST	<i>no specific type</i>
nt	Nukleotide
OP	Operation
p53	Tumorsuppressor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
p.a.	<i>pro analysi, analyserein</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD4	<i>Programmed cell death 4</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PD-L1	<i>programmed cell death 1 ligand 1</i>
PHD	Prolyl-Hydroxylase
PHLPP1	<i>PH domain and leucine-rich repeat protein phosphatase 1</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PIK3R1	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase regulatory subunit 1</i>
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
pos.	positiv
PR	Progesteronrezeptor
pre-miRNA	<i>precursor microRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary microRNA</i>
PROX1	<i>Prospero homeobox protein 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RASD1	<i>Ras-related dexamethasone induced protein 1</i>
RHOC	<i>Ras homolog family member C</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNasen	Ribonukleasen
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SMAD4	Tumorsuppressorgen
SOCS1	<i>Suppressor of cytokine signaling 1</i>

sog.	sogenannt
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TGF- $\beta$ 1	<i>transforming growth factor <math>\beta</math> 1</i>
TNBC	<i>triple-negative breast cancer</i>
TNIP1	<i>TNF-<math>\alpha</math> Induced Protein 3 Interacting Protein 1</i>
TWIST1	<i>Twist-related protein 1</i>
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
UTR	untranslatierte Region
vgl.	vergleiche
WIF1	<i>Wnt inhibitory factor-1</i>
WNT	<i>wingless int-1</i>
ZIC5	<i>Zinc finger protein of cerebellum 5</i>
ZNS	zentrales Nervensystem
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Prozentualer Anteil des Mamma-Karzinoms an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2014, entnommen aus [1] .....</i>	<i>3</i>
<i>Abbildung 2: Größenverteilung invasiver Karzinome in der Zielbevölkerung vor und nach Einführung des Mammografie-Programms, entnommen aus [34] .....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 3: Relatives Überleben für Patientinnen mit Mamma-Karzinom nach pTNM 1998-2016 im Einzugsgebiet des Tumorregisters München, entnommen aus [41] .....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 4: Prozessierung und Reifung von miRNA, entnommen aus [79].....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 5: Reaktionsschritte der cDNA-Synthese und der qRT-PCR, entnommen aus [171].....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Gesamtüberlebens im Patientenkollektiv.....</i>	<i>35</i>
<i>Abbildung 7: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Lokalrezidiv-freien Überlebens im Patientenkollektiv. ....</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 8: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-9-Expression und Gesamtüberleben .....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 9: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-21-Expression und Gesamtüberleben .....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 10: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-181a-Expression und Gesamtüberleben ..</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 11: Modifizierte Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-181a-Expression und Gesamtüberleben.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 12: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-210-Expression und Gesamtüberleben ....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 13: Modifizierte Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-210-Expression und Gesamtüberleben.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-375-Expression und Gesamtüberleben ....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 15: Kaplan-Meier-Kurve zum Zusammenhang von miRNA-210-Expression und Lokalrezidiv-freiem Überleben.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 16: Korrelationsanalyse der miRNAs im Primarius.....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 17: Korrelationsanalyse der miRNAs im Lokalrezidiv. ....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 18: Korrelationsanalyse der miRNAs im Lymphknoten. ....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 19: Gewebe-übergreifende Korrelationsanalyse der miRNA-Expression im Primarius und im Lokalrezidiv.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 20: Gewebe-übergreifende Korrelationsanalyse der miRNA-Expression korrespondierender miRNAs im Primarius und im Lymphknoten. ....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 21: Gewebe-übergreifende Korrelationsanalyse der miRNA-Expression im Primarius und im Lymphknoten.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 22: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit des G-Stadiums des Primarius. ....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 23: MiRNA-21-Expression im Primarius in Abhängigkeit des T-Stadiums des Primarius. ....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 24: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus im Primarius. ....</i>	<i>59</i>
<i>Abbildung 25: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit des Progesteronrezeptorstatus im Primarius. ..</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 26: MiRNA-9-Expression im Primarius in Abhängigkeit des HER2-Status des Primarius. ....</i>	<i>61</i>

<i>Abbildung 27: MiRNA-Expression im Primarius in Abhängigkeit der Entwicklung eines nachfolgenden Lokalrezidivs.</i> .....	62
<i>Abbildung 28: MiRNA-375-Expression im Primarius in Korrelation mit dem T-Stadiums des Lokalrezidivs.</i> .....	63
<i>Abbildung 29: MiRNA-9-Expression im Primarius in Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus im Lokalrezidiv.</i> .....	64
<i>Abbildung 30: MiRNA-181a-Expression im Primarius in Korrelation mit dem HER2-Status im Lokalrezidiv.</i> .....	65
<i>Abbildung 31: miRNA-375-Expression im Lokalrezidiv in Abhängigkeit des Östrogenrezeptorstatus im Lokalrezidiv.</i> .....	66
<i>Abbildung 32: MiRNA-210-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Vorhandensein eines begleitenden DCIS im Primarius.</i> .....	67
<i>Abbildung 33: MiRNA-375-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Vorhandensein einer begleitenden LIN im Primarius.</i> .....	68
<i>Abbildung 34: MiRNA-10b-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem T-Stadium des Primarius.</i> .....	69
<i>Abbildung 35: MiRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Grading des Primarius.</i> .....	70
<i>Abbildung 36: MiRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Östrogenrezeptorstatus des Primarius.</i> .....	70
<i>Abbildung 37: MiRNA-Expression im Lymphknoten in Korrelation mit dem Progesteronrezeptorstatus des Primarius.</i> .....	71
<i>Abbildung 38: Korrelation der miRNA-Expression im Lokalrezidiv in Abhängigkeit der erfolgten Systemtherapie bei Diagnose des Primarius.</i> .....	72
<i>Abbildung 39: hallmarks of cancer, modifiziert nach [2].</i> .....	73

### 8.3 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Intrinsische Subtypen des Mamma-Karzinoms [30].....</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 2: Reaktionsansatz der Poly(A) Tailing-Reaktion (Schritt 1) .....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 3: Reaktionsansatz der cDNA-Synthese-Reaktion (Schritt 2) .....</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 4: Reaktionsansatz für die qRT-PCR.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 5: Deskriptive Statistik der erhobenen Merkmale der Primärtumoren.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 6: Deskriptive Statistik der erhobenen Merkmale der Fernmetastasen. ....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 7: Deskriptive Statistik der erhobenen Merkmale der Lokalrezidive.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 8: Systemtherapie und Bestrahlung im Rahmen der Primärtumor-Diagnose. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 9: Systemtherapie und Bestrahlung im Rahmen der Lokalrezidiv-Diagnose. ....</i>	<i>41</i>

## 8.4 Follow Up-Datenerhebung

Die folgende Tabelle fasst die erhobenen Daten zu den verwendeten Gewebeproben zusammen.

Geburtsdatum der Pat.	
Follow Up-Status der Pat.	
Todesdatum	
Todesursache	
Datum der letzten Beobachtung	
Primarius	Datum der Erstdiagnose Entität Lokalisation Begleitendes DCIS Begleitende LIN Tumorgröße (T) Nodalstatus (N) Metastasierung (M) Grading (G) Residualtumor (R) Östrogenrezeptor-Status Progesteronrezeptor-Status HER2-Status Ki-67-Expression
Fernmetastasierung	vorhanden/nicht vorhanden pulmonale Metastasierung? Datum der pulmonalen Metastasierung hepatische Metastasierung? Datum der hepatischen Metastasierung ossäre Metastasierung? Datum der ossären Metastasierung cutane Metastasierung? Datum der cutanen Metastasierung

	<p>Cerebrale Metastasierung?</p> <p>Datum der cerebralen Metastasierung</p> <p>Metastasierung an anderer Lokalisation?</p> <p>Datum der Metastasierung an anderer Lok.</p>
Lokalrezidiv	<p>vorhanden/nicht vorhanden</p> <p>Datum der Erstdiagnose</p> <p>Lokalisation</p> <p>Entität</p> <p>Tumorgroße (T)</p> <p>Nodalstatus (N)</p> <p>Metastasierung (M)</p> <p>Grading (G)</p> <p>Residualtumor (R)</p> <p>Östrogenrezeptor-Status</p> <p>Progesteronrezeptor-Status</p> <p>HER2-Status</p> <p>Ki-67-Expression</p>
zweites Lokalrezidiv	<p>vorhanden/nicht vorhanden</p> <p>Datum der Erstdiagnose</p> <p>Lokalisation</p>
Therapie des Primarius	<p>erfolgt/nicht erfolgt</p> <p>OP?</p> <p>Art der OP</p> <p>OP-Datum</p> <p>Nachresektion?</p> <p>Datum der Nachresektion</p> <p>neoadjuvante Chemotherapie?</p> <p>Datum der neoadjuvanten Chemotherapie</p> <p>Adjuvante Chemotherapie?</p> <p>Datum der adjuvanten Chemotherapie</p> <p>Bestrahlung?</p> <p>Datum der Bestrahlung</p> <p>endokrine Therapie?</p>

	Datum der endokrinen Therapie Trastuzumab-Gabe? Datum der Trastuzumab-Gabe
Therapie des Lokalrezidivs	erfolgt/nicht erfolgt OP? Art der OP OP-Datum Nachresektion? Datum der Nachresektion Adjuvante Chemotherapie? Datum der adjuvanten Chemotherapie Bestrahlung? Datum der Bestrahlung endokrine Therapie? Datum der endokrinen Therapie Trastuzumab-Gabe? Datum der Trastuzumab-Gabe



## 8.5 Werte zu den Abbildungen

Abbildung 6

Überlebenstabelle						
	Zeit	Status	Kumulierter Anteil Überlebender zum Zeitpunkt		Anzahl der kumulativen Ereignisse	Anzahl der verbliebenen Fälle
			Schätzer	Standardfehler		
1	,058	lost to follow up	.	.	0	101
2	,077	Pat. verstorben	,990	,010	1	100
3	,099	Pat. lebt	.	.	1	99
4	,153	Pat. lebt	.	.	1	98
5	,803	Pat. lebt	.	.	1	97
6	,882	Pat. lebt	.	.	1	96
7	,995	Pat. lebt	.	.	1	95
8	1,126	Pat. verstorben	,980	,014	2	94
9	1,340	Pat. lebt	.	.	2	93
10	1,375	Pat. lebt	.	.	2	92
11	1,460	Pat. lebt	.	.	2	91
12	1,690	Pat. lebt	.	.	2	90
13	1,753	Pat. lebt	.	.	2	89
14	1,811	Pat. verstorben	,969	,018	3	88
15	1,948	Pat. lebt	.	.	3	87
16	2,030	Pat. lebt	.	.	3	86
17	2,047	Pat. lebt	.	.	3	85
18	2,063	Pat. lebt	.	.	3	84
19	2,068	Pat. lebt	.	.	3	83
20	2,074	Pat. lebt	.	.	3	82
21	2,085	Pat. lebt	.	.	3	81
22	2,162	Pat. verstorben	,957	,021	4	80
23	2,181	Pat. lebt	.	.	4	79
24	2,230	Pat. lebt	.	.	4	78
25	2,230	Pat. lebt	.	.	4	77
26	2,241	Pat. lebt	.	.	4	76
27	2,318	Pat. lebt	.	.	4	75
28	2,342	Pat. lebt	.	.	4	74
29	2,414	Pat. lebt	.	.	4	73
30	2,438	Pat. lebt	.	.	4	72
31	2,468	Pat. lebt	.	.	4	71
32	2,479	Pat. lebt	.	.	4	70
33	2,485	Pat. lebt	.	.	4	69

# Anhang

34	2,507	Pat. lebt	.	.	4	68
35	2,526	Pat. lebt	.	.	4	67
36	2,532	Pat. lebt	.	.	4	66
37	2,532	Pat. lebt	.	.	4	65
38	2,551	Pat. lebt	.	.	4	64
39	2,553	Pat. lebt	.	.	4	63
40	2,564	Pat. lebt	.	.	4	62
41	2,570	Pat. lebt	.	.	4	61
42	2,575	Pat. lebt	.	.	4	60
43	2,581	Pat. lebt	.	.	4	59
44	2,595	Pat. lebt	.	.	4	58
45	2,597	Pat. lebt	.	.	4	57
46	2,608	Pat. lebt	.	.	4	56
47	2,611	Pat. lebt	.	.	4	55
48	2,641	Pat. lebt	.	.	4	54
49	2,663	Pat. lebt	.	.	4	53
50	2,677	Pat. lebt	.	.	4	52
51	2,677	Pat. lebt	.	.	4	51
52	2,685	Pat. lebt	.	.	4	50
53	2,688	Pat. lebt	.	.	4	49
54	2,723	Pat. lebt	.	.	4	48
55	2,729	Pat. lebt	.	.	4	47
56	2,729	Pat. lebt	.	.	4	46
57	2,827	Pat. lebt	.	.	4	45
58	2,849	Pat. lebt	.	.	4	44
59	2,860	Pat. lebt	.	.	4	43
60	2,877	Pat. lebt	.	.	4	42
61	2,912	Pat. lebt	.	.	4	41
62	2,918	Pat. lebt	.	.	4	40
63	2,932	Pat. lebt	.	.	4	39
64	2,951	Pat. lebt	.	.	4	38
65	2,953	Pat. lebt	.	.	4	37
66	2,964	Pat. lebt	.	.	4	36
67	2,970	Pat. lebt	.	.	4	35
68	3,036	Pat. lebt	.	.	4	34
69	3,063	Pat. lebt	.	.	4	33
70	3,074	Pat. lebt	.	.	4	32
71	3,090	Pat. lebt	.	.	4	31
72	3,110	Pat. verstorben	,926	,037	5	30
73	3,126	Pat. lebt	.	.	5	29
74	3,164	Pat. lebt	.	.	5	28
75	3,178	Pat. lebt	.	.	5	27
76	3,192	Pat. lebt	.	.	5	26

77	3,216	Pat. lebt	.	.	5	25
78	3,271	Pat. lebt	.	.	5	24
79	3,290	Pat. lebt	.	.	5	23
80	3,307	Pat. verstorben	,886	,053	6	22
81	3,482	Pat. lebt	.	.	6	21
82	3,564	Pat. lebt	.	.	6	20
83	3,570	Pat. lebt	.	.	6	19
84	3,641	Pat. lebt	.	.	6	18
85	3,655	Pat. lebt	.	.	6	17
86	3,671	Pat. lebt	.	.	6	16
87	3,715	Pat. verstorben	,830	,073	7	15
88	3,729	Pat. lebt	.	.	7	14
89	3,863	Pat. lebt	.	.	7	13
90	5,071	Pat. lebt	.	.	7	12
91	6,211	Pat. verstorben	,761	,094	8	11
92	6,332	Pat. verstorben	,692	,108	9	10
93	6,499	Pat. lebt	.	.	9	9
94	7,658	Pat. verstorben	,615	,120	10	8
95	7,863	Pat. lebt	.	.	10	7
96	8,386	Pat. lebt	.	.	10	6
97	9,148	Pat. lebt	.	.	10	5
98	11,318	Pat. lebt	.	.	10	4
99	11,827	Pat. lebt	.	.	10	3
100	12,227	Pat. lebt	.	.	10	2
101	14,521	Pat. lebt	.	.	10	1
102	16,578	Pat. lebt	.	.	10	0

Abbildung 7

Überlebenstabelle

	Zeit	Status	Kumulierter Anteil Überlebender zum Zeitpunkt		Anzahl der kumulativen Ereignisse	Anzahl der verbliebenen Fälle
			Schätzer	Standardfehler		
1	,058	kein Lokalrezidiv	.	.	0	101
2	,077	kein Lokalrezidiv	.	.	0	100
3	,099	kein Lokalrezidiv	.	.	0	99
4	,153	kein Lokalrezidiv	.	.	0	98
5	,803	kein Lokalrezidiv	.	.	0	97
6	,855	Lokalrezidiv	,990	,010	1	96
7	,882	kein Lokalrezidiv	.	.	1	95
8	,995	kein Lokalrezidiv	.	.	1	94
9	1,140	Lokalrezidiv	,979	,015	2	93

## Anhang

10	1,175	Lokalrezidiv	,969	,018	3	92
11	1,247	Lokalrezidiv	,958	,021	4	91
12	1,290	Lokalrezidiv	,948	,023	5	90
13	1,340	kein Lokalrezidiv	.	.	5	89
14	1,375	kein Lokalrezidiv	.	.	5	88
15	1,460	kein Lokalrezidiv	.	.	5	87
16	1,679	Lokalrezidiv	,937	,025	6	86
17	1,688	Lokalrezidiv	,926	,027	7	85
18	1,707	Lokalrezidiv	,915	,029	8	84
19	1,753	kein Lokalrezidiv	.	.	8	83
20	1,811	kein Lokalrezidiv	.	.	8	82
21	1,948	kein Lokalrezidiv	.	.	8	81
22	1,981	Lokalrezidiv	,904	,031	9	80
23	2,030	kein Lokalrezidiv	.	.	9	79
24	2,047	kein Lokalrezidiv	.	.	9	78
25	2,063	kein Lokalrezidiv	.	.	9	77
26	2,068	kein Lokalrezidiv	.	.	9	76
27	2,074	kein Lokalrezidiv	.	.	9	75
28	2,085	Lokalrezidiv	,892	,032	10	74
29	2,085	kein Lokalrezidiv	.	.	10	73
30	2,162	kein Lokalrezidiv	.	.	10	72
31	2,181	kein Lokalrezidiv	.	.	10	71
32	2,230	kein Lokalrezidiv	.	.	10	70
33	2,230	kein Lokalrezidiv	.	.	10	69
34	2,241	kein Lokalrezidiv	.	.	10	68
35	2,318	kein Lokalrezidiv	.	.	10	67
36	2,342	kein Lokalrezidiv	.	.	10	66
37	2,414	kein Lokalrezidiv	.	.	10	65
38	2,438	kein Lokalrezidiv	.	.	10	64
39	2,468	kein Lokalrezidiv	.	.	10	63
40	2,479	kein Lokalrezidiv	.	.	10	62
41	2,485	kein Lokalrezidiv	.	.	10	61
42	2,507	kein Lokalrezidiv	.	.	10	60
43	2,526	kein Lokalrezidiv	.	.	10	59
44	2,532	kein Lokalrezidiv	.	.	10	58
45	2,532	kein Lokalrezidiv	.	.	10	57
46	2,551	kein Lokalrezidiv	.	.	10	56
47	2,553	kein Lokalrezidiv	.	.	10	55
48	2,564	kein Lokalrezidiv	.	.	10	54
49	2,570	kein Lokalrezidiv	.	.	10	53
50	2,575	kein Lokalrezidiv	.	.	10	52
51	2,581	kein Lokalrezidiv	.	.	10	51
52	2,597	kein Lokalrezidiv	.	.	10	50

## Anhang

53	2,600	Lokalrezidiv	,874	,036	11	49
54	2,608	kein Lokalrezidiv	.	.	11	48
55	2,611	kein Lokalrezidiv	.	.	11	47
56	2,641	kein Lokalrezidiv	.	.	11	46
57	2,663	kein Lokalrezidiv	.	.	11	45
58	2,677	kein Lokalrezidiv	.	.	11	44
59	2,677	kein Lokalrezidiv	.	.	11	43
60	2,685	kein Lokalrezidiv	.	.	11	42
61	2,688	kein Lokalrezidiv	.	.	11	41
62	2,723	kein Lokalrezidiv	.	.	11	40
63	2,729	kein Lokalrezidiv	.	.	11	39
64	2,729	kein Lokalrezidiv	.	.	11	38
65	2,827	kein Lokalrezidiv	.	.	11	37
66	2,849	kein Lokalrezidiv	.	.	11	36
67	2,860	kein Lokalrezidiv	.	.	11	35
68	2,877	Lokalrezidiv	,849	,043	12	34
69	2,877	kein Lokalrezidiv	.	.	12	33
70	2,912	kein Lokalrezidiv	.	.	12	32
71	2,918	kein Lokalrezidiv	.	.	12	31
72	2,951	kein Lokalrezidiv	.	.	12	30
73	2,953	kein Lokalrezidiv	.	.	12	29
74	2,964	kein Lokalrezidiv	.	.	12	28
75	2,970	kein Lokalrezidiv	.	.	12	27
76	3,036	kein Lokalrezidiv	.	.	12	26
77	3,063	kein Lokalrezidiv	.	.	12	25
78	3,090	kein Lokalrezidiv	.	.	12	24
79	3,126	kein Lokalrezidiv	.	.	12	23
80	3,164	kein Lokalrezidiv	.	.	12	22
81	3,178	kein Lokalrezidiv	.	.	12	21
82	3,192	kein Lokalrezidiv	.	.	12	20
83	3,216	kein Lokalrezidiv	.	.	12	19
84	3,271	kein Lokalrezidiv	.	.	12	18
85	3,290	kein Lokalrezidiv	.	.	12	17
86	3,422	Lokalrezidiv	,799	,063	13	16
87	3,482	kein Lokalrezidiv	.	.	13	15
88	3,553	Lokalrezidiv	,746	,078	14	14
89	3,570	kein Lokalrezidiv	.	.	14	13
90	3,641	kein Lokalrezidiv	.	.	14	12
91	3,655	kein Lokalrezidiv	.	.	14	11
92	3,671	kein Lokalrezidiv	.	.	14	10
93	3,729	kein Lokalrezidiv	.	.	14	9
94	3,863	kein Lokalrezidiv	.	.	14	8
95	3,984	Lokalrezidiv	,652	,111	15	7

96	4,923	Lokalrezidiv	,559	,128	16	6
97	5,622	Lokalrezidiv	,466	,137	17	5
98	6,441	Lokalrezidiv	,373	,137	18	4
99	6,595	Lokalrezidiv	,280	,131	19	3
100	7,937	Lokalrezidiv	,186	,116	20	2
101	7,967	Lokalrezidiv	,093	,088	21	1
102	8,660	Lokalrezidiv	,000	,000	22	0

Abbildung 8

Zusammenfassung der Fallverarbeitung					Gesamtvergleiche			
miR-9-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert		Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
			N	Prozent				
miR-9-Expression <= Median	48	4	44	91,7%	,026	1	,872	Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von miR-9-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median.
miR-9-Expression > Median	48	5	43	89,6%				
Gesamt	96	9	87	90,6%				

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit								
miR-9-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
miR-9-Expression <= Median	7,624	1,337	5,004	10,244	7,658	1,650	4,424	10,891
miR-9-Expression > Median	13,301	1,536	10,290	16,311	.	.	.	.
Gesamt	12,099	1,468	9,222	14,975	.	.	.	.

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Abbildung 9

Zusammenfassung der Fallverarbeitung					Gesamtvergleiche			
miR-21-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert		Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
			N	Prozent				
miR-21-Expression <= Median	48	5	43	89,6%	,236	1	,627	Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von miR-21-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median.
miR-21-Expression > Median	48	4	44	91,7%				
Gesamt	96	9	87	90,6%				

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit								
miR-21-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
miR-21-Expression <= Median	8,220	1,313	5,647	10,793	7,658	.	.	.
miR-21-Expression > Median	13,938	1,553	10,893	16,983	.	.	.	.
Gesamt	12,099	1,468	9,222	14,975	.	.	.	.

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Abbildung 10

Zusammenfassung der Fallverarbeitung					Gesamtvergleiche			
miR-181a-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert		Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
			N	Prozent				
miR-181a-Expression <= Median	48	1	47	97,9%	2,857	1	,091	
miR-181a-Expression > Median	48	8	40	83,3%				
Gesamt	96	9	87	90,6%				

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von miR-181a-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median.

miR-181a-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
miR-181a-Expression <= Median	7,697	,164	7,376	8,019	.	.	.	.
miR-181a-Expression > Median	10,878	1,658	7,629	14,128	.	.	.	.
Gesamt	12,099	1,468	9,222	14,975	.	.	.	.

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Abbildung 12

Zusammenfassung der Fallverarbeitung					Gesamtvergleiche			
miR-210-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert		Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
			N	Prozent				
miR-210-Expression <= Median	48	1	47	97,9%	2,606	1	,106	
miR-210-Expression > Median	48	8	40	83,3%				
Gesamt	96	9	87	90,6%				

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von miR-210-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median.

miR-210-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
miR-210-Expression <= Median	7,697	,164	7,376	8,019	.	.	.	.
miR-210-Expression > Median	11,069	1,615	7,904	14,234	.	.	.	.
Gesamt	12,099	1,468	9,222	14,975	.	.	.	.

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Abbildung 14

Zusammenfassung der Fallverarbeitung					Gesamtvergleiche			
miR-375-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert		Log Rank (Mantel-Cox)	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
			N	Prozent				
miR-375-Expression <= Median	48	4	44	91,7%	,020	1	,888	
miR-375-Expression > Median	48	5	43	89,6%				
Gesamt	96	9	87	90,6%				

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von miR-375-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median.

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

miR-375-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
miR-375-Expression <= Median	13,143	1,917	9,386	16,899	.	.	.	.
miR-375-Expression > Median	10,638	1,519	7,660	13,615	.	.	.	.
Gesamt	12,099	1,468	9,222	14,975	.	.	.	.

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Abbildung 15

Zusammenfassung der Fallverarbeitung

miR-210-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Gesamtzahl	Anzahl der Ereignisse	Zensiert	
			N	Prozent
miR-210-Expression <= Median	48	3	45	93,8%
miR-210-Expression > Median	48	16	32	66,7%
Gesamt	96	19	77	80,2%

Gesamtvergleiche

	Chi-Quadrat	Freiheitsgrade	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,266	1	,022

Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen für die verschiedenen Stufen von miR-210-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median.

Mittelwerte und Mediane für die Überlebenszeit

miR-210-Expression im Primarius aufgeteilt nach Median	Mittelwert <sup>a</sup>				Median			
	Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall		Schätzer	Standardfehler	95%-Konfidenzintervall	
			Untere Grenze	Obere Grenze			Untere Grenze	Obere Grenze
miR-210-Expression <= Median	5,451	,145	5,166	5,735	5,622	,000	.	.
miR-210-Expression > Median	5,227	,688	3,878	6,576	6,441	1,833	2,848	10,034
Gesamt	5,769	,600	4,593	6,946	6,441	1,543	3,416	9,466

a. Die Schätzung ist auf die längste Überlebenszeit begrenzt, wenn sie zensiert ist.

Abbildung 22

miRNA-Expression		25%-Quantil	Median	75%-Quantil
miR-9-Expression im Primarius	G1	0,18946	0,37802	0,50983
	G2	0,22000	0,39956	1,04169
	G3	0,33547	0,80001	3,31882
miR-10b-Expression im Primarius	G1	6,18139	7,77898	11,98404
	G2	4,24972	6,71038	9,03311
	G3	2,05801	3,88047	6,82476
miR-181a-Expression im Primarius	G1	0,89377	1,90536	3,03027
	G2	1,25200	1,57628	2,17819
	G3	1,47803	2,33971	3,52469
miR-210-Expression im Primarius	G1	0,17999	0,29227	0,60374
	G2	0,17497	0,38141	0,49411
	G3	0,43961	0,65433	1,21486



Abbildung 23

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-21-Expression im Primarius</b>	T1	0,25718	0,49185	0,78075
	T2	0,43565	0,69326	1,05947
	T3	0,57624	0,78494	1,04429

Abbildung 24

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-9-Expression im Primarius</b>	ER-negativ	0,65233	1,31816	11,73670
	ER-positiv	0,19541	0,41397	1,13464
<b>miR-10b-Expression im Primarius</b>	ER-negativ	1,31518	3,19490	5,34215
	ER-positiv	3,47222	6,50785	9,56400
<b>miR-210-Expression im Primarius</b>	ER-negativ	0,62132	0,97262	2,25659
	ER-positiv	0,19819	0,40826	0,59013
<b>miR-375-Expression im Primarius</b>	ER-negativ	0,04879	0,16870	0,60510
	ER-positiv	0,19311	0,54130	1,14412

Abbildung 25

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-9-Expression im Primarius</b>	PR-negativ	0,56377	1,25548	3,52068
	PR-positiv	0,18946	0,35717	0,69435
<b>miR-10b-Expression im Primarius</b>	PR-negativ	2,12272	4,15953	7,02847
	PR-positiv	3,59496	6,50785	8,88022
<b>miR-210-Expression im Primarius</b>	PR-negativ	0,31471	0,55684	1,01064
	PR-positiv	0,19981	0,40826	0,59688
<b>miR-181a-Expression im Primarius</b>	PR-negativ	1,56156	2,50391	3,71333
	PR-positiv	1,24783	1,67921	2,56452

Abbildung 26

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-9-Expression im Primarius</b>	HER2 negativ	0,19541	0,41397	1,28848
	HER2 positiv	0,65126	0,83619	2,27283

Abbildung 27

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-10b-Expression im Primarius</b>	kein Lokalrezidiv	3,60274	6,18139	8,88022
	Lokalrezidiv	1,87976	3,27785	6,12918
<b>miR-181a-Expression im Primarius</b>	kein Lokalrezidiv	1,23932	1,69673	2,58948
	Lokalrezidiv	2,02884	2,84927	4,74729
<b>miR-210-Expression im Primarius</b>	kein Lokalrezidiv	0,19658	0,40742	0,59688
	Lokalrezidiv	0,51120	1,18714	4,52123

Abbildung 28

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-375-Expression im Primarius</b>	T1	0,04879	0,12521	0,29123
	T2	0,99060	1,21260	1,62569

Abbildung 29

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-9-Expression im Primarius</b>	PR-negativ	0,54597	2,02235	3,11202
	PR-positiv	0,09323	0,20593	0,89803

Abbildung 30

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-181a-Expression im Primarius</b>	HER2 negativ	2,33250	3,26905	4,76649
	HER2 positiv	0,96694	1,19372	1,42050

Abbildung 31

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-375-Expression im Lokalrezidiv</b>	ER-negativ	0,01309	0,02126	0,08413
	ER-positiv	0,14909	1,55084	1,93331

Abbildung 32

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-210-Expression im Lymphknoten</b>	kein DCIS	0,43809	4,36811	4,94705
	DCIS	0,19759	0,25832	0,53915

Abbildung 33

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-375-Expression im Lymphknoten</b>	keine LIN	0,01723	0,09469	0,18978
	LIN	0,68962	0,74381	6,17912

Abbildung 34

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-10b-Expression im Lymphknoten</b>	T1	1,42190	2,56997	4,10187
	T2	3,90570	6,13580	9,49935
	T3	3,93121	6,82903	6,93732

Abbildung 35

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-9-Expression im Lymphknoten</b>	G1	0,15380	0,21507	0,27778
	G2	0,13279	0,21701	0,42679
	G3	0,55234	0,90841	2,71094
<b>miR-375-Expression im Lymphknoten</b>	G1	0,07970	0,14218	0,14228
	G2	0,13749	0,51866	2,05494
	G3	0,00937	0,03694	0,08895

Abbildung 36

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-9-Expression im Lymphknoten</b>	ER-negativ	0,59697	1,19594	11,10697
	ER-positiv	0,17760	0,32992	0,72392
<b>miR-375-Expression im Lymphknoten</b>	ER-negativ	0,00278	0,03579	0,06169
	ER-positiv	0,04432	0,14558	0,74381

Abbildung 37

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-9-Expression im Lymphknoten</b>	PR-negativ	0,43333	1,18935	3,93841
	PR-positiv	0,13279	0,22634	0,50772
<b>miR-375-Expression im Lymphknoten</b>	PR-negativ	0,01094	0,04931	0,09848
	PR-positiv	0,05990	0,18118	0,74381

Abbildung 38

A

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-210-Expression im Lokalrezidiv</b>	keine adjuvante Chemotherapie	0,28027	0,37852	0,43609
	adjuvante Chemotherapie	0,77079	1,11040	2,07586

B

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-10b-Expression im Lokalrezidiv</b>	keine endokrine Therapie	2,20117	2,75679	3,43380
	endokrine Therapie	4,22993	6,65262	11,35200

C

<b>miRNA-Expression</b>		<b>25%-Quantil</b>	<b>Median</b>	<b>75%-Quantil</b>
<b>miR-21-Expression im Lokalrezidiv</b>	keine Trastuzumab-Gabe	0,45898	0,57952	0,92466
	Trastuzumab-Gabe	1,33182	2,24491	3,15800

## **8.6 Danksagung**

(in der elektronischen Version entfernt)

## **8.7 Lebenslauf**

(in der elektronischen Version entfernt)