

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. P. K. Mallmann

ESR1-Promotormethylierung und ER-Expression beim metastasierten Mammakarzinom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Leonie Strake
aus Salzkotten

promoviert am 25. Januar 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. V. Kirn
2. Gutachterin: Universitätsprofessorin Dr. med. Dr. rer. nat. M. R. Schweiger

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Priv.-Doz. Dr. med. Verena Kirn
Prof. Dr. rer. nat. Margarete Odenthal
Prof. Dr. med. Jochen Fries

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch die biologisch-technischen Assistentinnen Frau Eischeid-Scholz und Frau Koitzsch von mir selbst ausgeführt worden.

Die mikroskopische Begutachtung erfolgte gemeinsam mit Prof. Dr. med. Jochen Fries.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichtete mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 21.03.2022

Unterschrift:

Leonie Strake

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Priv.-Doz. Dr. med. Verena Kirn für die Überlassung des Themas, viele wertvolle Tipps, Anregungen und die große Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Ohne ihre fortwährende Motivation und Hilfsbereitschaft sowie ihre Begeisterung für die Senologie wäre die Erstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten AG Odenthal, insbesondere bei Hannah Eischeid-Scholz und Ulrike Koitzsch, bedanken. Danke für die Aufnahme in die Studiengruppe sowie die geduldige und ausdauernde Betreuung. Ihre Anleitungen und die Hilfsbereitschaft bei Versuchen und Auswertungen bilden die Grundlage dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Frau Prof. Dr. rer. nat. Odenthal für die wissenschaftliche Unterstützung und ihre stets konstruktiven Anregungen.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. Fries für die Einblicke in die klinische Pathologie und die vielen gemeinsamen Stunden am Mikroskop.

Ich danke allen Brustkrebspatientinnen, die durch ihre Gewebe-Asservierung die Forschung am Mammakarzinom ermöglicht haben.

Insbesondere danke ich meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, für ihre unermüdliche Unterstützung und Förderung.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Ehemann Simon dafür danken, dass er mich stets motiviert, anspornt und mich mit unfassbarer Geduld begleitet.

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	9
2.1 Das Mammakarzinom	9
2.1.1. Epidemiologie	9
2.1.2. Ätiologie	9
2.1.3. Histopathologie	10
2.1.4. Diagnostik	11
2.1.5. Staging und Grading	12
2.1.6. Metastasierung	14
2.1.7. Therapie und Prognose des metastasierten Mammakarzinoms	18
2.2 DNA-Methylierung	19
2.3 Östrogenrezeptor	20
2.4 Zielsetzung	22
3. MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 Material	23
3.1.1. Patientenkollektiv	23
3.1.2. Makrodissektion	23
3.1.3. DNA-Extraktion	23
3.1.4. Bisulfit-Konversion	23
3.1.5. Real-time PCR	24
3.1.6. Geräte	24
3.1.7. Für alle Versuchsteile	24
3.2 Methoden	25
3.2.1. Makrodissektion	25
3.2.2. DNA-Isolation	26
3.2.3. Bisulfit-Konversion	26
3.2.4. Methylierungsspezifische real-time PCR	28
3.2.5. TaqMan Assay	30

4.	ERGEBNISSE	32
4.1	Vorversuche	32
4.1.1.	Kontrollgruppe	32
4.1.2.	Validierung der Methodik	33
4.1.3.	Positiv- und Negativkontrolle	37
4.2	Patientenkollektiv	39
4.3	Aufteilung des Primarius und der Metastasen	41
4.4	Wechsel des Methylierungs- und immunhistochemischen Rezeptorstatus	41
4.5	Überlebensanalyse	42
5.	DISKUSSION	44
5.1	Repräsentativität des Kollektivs	44
5.2	Ist die ESR1-Methylierung ein valider Marker?	46
5.3	ESR1-Methylierung als prädiktiver Marker	47
5.4	Limitationen und Ausblick	49
6.	LITERATURVERZEICHNIS	52
7.	ANHANG	59
7.1	Abbildungsverzeichnis	59
7.2	Tabellenverzeichnis	60
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	61

Abkürzungsverzeichnis

5-JÜ	5-Jahres-Überlebensrate
A	Adenin
BRCA-Gen	Breast Cancer Gen
C	Cytosin
CT	Computertomographie
DBD	DNA-bindender Bereich
DCIS	duktales Karzinom in situ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTM	DNA-Methyltransferase
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
ESR	Östrogenrezeptor
ESR1	Östrogenrezeptor- α /Östrogenrezeptor-1
ESR2	Östrogenrezeptor- β /Östrogenrezeptor-2
FFPE	in Formalin fixierte und Paraffin eingebetteten Probe
G	Guanin
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbungen
HER2	human epidermal growth receptor 2
HR	Hormonrezeptor
IDC	invasiv duktales Karzinom
IRS	Immune Reactive Score
LCIS	lobuläres Karzinom in situ
MSP	methylierungsspezifischer PCR
NOS	invasiv duktales Karzinom Typ „nicht näher bezeichnet“
p	Phosphodiesterbindung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
PR	Progesteronrezeptor
RKI	Robert-Koch-Institut
T	Thymin
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	world health organisation

1. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die weltweit häufigste maligne Erkrankung und die zweithäufigste Todesursache bei Frauen. In Deutschland liegt die Inzidenz bei rund 166 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen. Bei knapp vier Prozent aller Patientinnen wird das Karzinom bereits im metastasierten Stadium diagnostiziert. Zusätzlich entwickeln über 30 % aller anderen Patientinnen im Laufe der Zeit eine Metastase. Im metastasierten Stadium ist die Therapie in der Regel palliativ. Dennoch sind die Verlängerung des progressfreien Überlebens unter Erhalt der Lebensqualität wichtige Therapieziele. Eine entscheidende Rolle in Bezug auf das Therapieansprechen spielt die endokrine Resistenz. Patientinnen mit initial Östrogenrezeptor-positivem Primarius zeigen einen Expressionsverlust in der Metastase. Hierdurch werden Östrogenmodulatoren wirkungslos, was zu einer schlechteren Prognose und einer geringeren Überlebenschance führt. Noch gibt es keinen verlässlichen Marker, der den Verlauf und das Überleben der Patientinnen sicher vorhersagen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, den Methylierungsstatus des Östrogenrezeptorpromotors in Primarius und Metastase mithilfe der methylierungsspezifischen PCR zu bestimmen und diesen mit der immunhistochemischen Östrogenrezeptorausprägung in Verbindung zu setzen. Zusätzlich sollte herausgefunden werden, ob sich die Methylierung des Östrogenrezeptors als prädiktiver Marker eignet. In unsere Studie konnten 25 Patientinnen eingeschlossen werden, bei denen eine FFPE-Probe von Primarius und Metastase vorlag.

In unserer Untersuchung zeigten 22 der 25 Primärtumore eine Expression des Östrogenrezeptors. Von diesen 22 ER-positiven Tumoren hatten 17 einen methylierten ESR1-Promotor. Auch bei den Metastasen waren 15 der 16 ER-positiven Proben methyliert. Bei den ER-negativen Tumoren zeigte sich eine inverse Korrelation von Methylierung und Rezeptorexpression in 91 % der Fälle. Bei sieben von 19 Patientinnen mit methyliertem ESR1-Promotor im Primarius kam es zu einem Expressionsverlust des Östrogenrezeptors bei der Metastase. Bei den übrigen sechs unmethylierten Primärtumoren kam ein Expressionsverlust nicht vor. Das heißt, keine Patientin mit unmethyliertem ESR1-Promotor entwickelte eine endokrine Resistenz. Durch einen methylierten Promotor stieg das Risiko zur Entwicklung einer endokrinen Resistenz von 28 % (7/25) auf 37 % (7/19). Zusätzlich zeigten Patientinnen mit Promotormethylierung ein schlechteres Überleben ab Metastasierung (38,1 Monate vs. 54,3 Monate n.s.) und Gesamtüberleben (105,3 Monate vs. 126,0 Monate, n.s.).

Die Ergebnisse zeigen die Wichtigkeit der ESR1-Promotormethylierung und seinen Nutzen als prädiktiver Marker auf. Patientinnen mit initial methyliertem ESR1-Promotor haben ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer endokrinen Resistenz, sowie eine schlechtere Überlebenschance. Eine frühzeitige Biopsie und Bestimmung des Methylierungsstatus könnte einen Expressionsverlust des ER und somit die Resistenz für eine antiöstrogene Therapie vorhersagen.

2. Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1. Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste maligne Erkrankung der Frau. Darüber hinaus ist es bei Frauen die zweithäufigste Krebstodesursache nach Lungenkrebs ¹.

2018 lag die Inzidenz des Mammakarzinoms in Deutschland bei rund 166 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen, was einer absoluten Zahl von etwa 70.000 entspricht. Somit ist Brustkrebs mit einem Anteil von 30 % an allen Krebsneuerkrankungen die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Mit einem Lebenszeitrisiko von 12,4 % erkrankt statistisch gesehen jede achte Frau in ihrem Leben an Brustkrebs. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Eine Erkrankung vor dem 50. Lebensjahr tritt bei einer von sechs betroffenen Frauen auf. Etwa 40 % der Frauen sind bei Erstdiagnose älter als 70 Jahre ². Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜ) liegt bei fast 90 %, was sich vor allem durch die mittlerweile guten und individualisierten Therapiemöglichkeiten erklären lässt. Aber auch das Mammographie-Screening hat zur Senkung der Mortalität des Mammakarzinoms beigetragen. Auch Männer können an Brustkrebs erkranken. Jedoch ist der Anteil mit 1 % an allen Brustkrebsfällen sehr gering ^{2,3}.

2.1.2. Ätiologie

Es gibt diverse Risikofaktoren, die zur Tumorentwicklung beitragen können. Hierzu zählen vor allem genetische und hormonelle Risikofaktoren.

Ungefähr 5 bis 10 % der Mammakarzinome sind erblich bedingt ⁴. Ursächlich hierfür ist vor allem eine Mutation des BRCA1- (BReast CAncer 1) oder des BRCA2- (BReast CAncer 2) Gens. BRCA1 und BRCA2 sind Tumorsuppressorgene, welche eine entscheidende Rolle bei der DNA-Reparatur spielen. Ist eine Frau Trägerin einer Mutation in einem der beiden Gene, steigt ihr Lebenszeitrisiko für Brustkrebs auf 60 bis 80 %. Zusätzlich erkranken vor allem BRCA1-Mutationsträgerinnen deutlich früher an Brustkrebs verglichen mit nicht-erblich bedingtem Brustkrebs ^{5,6}. Auch eine familiäre Häufung an Brust- und Eierstockkrebserkrankungen erhöht das eigene Risiko an Brustkrebs zu erkranken ^{3,7}. Frauen mit einem kontralateralen Mammakarzinom in der Vorgeschichte haben zudem ein zwei- bis sechsfach erhöhtes Risiko, erneut an Brustkrebs zu erkranken ⁸.

Es gibt verschiedene hormonelle Faktoren, die das Risiko für Brustkrebs beeinflussen. Dies gilt speziell für östrogen- und progesteronpositive Tumore. Ein langer hormonell aktiver Zeitraum ist ein Hauptrisikofaktor. Demnach steigert eine frühe Menarche und späte Menopause das Risiko an Brustkrebs zu erkranken ⁹⁻¹¹. Auch Frauen, die nie schwanger

waren und auch nicht gestillt haben, zeigen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Andersherum wirken sich viele Schwangerschaften und eine lange Stillzeit protektiv aus¹². Bei Frauen, die in hohem Alter erstmals schwanger sind, ist ein höheres Brustkrebsrisiko festzustellen als bei Frauen, bei denen nur eine geringe Zeitspanne zwischen Menarche und erster Geburt liegt¹³. Zusätzlich kann eine postmenopausale Hormonersatztherapie, vor allem mit östrogen- und progesteronhaltigen Präparaten die Wahrscheinlichkeit erhöhen, an Brustkrebs zu erkranken^{9,11,14}.

Ein weiterer wichtiger Risikofaktor ist das Lebensalter der Frau. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an Brustkrebs zu erkranken stetig an¹⁵. Auch Übergewicht, mangelnde Bewegung, Strahlenexposition des Brustkorbs im Kinder- oder Jugendalter, Zigarettenrauchen und übermäßiger Alkoholkonsum sollen das Erkrankungsrisiko erhöhen^{2,16-19}.

2.1.3. Histopathologie

95 % der Mammakarzinome sind Adenokarzinome. Histologisch lassen sich lobuläre und duktale Neoplasien unterscheiden²⁰.

Der größte Anteil der Tumore gehen vom Duktusepithel aus. Das duktale carcinoma in situ (DCIS) ist eine prä maligne Läsion, die jedoch noch lokal von der Basalmembran der Brustdrüsengänge begrenzt wird. Wird die Basalmembran durchbrochen, entsteht ein invasiv duktales Karzinom (IDC). Studien ordnen 40 bis 75 % aller invasiven Karzinome dem invasiv duktales Karzinom mit dem Typ „nicht näher bezeichnet“ (NOS) zu²¹. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe verschiedener histologischer Untertypen, die jedoch keine spezifischen histologischen Merkmale aufweist, wie es bei anderen Unterformen des Mammakarzinoms der Fall ist. Oft wachsen die Tumorzellen netz- oder strangförmig in kohäsiven Tumorzellverbänden. Des Weiteren zählen zu den duktales Karzinomen noch seltene Sonderformen, wie das medulläre, tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinom²⁰.

Auch bei der Gruppe der lobulären Neoplasien lassen sich in-situ-Karzinome und invasive Karzinome unterscheiden. Als lobuläres carcinoma in situ (LCIS) wird eine neoplastische Proliferation innerhalb der Läppchen der Brustdrüsen mit intakter Basalmembran bezeichnet. Das LCIS ist ein seltenes in-situ-Karzinom und zeichnet sich durch Mikroverkalkungen, multizentrisches und bilaterales Auftreten aus²². Das LCIS ist keine obligate Präkanzerose, aber es erhöht das Risiko an einem invasiven Karzinom zu erkranken²⁰. Das invasive lobuläre Karzinom macht 10 bis 15 % aller Mammakarzinome aus²³. Es geht wie auch das LCIS von den Epithelzellen der Drüsenläppchen der Brust aus. Jedoch durchdringt das invasiv lobuläre Karzinom die Basalmembran und infiltriert das umliegende Gewebe. Das Wachstum ist meist diffus und nicht kohäsiv²⁰. Charakteristisch ist ein gänsemarschartiges Wachstum, bei dem die Tumorzellen in einer Reihe hintereinander liegen. Auch eine Schießscheibenanordnung mit kreisförmigen Tumorverbänden um die Drüsengänge ist typisch²².

Neben dem invasiven und dem nicht invasiven Mammakarzinom gibt es noch Sonderformen, die sich keiner dieser Gruppen zuordnen lassen. Der Morbus Paget der Mamille stellt ein Mammakarzinom dar, welches das Mamillenepithel infiltriert. Klinisch imponiert eine ekzemartige Veränderung der Mamille^{24,25}. Auch das inflammatorische Karzinom nimmt eine Sonderstellung ein. Es ist ein seltenes und aggressives Mammakarzinom. Histologisch liegt kein spezieller Typus vor. Das inflammatorische Karzinom breitet sich über die Lymphbahnen der Haut aus und führt zu diffusen Rötungen und Schwellungen der Brust. Durch die schnelle Ausbreitung und die unspezifische Symptomatik wird das inflammatorische Karzinom häufig erst spät diagnostiziert und hat dadurch eine schlechte Prognose²⁴.

Zusammenfassend lassen sich die histologischen Subtypen des Mammakarzinoms wie folgt darstellen^{22,24}:

- Nicht invasiv
 - o duktales Karzinom in situ (DCIS)
 - o lobuläres Karzinom in situ (LCIS)
- Invasiv
 - o Invasives duktales Karzinom, nicht weiter spezifiziert (NOS)
 - o Invasives lobuläres Karzinom
 - o Muzinöses (Gallert-)Karzinom
 - o Medulläres Karzinom
 - o Papilläres Karzinom
 - o Tubuläres Karzinom
- Sonderform
 - o Morbus Paget der Mamille
 - o Inflammatorisches Karzinom

2.1.4. Diagnostik

Jede Frau sollte im Rahmen der Brustkrebsvorsorge ihre eigene Brust regelmäßig abtasten, um etwaige Veränderungen abklären zu lassen. Ab dem 30. Lebensjahr werden die Brust und die regionären Lymphabflussgebiete auch durch den niedergelassenen Gynäkologen inspiziert und palpiert. Zusätzlich erfolgt eine gezielte Eigen- und Familienanamnese. Zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr hat die Frau zusätzlich alle 24 Monate Anspruch auf die Teilnahme am Mammographie-Screeningprogramm. Kommt es bei der Mammographie zu einem auffälligen Befund, wird als Abklärungsdiagnostik eine Biopsie und/oder Mammasonographie empfohlen²⁶. Am Biopsiepräparat kann anschließend der histologische Typ und der Differenzierungsgrad bestimmt werden. Außerdem wird der Hormonrezeptorstatus, bestehend aus Östrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR), der HER2-Status sowie der Ki67-Wert bestimmt²⁷. Ist ein Mammakarzinom diagnostiziert

worden, folgen je nach klinischem Stadium weiterführende bildgebende Verfahren zur Detektion von Fernmetastasen. Die aktuellen Leitlinien empfehlen im Falle einer Staging-Indikation die Anwendung einer Computertomographie (CT) des Thorax und Abdomens. Weitere Verfahren kommen je nach Befund im CT oder entsprechender Symptomatik zum Einsatz ^{28,29}.

2.1.5. Staging und Grading

Um den Differenzierungsgrad des Tumors zu bestimmen, wird das Grading nach Elston und Ellis angewandt (siehe Tabelle 1). Hierbei werden die Kriterien Tubulusbildung, Kernpolymorphie und Mitoserate betrachtet und bewertet. Für jedes Kriterium werden 1 bis 3 Punkte vergeben. Je geringer die Punktzahl, desto besser differenziert ist der Tumor. Der abschließend gebildete Summenscore bestimmt die Grade G1 für gut differenzierte Tumore, G2 für mäßig differenzierte Tumore und G3 für schlecht differenzierte Tumore. Je geringer der Gradingscore ist, desto besser ist die Prognose ³⁰.

Tabelle 1: Grading nach Elston und Ellis ³⁰

	Kriterien	Score
Tubulusbildung	>75 %	1
	10-75 %	2
	10 %	3
Kernpolymorphie	gering	1
	mäßig	2
	stark	3
Mitoserate	abhängig vom Mikroskop	1-3

Summenscore: 3-9		
Summe	Grading	Definition
3-5	G1	gut differenziert
6-7	G2	mäßig differenziert
8-9	G3	schlecht differenziert

Das Mammakarzinom lässt sich anhand der Primärtumorgröße (T), der Ausdehnung des Lymphknotenbefalls (N) und dem Bestehen von Fernmetastasen (M) einteilen. Mithilfe dieser TNM-Klassifikation erfolgt die Stadieneinteilung der Union Internationale Contre le Cancer (UICC). Anhand der UICC-Klassifikation kann die Prognose der Patientin abgeschätzt und die erforderliche Therapie abgeleitet werden ³¹.

Die Tabellen 2 und 3 zeigen die detaillierte Aufteilung der TNM-Klassifikation und der Stadieneinteilung nach UICC für das Mammakarzinom.

Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms ³²

T (Primärtumor)	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	≤ 2 cm in größter Ausdehnung
T1mic	≤ 0,1 cm
T1a	> 0,1 cm bis 0,5 cm
T1b	> 0,5 cm bis 1 cm
T1c	> 1 cm bis 2cm
T2	> 2 cm bis 5 cm
T3	> 5cm
T4	jede Größe mit direkter Infiltration der Brustwand und/oder der Haut
T4a	Infiltration der Brustwand
T4b	Ulzeration, Satellitenknötchen der Haut ipsilateral oder Hautödem
T4c	T4a und T4b
T4d	Inflammatorisches Karzinom

N (Lymphknotenbefall)	
pNX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
pN1	Mikrometastasen; Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN1mic	Mikrometastase
pN1a	Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten
pN1b	mikroskopische Lymphknotenmetastasen entlang der A. mammaria interna
pN1c	Metastasen in 1-3 axillären Lymphknoten <i>und</i> entlang der A. mammaria interna
pN2	Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten <i>oder</i> in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Beteiligung
pN2a	Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten
pN2b	Metastasen in klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Lymphknotenmetastasen
pN3	Metastasen wie nachfolgend beschrieben:
pN3a	Metastasen in 10 oder mehr axillären Lymphknoten <i>oder</i> in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit mindestens einer axillären Lymphknotenmetastase <i>oder</i>

Lymphknotenmetastasen in mehr als 3 axillären Lymphknoten und entlang der
A. mammaria interna

pN3c Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

M (Fernmetastasen)	
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC ³²

Stadium (UICC)	T	N	M
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1mic	N0	M0
	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
	T1c	N0	M0
Stadium IIA	T0-1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T0-2	N2	M0
	T3	N1-2	M0
Stadium IIIB	T4	N0-2	M0
Stadium IIIC	T1-4	N3	M0
Stadium IV	T1-4	N0-3	M1

2.1.6. Metastasierung

Knapp 4 % aller Patienten mit Mammakarzinom werden in einem bereits metastasierten Stadium diagnostiziert. Zusätzlich entwickeln sich bei über 30 % aller Patienten mit initial negativem Lymphknotenstatus trotz erfolgreicher Therapie des Primarius im Laufe der Zeit Metastasen ^{33,34}.

Die Metastasierung des Mammakarzinoms ist ein komplexer und mehrstufiger Prozess, der bis heute nicht vollständig geklärt ist ³⁵. Das Mammakarzinom metastasiert bereits früh sowohl lymphogen als auch hämatogen ²⁹. Zu den Faktoren, die die Metastasierung beeinflussen, gehören unter anderem die Angiogenese, die Tumorzellinvasion und –zirkulation sowie die Proliferation ³⁶.

Regionäre Lymphknoten sind die primäre Zuflussstelle der Lymphdrainage aus allen Bereichen der Brust. Das Ausmaß ihrer Beteiligung am Mammakarzinom gilt deshalb als ein starker Prädiktor für Rezidive und das Überleben der Frau ³⁷. Damit der Tumor über den

lymphatischen Weg metastasieren kann, bedarf es einen Anschluss an das Lymphsystem, um von dort in die regionären Lymphknoten zu gelangen. Durch Lymphangiogenese entstehen neue Lymphgefäße aus bestehenden Lymphbahnen oder lymphatischen Endothelzellen. Das lymphangiogenetische Wachstum wird durch Zytokine, wie VEGF-C (vascular endothelial growth factor C) und VEGF-D (vascular endothelial growth factor D) getriggert, welche vom Tumor sezerniert werden. Diese Zytokine binden an spezifischen Rezeptoren auf lymphatischen Endothelzellen und induzieren somit die Proliferation und das Wachstum neuer Lymphgefäße. Durch einen erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck im Tumor durch das Tumorstromung gelangen die Tumorzellen in den extrazellulären Raum und von dort in die neu entstandenen Lymphgefäße. Somit steht die Größe, beziehungsweise das Volumen des Primärtumors, im direkten Zusammenhang mit der Metastasierung in die regionären Lymphknoten^{38,39}.

Abbildung 1 stellt den Weg der lymphogenen Metastasierung bildlich dar.

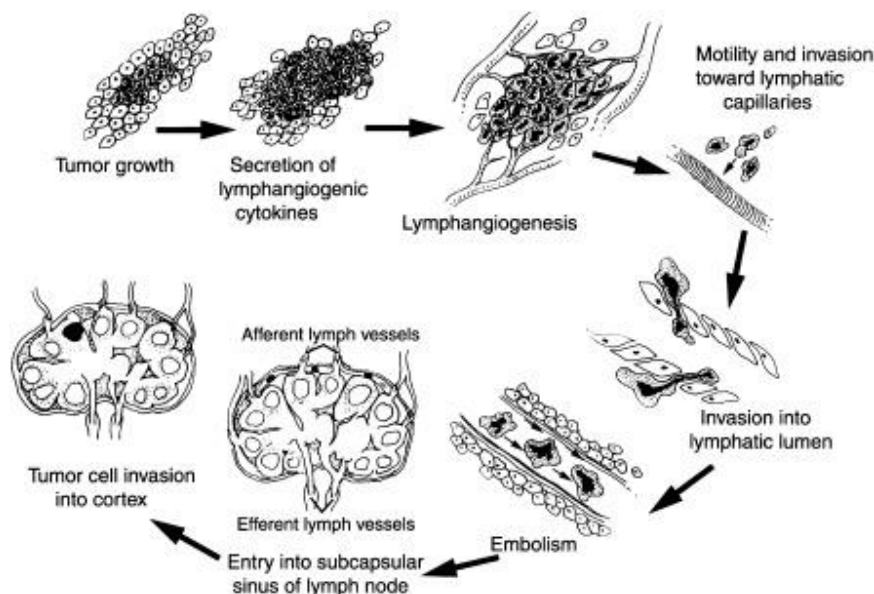


Abbildung 1: Weg der lymphogenen Metastasierung

Im Laufe der Zeit nimmt der Primärtumor an Größe zu. Dadurch werden vermehrt lymphangiogene Zytokine sezerniert, die dazu führen, dass neue Lymphgefäße in den Tumor wachsen. Die Tumorzellen dringen nun in die extrazelluläre Matrix ein und bewegen sich in Richtung der Lymphkapillaren. Anschließend wandern sie in das lymphatische Lumen und mit dem Lymphstrom in Richtung der Sentinel-Lymphknoten. Dort angekommen dringen die Tumorzellen zunächst in den subkapsulären Sinus des Lymphknotens und anschließend in den Lymphknotenkortex ein. Von dort proliferieren und metastasieren die Zellen in andere Lymphknoten³⁸.

Die lymphogene Metastasierung ist zudem auch von der genauen Karzinomlokalisierung abhängig. Das Mammakarzinom ist zu gut 55 % im äußeren oberen Quadranten lokalisiert, da sich dort der größte Anteil des Drüsengewebes befindet⁴⁰. Die restliche Häufigkeitsverteilung ist Abbildung 2 zu entnehmen. Tumore im äußeren Quadranten metastasieren vor allem in axillären Lymphknoten. Tumore der inneren Quadranten breiten sich meist über die

Mammaria-interna-Kette aus. Ein axillärer Lymphknotenbefall ist aber dennoch auch hier möglich. Von den axillären Lymphknoten kann eine weitere Ausbreitung auf die supra- und infraklavikulären Lymphbahnen erfolgen ²⁵. Die axillären Lymphknoten werden anatomisch in drei Level unterteilt ³²:

- Level I: lateral des lateralen Randes des M. pectoralis minor
- Level II: zwischen medialem und lateralem Rand des M. pectoralis minor sowie interpektorale Lymphknoten
- Level III: apikale Lymphknoten und Lymphknoten medial des medialen Randes des M. pectoralis minor

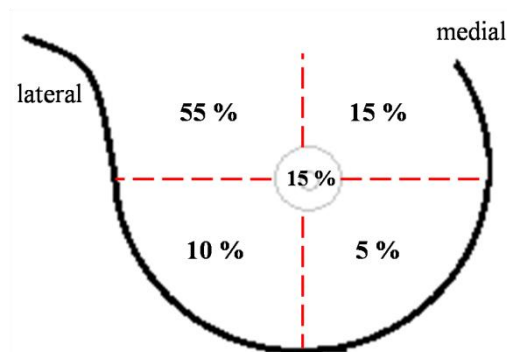


Abbildung 2: Lokalisation des Mammakarzinoms

Darstellung der rechten Brust; Ungefähr 55 Prozent der Mammakarzinome sind im oberen äußeren und 15 Prozent im oberen inneren Quadranten lokalisiert. Im unteren äußeren Quadranten liegt etwa jeder Zehnte Tumor, während sich im unteren inneren Quadranten rund 5 Prozent befinden. Im zentralen Mamillenbereich sind ca. 15 Prozent der Karzinome lokalisiert ⁴⁰.

Die Sentinel-Lymphknoten sind die ersten regionären Lymphknoten, in die der Tumor metastasiert. Sobald die Tumorzellen den Sentinel-Lymphknoten befallen haben, erfolgt die Ausbreitung in die nächsten Ebenen. Das kann die Infiltration weiterer Lymphknotenstationen bedeuten. Zusätzlich kann durch lymphvenöse Verbindung aber auch ein Anschluss an den allgemeinen systemischen Kreislauf geschaffen werden. Eine direkte hämatogene Metastasierung ohne Sentinel-Lymphknotenbefall ist zudem möglich ³⁸.

Fernmetastasen entstehen durch hämatogene Metastasierung. Die Seed-and-Soil-Theorie von Paget zur nicht-zufälligen Metastasierung ist bis heute weitgehend gültig. Die Theorie besagt, dass sich Tumorzellen (Seed), welche in das Gefäßsystem übergegangen sind, nur dort zu Metastasen entwickeln, wo besonders günstige gewebsspezifische Faktoren (Soil) zu finden sind ⁴¹. Der genaue Mechanismus der hämatogenen Metastasierung ist jedoch noch nicht geklärt. Abbildung 3 gibt einen groben Überblick über diesen Metastasierungsweg. Damit eine Fernmetastase entstehen kann, müssen verschiedene natürliche Barrieren überwunden werden. Zusätzlich muss die Tumorzelle im fremden Milieu des Zielorgans überleben und dort heranwachsen können. Es wird geschätzt, dass 99,98 % der Tumorzellen dieses Stadium

nicht erreichen. Die restlichen 0,02 % besitzen die nötigen genetischen Charakteristika und Modifikationen. Beispielsweise durch epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) können Tumorzellen die Fähigkeit zur Migration erlangen. EMT sorgt dafür, dass Tumorzellen Enzyme sezernieren können, welche die Extrazellulärmatrix zerstören können. ⁴².

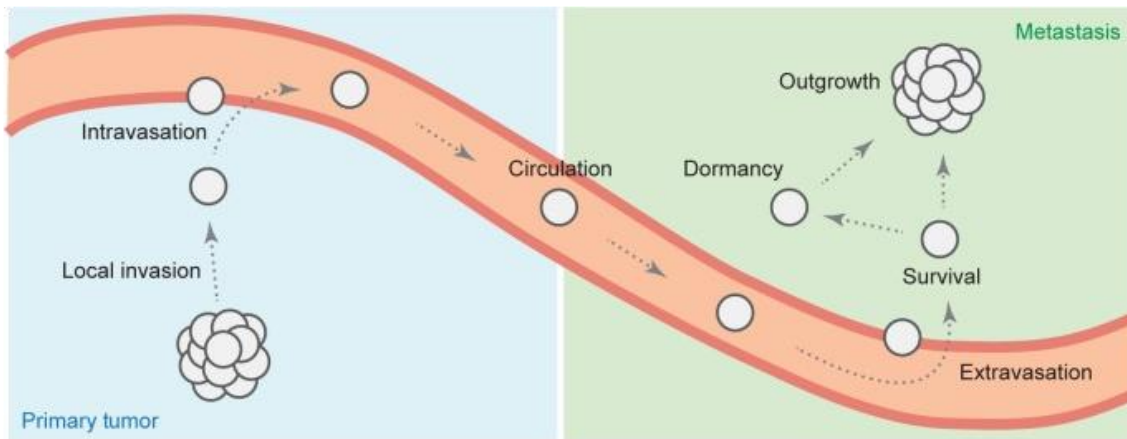


Abbildung 3: Weg der hämatogenen Metastasierung

Die Schritte der hämatogenen Metastasierungskaskade umfassen zunächst die lokale Invasion und Wanderung zu den Blutgefäßen. Sobald das Blutgefäß erreicht ist, dringen die Tumorzellen in das Gefäß ein und zirkulieren mit dem Blutfluss. Am Zielort verlässt die Tumorzelle das Gefäß. Nur wenn die Zelle in der fremden Umgebung überlebt, kann sie sich vervielfältigen und eine Metastase bilden ⁴².

Die speziellen Eigenschaften der Tumorzellen scheinen auch der Grund für die Affinität des Mammakarzinoms für bestimmte Metastasenlokalisationen zu sein. Tabelle 4 zeigt die Lokalisation und Inzidenz der Fernmetastasen. Aufgeführt sind die klinisch diagnostizierten, sowie bei Autopsie entdeckten Metastasen. Die häufigsten Metastasierungsorte sind demnach Knochen, Lunge, Leber und Gehirn. Auch Lokalrezidive treten häufig auf ⁴³.

Tabelle 4: Lokalisation und Inzidenz von Metastasen ⁴³

Ort	Klinisch diagnostiziert	Bei Autopsie diagnostiziert
Gehirn	5-10 %	30-50 %
Lunge/Pleura	15-20 %	50-75 %
Lokal/regional	20-40 %	30-50 %
Herz	<5 %	25-40 %
Leber	5-15 %	50-75 %
Knochen	20-60 %	60-90 %
intraabdominal	<5 %	30-40 %
Endokrin/ovarial	<5 %	20-40 %

2.1.7. Therapie und Prognose des metastasierten Mammakarzinoms

Im metastasierten Stadium ist die Therapie in der Regel palliativ. Es sollte falls möglich eine Biopsie der Metastase entnommen werden, um den Hormonrezeptorstatus und den HER2-Status zu erheben. Der Rezeptorstatus kann sich im Laufe der Erkrankung verändern. Deshalb ist eine Histologie aus neuen Metastasen erforderlich, um eine bessere Therapieentscheidung treffen zu können. Auch kann durch eine Biopsie ein mögliches Zweitmalignom ausgeschlossen werden ^{44,45}.

Die endokrin-basierte Therapie ist bei hormonrezeptor-positivem (HR-positiv), metastasiertem Mammakarzinom die Therapie der ersten Wahl. Eine Remission ist bei bis zu 60 % der Patientinnen mit HR-positivem Karzinom zu erwarten. Bei einem HER2-positiven Malignom ist mit einem schlechten Ansprechen auf eine endokrine Therapie zu rechnen, selbst wenn einer der Hormonrezeptoren ausgeprägt ist. Bei diesen Patientinnen wird eine Chemotherapie in Kombination mit einer HER2-Antikörper-Therapie empfohlen ⁴⁴.

Auch bei hormonrezeptor-negativen Tumoren wird in der Regel eine Chemotherapie durchgeführt. Hierbei stehen sich die Monotherapie und die Polytherapie gegenüber. Bei einer Polytherapie ist die Remissionsrate höher als bei einer Monotherapie. Da jedoch das Langzeitüberleben ähnlich lang und eine Monotherapie meist auch besser verträglich ist, findet diese häufiger Anwendung. Durch die bessere Verträglichkeit steigt zudem die Compliance der Patientinnen. Eine Polytherapie wird vor allem bei schnell wachsenden, aggressiven Tumoren und hohem Remissionsdruck angewandt ⁴⁶.

Sollte das Mammakarzinom primär in ein Organ metastasiert sein, kann ergänzend zu den oben genannten Systemtherapien eine Lokalthherapie durchgeführt werden. Diese kann je nach befallenen Organ und Befallsmuster Bestrahlungen, Operationen oder medikamentöse Therapien umfassen. Wird ein Mammakarzinom in einem metastasierten Stadium diagnostiziert, hat die Resektion des Primärtumors keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patientin ^{47,48}.

Wichtig ist jedoch, dass die Therapieentscheidung immer individuell getroffen wird. Hierbei sollte der Allgemeinzustand, die Komorbidität, eventuelle Vortherapien und das Alter der Patientin berücksichtigt werden. Auch sollte der Patientenwille mit in die Entscheidungsfindung einfließen. Neben der kausalen Therapie ist auch eine symptomorientierte Therapie für die Lebensqualität der Patientinnen entscheidend ^{44,45,49}.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass das metastasierte Mammakarzinom eine schlechte Prognose hat. Das relative 5-Jahreüberleben lag zuletzt bei 29 % ³. Studien zeigen, dass bei Vorliegen eines Primarius im Stadium T3-4, einer Polymetastasierung oder viszeralen Metastasierung mit einer schlechten Prognose zurechnen ist. Auch das Fehlen einer Hormonrezeptorausprägung reduziert die Prognose ^{50,51}. Vor allem Patienten mit triple-negativem Karzinom haben ein signifikant kürzeres Überleben ^{52,53}. In mehreren Studien

konnte zudem gezeigt werden, dass insbesondere die Expression des Östrogenrezeptors zu einem längeren Überleben führt ^{54,55}.

Bei einem primär metastasierten Mammakarzinom hat ein negativer, im Verhältnis zu einem positiven Östrogenrezeptorstatus, ein ca. 2-fach höheres Risiko für einen Progress. Die fehlende Östrogenrezeptorausprägung führt zu einem ca. 3-fach höheren Sterberisiko. Zudem stellt sich die Zeit bis zum Progress bei negativem Östrogenrezeptor deutlich verkürzt dar ⁵⁰.

2.2 DNA-Methylierung

Aus ein und demselben Genom können mehrere verschiedene Zelltypen entstehen. Dies funktioniert vor allem durch epigenetische Veränderungen, die bestimmen, wie die einheitliche Erbinformation gelesen und verwendet wird. In Tumorzellen kann das genetische Material direkt verändert sein, beispielsweise durch Mutation, Deletion oder Insertion. Jedoch können auch aus einem intakten Genom Tumorzellen entstehen. Dies geschieht zum Beispiel über epigenetische Prozesse wie die DNA-Methylierung ⁵⁶.

Grundlage der Epigenetik sind vererbare Veränderungen der Chromosomen. Sie beeinflussen die Aktivität des Gens, ohne die DNA-Sequenz zu verändern. Die epigenetischen Veränderungen haben Einfluss darauf, wie das Chromatin gepackt und wie erreichbar die genetische Information für die Transkription ist. Auch nach der Zellteilung bleiben die epigenetischen Prozesse erhalten ^{57,58}.

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht aus den vier Nukleinbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C), welche als Dinukleotide angeordnet sind. Die Dinukleotide werden über Phosphodiesterbindungen zusammengehalten. Wird die Base Cytosin (C) über eine Phosphodiesterbindung (p) mit Guanin (G) gebunden, wird dies CpG-Sequenz genannt. Durch Anhängen einer Methylgruppe an die Cytosin-Base wird das CpG-Dinukleotid methyliert. Im menschlichen Genom gibt es ca. 28 Millionen CpG-Dinucleotide. Zu 98 % lassen sich die CpG-Sequenzen vereinzelt und methyliert vorfinden. Die restlichen 2 % liegen in einer hohen Dichte vor und sind meist unmethyliert. Diese Bereiche werden als CpG-Inseln bezeichnet. Die CpG-Inseln befinden sich häufig in der Nähe einer Promotorregion am 5'-Ende eines Gens. Liegen CpG-Inseln in der Nähe eines Promotors in methylierter Form vor, führt dies mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit dazu, dass das zugehörige Gen nicht mehr exprimiert wird. Man spricht in diesem Fall von Gen-Silencing. Dies findet sowohl bei der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms bei weiblichen Individuen als auch bei der genomischen Prägung während der Entwicklung statt ⁵⁷⁻⁵⁹.

Eine unmethylierte CpG-Insel in Promotornähe führt jedoch umgekehrt nicht immer zu einer Expression des betreffenden Gens. Es gibt noch weitere Prozesse, wie beispielsweise das Fehlen von relevanten Transkriptionsfaktoren, die eine Genexpression verhindern können.

Während der Embryogenese wird das individuelle Methylierungsmuster einer jeden Zelle festgelegt und durch die DNA-Methyltransferasen (DNMTs) während des gesamten Lebens des Menschen aufrechterhalten ⁵⁸.

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie das Methylierungsmuster in Tumorzellen verändert sein kann. Zum einen können in Tumorzellen zuvor methylierte Bereiche demethyliert werden. Dies findet jedoch vor allem in sehr genarmen Regionen der DNA statt. Viel mehr entscheidend für die Tumorgenese scheinen De-novo-Methylierungen von CpG-Inseln zu sein. Kommt es in der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen zu einer Methylierung, führt dies zur Stummschaltung des assoziierten Gens. Die Gene, welche den Zellzyklus kontrollieren und eine gezielte Apoptose auslösen können, werden folglich nicht mehr exprimiert. Somit kann es zu einem ungebremsten Zellwachstum und schließlich Tumorwachstum kommen ⁵⁸⁻⁶⁰.

2.3 Östrogenrezeptor

Der Östrogenrezeptor (ESR) ist ein lipophiler Steroidrezeptor, der zur Gruppe der nukleären Rezeptoren gehört. Wird der Östrogenrezeptor durch seinen Liganden aktiviert, bindet dieser an spezifischen DNA-Abschnitten und induziert die Transkription von Genen. Der Östrogenrezeptor ist somit als ligand-induzierter Transkriptionsfaktor direkt an der Genregulation beteiligt. Insgesamt gibt es zwei Rezeptorsubtypen: Östrogenrezeptor- α bzw. Östrogenrezeptor-1 (ESR1) und Östrogenrezeptor- β bzw. Östrogenrezeptor-2 (ESR2) ^{61,62}.

Der ESR1 wurde 1985 zuerst beschrieben und aus der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 isoliert und kloniert. Der Östrogenrezeptor-1 ist beim Menschen auf dem Chromosom 6q24-27 lokalisiert und besteht aus insgesamt 595 Aminosäuren. Das molekulare Gewicht beträgt 66 kDa. Der ESR2 wurde rund 10 Jahre später entdeckt und erstmals aus Prostatazellen einer Ratte isoliert. Er befindet sich auf Chromosom 14q22-24, besteht aus 530 Aminosäuren und hat ein Gewicht von ungefähr 60-63 kDa ⁶³⁻⁶⁶.

Beide Hormonrezeptoren bestehen aus 6 funktionellen Domänen (A-F). Die A/B-Domäne am N-Terminus hat eine ligandenunabhängige Transkriptionsfunktion. Die C-Domäne enthält den DNA-bindenden Bereich (DBD). In der E/F-Domäne am N-Terminus liegt die Ligandenbindungsstelle und die durch Agonisten aktivierbare Transkriptionsfunktion. Die D-Domäne oder „hinge region“ dient als Verbindungsstück zur DBD ^{62,67,68}.

Obwohl ESR1 und ESR2 auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, weisen sie deutliche Ähnlichkeiten auf. Die DNA-bindende Domäne C zeigt in beiden Rezeptoren eine 97-prozentige Übereinstimmung. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass beide Rezeptoren mit annähernd gleicher Selektivität und Affinität an die Ziel-DNA-Sequenz binden. In der ligandenbindenden E-Domäne beträgt die Ähnlichkeit nur 59 %. Da jedoch sowohl ESR1, als auch ESR2 allgemein nur eine geringe Affinität zum Hauptliganden Estradiol haben, sind die Unterschiede im Ligandenbindungsvermögen beider Rezeptoren nur gering ^{67,69}.

ESR1 wird vorwiegend in Geschlechtsorganen wie Brust, Uterus, Ovar, Prostata und Hoden exprimiert. ESR2 entsteht hingegen vor allen Dingen in nichtgonadalem Gewebe wie Kolon, Knochenmark, Lunge und Blase ⁶⁷.

Ungefähr zwei Drittel aller Mammakarzinome exprimieren den Östrogenrezeptor, während dieser bei einem Drittel nicht zu finden ist. Die Patienten, welche Östrogenrezeptor-negativ sind, haben im Allgemeinen schlecht differenzierte Tumore mit einem hohen Proliferationsindex, ein schlechteres Ansprechen auf eine endokrine Therapie und somit oft ein deutlich schlechteres Outcome. Wird der Östrogenrezeptor jedoch exprimiert, ist dies meist mit einem niedrigeren Rezidivrisiko und einem besseren Gesamtüberleben vergesellschaftet ^{70,71}.

Beim metastasierten Mammakarzinom spielt vor allem die endokrine Resistenz eine große Rolle. Hiervon sind Patientinnen betroffen, welche unter antiöstrogener Therapie einen Progress erleiden oder Patientinnen, die mit initial positivem Östrogenrezeptorstatus in den Metastasen einen Expressionsverlust zeigen. In einer großen Metaanalyse konnte gezeigt werden, dass in über 20 % der initial ESR1-positiven Tumore im Verlauf ein Expressionsverlust in der zugehörigen Metastase stattfindet. Dadurch verringert sich die Überlebensrate ebenso wie das progressionsfreie Überleben ^{72,73}.

Die Methylierung des Östrogenrezeptors wurde umfangreich von Lapidus et al. beschrieben und untersucht. Der Promotor des Östrogenrezeptors besteht aus mehreren Bereichen. Mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) konnten Lapidus et al. den Promotor in sechs Einheiten unterteilen (ER1-ER6). In humanen Brustkrebszelllinien wurde zunächst der Methylierungsstatus erfasst. Die Zelllinien MDA-MB-231 und MDA-MB-435, welche den Östrogenrezeptor nicht exprimieren, zeigten in der MSP eine deutliche Methylierung der CpG-Inseln im Östrogenrezeptor. Die Zelllinie MCF-7 exprimiert den Östrogenrezeptor. In der MSP konnte bei dieser Zelllinie an keinem Loci eine Methylierung nachgewiesen werden. Besonders in den Bereichen ER3, ER4 und ER5 (- 310 bis - 375 bp upstream des Transkriptionsstarts) konnte diese negative Korrelation nachgewiesen werden ^{74,75}.

In gesundem Brustgewebe ist der ESR1-Promotor normalerweise nicht methyliert. Bei Mammakarzinomproben konnte bis dato keine klare Korrelation zur ESR1-Promotormethylierung gezeigt werden. Mehrere Studien zeigen jedoch Hinweise darauf, dass in Brustkrebsproben eine erhöhte Anzahl an Methylierungen nachzuweisen ist ⁷⁶⁻⁷⁸.

In einer Studie von Müller et al. wurde der Methylierungsstatus im Serum von Mammakarzinom-Patientinnen untersucht. Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Methylierung des ESR1 mit einer schlechteren Prognose der Patientinnen korrelierte ⁷⁹. Dieselbe Forschungsgruppe konnte in einer späteren Studie an Tumorgewebe zeigen, dass ein methylierter ESR1 ein Prädiktor für das fehlende Ansprechen auf eine Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen ist. Hierbei scheint er in der Aussagekraft sogar den

Hormonrezeptorstatus zu übertreffen. Somit könnte der Methylierungsstatus des Östrogenrezeptors ein hilfreicher Parameter zur Vorhersage auf das Ansprechen einer endokrinen Therapie sein ⁸⁰. Auch andere Studien konnten den prognostischen Stellenwert der ESR1-Methylierung im Mammakarzinom und metastasiertem Mammakarzinom bestätigen ^{81,82}.

2.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Methylierung des ESR1-Promotors im Primärtumor und der korrespondierenden Metastase bei Mammakarzinom-Patientinnen gibt. Es soll geklärt werden, ob der Nachweis einer Promotormethylierung mittels der methylierungsspezifischen real-time PCR ein prädiktiver Marker für den Verlauf der Erkrankung ist. Des Weiteren soll herausgefunden werden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus beim metastasierten Mammakarzinom und dem Überleben der Patientinnen gibt.

Bis heute gibt es keine Studie, die die ESR1-Promotormethylierung vom Primärtumor mit der korrespondierenden Metastase vergleicht und diese mit dem klinischen Outcome der Patientinnen korreliert. Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom kann keine kurative Therapie angeboten werden. Auch das Gesamtüberleben dieser Patientinnen ist verglichen mit nicht-metastasierten Brustkrebspatientinnen deutlich reduziert. Genaue Marker, die Prognose und Verlauf der Erkrankung vorhersagen können, gibt es jedoch nicht. Deshalb soll in dieser Arbeit herausgestellt werden, inwieweit die Methylierung des Östrogenrezeptors diese Aussagen liefern kann und ob eine Verbindung zum Überleben der Patientinnen besteht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Patientenkollektiv

Über das Tumordokumentationssystem der Universitätsfrauenklinik wurden Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom identifiziert. Anschließend wurde ein Abgleich mit der Datenbank des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Köln durchgeführt. Das untersuchte Gewebe wurde von der CIO Biobank der Universitätsklinik Köln zur Verfügung gestellt und in Übereinstimmung mit den Regularien der CIO Biobank verwendet. Die Patientendaten wurden anonymisiert und dem Votum der Ethikkommission der Universität zu Köln entsprechend genutzt.

Es wurde darauf geachtet, dass sowohl Tumormaterial des Primarius und der Metastase entnommen wurde und im Institut für Pathologie untersucht und archiviert wurde. Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Probenblöcke wurden mit den korrespondierenden Schnittpräparaten mit Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) und immunhistochemischer Östrogenrezeptorfärbung gepaart.

3.1.2. Makrodissektion

- 10 Schnitte à 10 µm der FFPE-Tumorblöcke
- Einmalskalpell Nr.11, Feather, Saki, Japan

3.1.3. DNA-Extraktion

- Maxwell® 16 FFPE Plus Tissue LEV DNA Purification Kit AS1135, Promega, Madison, USA
- Maxwell® LEV Catridge
- Elution Tubes, 0,5 ml
- RNase-freies Wasser
- Lysis Buffer
- Incubation Buffer
- Proteinase K (aus 500 µl Nuklease-freiem Wasser pro lyophilierter Proteinase K Probe = 20mg/dl)

3.1.4. Bisulfit-Konversion

- EpiTect® Bisulfite Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland
- Bisulfit-Mix
- DNA Protection Buffer

RNase-freies Wasser
Epitect spin columns
Collection Tubes
Buffer BW (30ml Ethanol hinzugefügt)
Buffer BD (27ml Ethanol hinzugefügt)
Buffer EB
Buffer BL
Carrier RNA (310 µl RNase-freies Wasser pro 310 µl Carrier RNA = 1µg/µl)
Carrier RNA + Buffer BL

3.1.5. Real-time PCR

- GoTaq® pPCR Master Mix, Promega, Mannheim, Deutschland
- RNase freies Wasser
- Primer forward, Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
- Primer reverse, Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
- Sonde, Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
- Hard-Shell® 96-Well PCR Plate, BioRad, München, Deutschland
- Adhesive PCR Plate Seal, Thermo Scientific, Waltham, USA

3.1.6. Geräte

- BioRad CFX96 Real-time PCR Cycler, Bio-Rad, München, Deutschland
- NanoDrop™ 1000 Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
- Biometra T3000 Thermocycler, LapRepCo, Horsham, USA
- Promega Maxwell® 16, Promega, Mannheim, Deutschland
- Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Spectrafuge Mini Centrifuge, Harvard Apparatus, Cambridge, UK
- Vortex Genie 2, Biovendis, Mannheim, Deutschland

3.1.7. Für alle Versuchsteile

- Ethanol (96-100 %), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Pipettenspitzen, Biozym, Oldendorf, Deutschland
- Eppendorf Safe-Lock tubes 0,5ml, 1,5ml und 2ml, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Resarch® Plus Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1. Makrodissektion

Als Material für die experimentelle Untersuchung werden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Tumorproben verwendet. Diese Paraffinblöcke sind zunächst makroskopisch zu betrachten, um sicher zu gehen, dass genügend Gewebe für die weiteren Untersuchungen vorhanden ist. Anschließend werden zusammen mit dem Pathologen die zugehörigen HE- und ER-Schnitte mikroskopiert. Es folgt die Detektion und Markierung solider Tumorareale unter dem Mikroskop. Zusätzlich wird festgelegt, wie viele Schnitte für die DNA-Isolation notwendig sind. Die Anzahl kann zwischen einem und sechs Schnitten liegen. Ist der Tumorbereich sehr klein oder imponiert zu inhomogen, wird das Präparat von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Von den Paraffinblöcken werden jeweils zehn Schnitte à 10 µm angefertigt, welche auf einen Objektträger aufgebracht werden. Die Schnitte sind weder zu färben, noch mit einem Deckglas zu versehen. Zusätzlich ist es erforderlich, zu jedem Präparat jeweils einen Schnitt in HE- und ER-Färbung anzufertigen. Die gefärbten Schnitte werden dann erneut unter dem Mikroskop betrachtet um sicher zu gehen, dass es keine Veränderungen in tiefer im Paraffinblock liegenden Tumorbereichen gibt.

Für die Makrodissektion wird nun ein ungefärbter Schnitt auf den passenden HE-Schnitt mit markiertem Tumorbereich gelegt. Die Präparate sind dabei deckungsgleich auszurichten. Nun wird mit dem Skalpell der identifizierte Tumorbereich, wie in Abbildung 4 markiert, vom Objektträger entfernt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis die benötigte Anzahl an Schnitten für die DNA-Extraktion vorliegt.

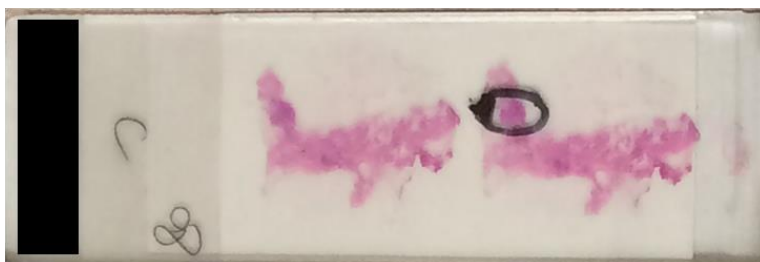


Abbildung 4: HE-Präparat mit Markierung

HE-gefärbtes Mamma-Gewebe mit schwarz eingekreistem Tumorbereich

3.2.2. DNA-Isolation

Um eine genetische Untersuchung durchführen zu können, ist die DNA aus den fixierten Präparaten zu extrahieren. Dies wird mit dem Kit der Firma Promega (Maxwell® 16 FFPE Plus Tissue LEV DNA Purification Kit AS1135) laut Herstellerangaben durchgeführt. Das verwendete Kit erlaubt die Entparaffinisierung und DNA-Isolierung in einem Arbeitsschritt.

Das in der Makrodissektion in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführte Probenmaterial wird mit 180 µl des Inkubationspuffers und 20 µl der Proteinase-K-Lösung überschichtet. Hierbei ist darauf zu achten, dass das Probenmaterial komplett mit der Inkubationslösung bedeckt ist. Anschließend findet über Nacht die Inkubation des Reaktionsansatzes in einem Thermomixer bei 70 °C und 300 rpm statt.

Am nächsten Tag wird der Ansatz kurz gevortext und anzentrifugiert. Dann werden 400 µl des Lyse-Puffers zum Ansatz hinzugefügt, der anschließend erneut kurz gevortext und zentrifugiert wird.

Für die nun folgende Extraktion wird das Probenrack des Maxwell® 16 Research Instrument mit der dafür vorgesehenen Kartusche bestückt. Der Reaktionsansatz wird in die erste Kammer der Kartusche transferiert. Dabei ist darauf zu achten, dass im Probengefäß vorhandene Paraffinreste nicht mit überführt werden. Anschließend sind die Elutionsgefäße und der Stößel an die dafür vorgesehene Position im Probenrack zu setzen und mit jeweils 50 µl Nuklease-freiem Wasser zu befüllen. Im Gerätemenü wird das Programm „DNA, FFPE/Zellen“ gewählt und gestartet. Nach Beendigung des Programms werden die Elutionsgefäße aus dem Probenrack genommen und verschlossen.

Die Konzentration jeder eluierten Probe wird anschließend photometrisch mit dem Nano-Drop® bestimmt. Anschließend werden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.2.3. Bisulfit-Konversion

Um den Methylierungsstatus einer DNA-Sequenz bestimmen zu können, bedarf es einer vorherigen Bisulfit-Konversion. Bei der Behandlung von DNA mit Natriumbisulfit kommt es zu einer Konversion des nicht-methylierten Cytosins in Uracil. Methylierte Cytosine werden hingegen nicht verändert. Dadurch ist es möglich, methylierte von unmethylierten DNA-Sequenzen in einer methylierungsspezifischen PCR zu unterscheiden.

Für die Bisulfit-Konversion ist das EpiTect® Bisulfite Kit der Firma QIAGEN® zu verwenden. Es können 1 ng bis 2 µg DNA und maximal ein Volumen von 20 µl verwendet werden. Um eine maximale Ausbeute zu erzielen, werden von jeder DNA-Probe die maximal möglichen 20 µl verwendet. Der Bisulfit-Reaktionsansatz wird in 200 µl PCR-Gefäße nach dem Protokoll in Tabelle 5 vorbereitet.

Der Reaktionsansatz wird anschließend kurz gevortext und zentrifugiert. Durch einen Farbumschlag des DNA Protection Buffers von grün zu blau wird sichergestellt, dass der Ansatz ausreichend durchmischt ist und den richtigen pH-Wert hat.

Anschließend wird der Reaktionsansatz im Thermocycler durch die in Tabelle 6 dargestellten Temperaturzyklen geführt.

Die konvertierte DNA kann bei 20 °C über Nacht im Thermocycler belassen werden.

Der Reaktionsansatz wird nun nach abgeschlossener Bisulfit-Konversion zentrifugiert und in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wird der Ansatz mit je 310 µl Lysepuffer (Buffer BL) und darin gelöster Träger-RNA bedeckt. In Tabelle 7 ist die Zusammensetzung des Lysepuffers und der Träger-RNA in Abhängigkeit der Probenanzahl dargestellt. Die Lösung wird durch kurzes Vortexen und Zentrifugieren gemischt. Nach Hinzugabe von 250 µl Ethanol zu jeder Probe wird die Lösung für 15 Sekunden pulsationsartig gevortext und anschließend zentrifugiert, um mögliche Flüssigkeitstropfen aus dem Deckel der Tubes zu entfernen.

Der neu entstandene Reaktionsansatz (700 µl) wird in die „EpiTect spin columns“ (im Folgenden Zentrifugations-Säulen) überführt, welche in die dafür vorgesehenen Sammelgefäße gesetzt werden. Der Reaktionsansatz wird bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute zentrifugiert. Die durch die Membran geflossene Flüssigkeit, die sich nun in den Sammelgefäßen befindet, wird verworfen. Anschließend werden 500 µl Waschpuffer (Buffer BW) in die Säulen gegeben und bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen. Nach Hinzugabe von 500 µl Dilutionspuffer (Buffer BD) in die Zentrifugations-Säulen wird der Ansatz bei Raumtemperatur 15 Minuten inkubiert. Nun wird wieder für eine Minute zentrifugiert und die durchgeflossene Flüssigkeit entfernt. Der Waschvorgang mit 500 µl des Waschpuffers wird nun zweimal wiederholt. Die Säulen werden anschließend in neue Sammelgefäße gesetzt und erneut für eine Minute zentrifugiert, um mögliche Flüssigkeitsrückstände zu entfernen. Mit geöffnetem Deckel erfolgt eine Inkubation in einem Heizblock bei 56 °C für fünf Minuten. Somit verdampft auch die letzte restliche Flüssigkeit.

Die Säulen werden in neue 1,5 ml Gefäße gesetzt und mit 20 µl Elutionspuffer (Buffer EB) befüllt. Die gereinigte DNA wird durch Zentrifugieren bei 12.000 rpm für eine Minute eluiert. Das nun entstandene Eluat kann bei -20 °C für mindestens drei Jahre gelagert werden.

Tabelle 5: Bisulfit-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen pro Reaktionsansatz (µl)
DNA-Probe	20
Bisulfit-Mix	85
DNA Protection Buffer	35
Totales Volumen	140

Tabelle 6: Thermocycler Einstellungen

Schritte	Zeit (min)	Temperatur (°C)
Denaturierung	5	95
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	175	60

Tabelle 7: Zusammensetzung Buffer BL und Träger-RNA

Anzahl Proben	1	4	8	16	24	48
Buffer BL	620 µl	2,5 ml	5 ml	10 ml	15 ml	31 ml
Träger-RNA	6,2 µl	25 µl	50 µl	100 µl	150 µl	310 µl

3.2.4. Methylierungsspezifische real-time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein enzymabhängiges, molekularbiologisches Verfahren, welches gegen Ende der 1980er-Jahre entwickelt wurde. Ziel der PCR ist es, einen ausgewählten Bereich einer DNA-Sequenz zu vervielfältigen. Durch Replikation in mehreren sich wiederholenden Zyklen wird eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht. Um das amplifizierte Produkt einer konventionellen PCR sichtbar zu machen, muss am Ende eine Gelelektrophorese durchgeführt werden. Es ist somit also nur eine Endpunktanalyse der Amplifikation möglich⁸³.

Dem entgegen steht die real-time PCR, mit der die Vervielfältigung der DNA-Sequenz noch während der Amplifikation detektiert werden kann. Somit ist neben der Qualifizierung auch eine Quantifizierung der gewonnenen DNA möglich. Wie bei der konventionellen PCR werden für die real-time PCR neben der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz (template) zwei gegenläufige synthetische Oligonukleotide (Primer), eine hitzestabile Polymerase mit DNA-5'-

3'-Exonuklease-Aktivität (Taq-Polymerase) und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Mg^{2+} -Ionen und eine Pufferlösung benötigt. Zusätzlich ist eine Sonde für die real-time PCR essentiell ⁸⁴.

Bei der real-time PCR wird die Quantifizierung durch eine Fluoreszenz-Messung erreicht, die kontinuierlich während der PCR läuft. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der amplifizierten DNA zu ⁸⁵.

Die PCR lässt sich grob in zwei Phasen einteilen: eine exponentielle Phase, welcher eine nicht-exponentielle Plateau-Phase folgt. Die DNA-Menge verdoppelt sich in jedem Zyklus, bis alle Reaktionskomponenten verbraucht sind, die Amplifikationskurve abflacht und in die nichtexponentielle Phase übergeht. Während der exponentiellen Phase nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge der amplifizierten DNA zu, sodass Rückschlüsse auf die DNA-Menge gezogen werden können. Zu Beginn der real-time PCR ist diese Fluoreszenz jedoch noch nicht ausreichend stark, um detektiert zu werden. Erst ab einer bestimmten Anzahl an Zyklen kann der Cycler eine Fluoreszenz detektieren. Der Amplifikationszyklus, bei welchem dies passiert wird Threshold Cycle oder C_T -Wert genannt. Je geringer die eingesetzte DNA-Menge ist, desto höher ist der zugehörige C_T -Wert. Dieser Zusammenhang lässt sich für die Quantifizierung der PCR nutzen. In Abbildung 5 ist der Amplifikationsverlauf einer real-time PCR graphisch dargestellt ⁸⁵.

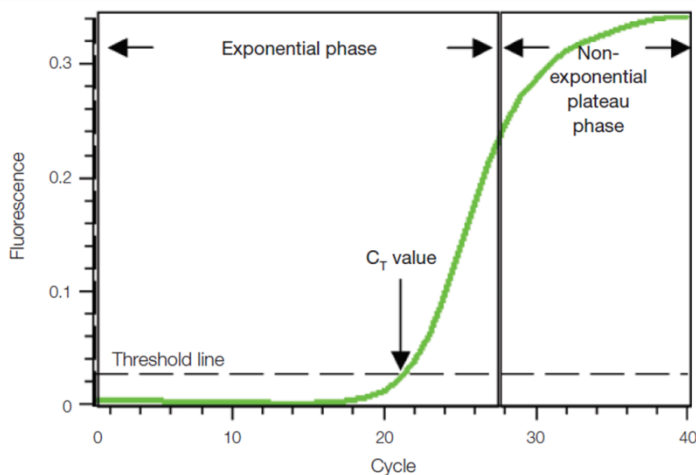


Abbildung 5: Amplifikationsverlauf

Typischer Verlauf einer real-time PCR. Auf der x-Achse sind die Anzahl der Zyklen angegeben; auf der y-Achse die Fluoreszenz. Die exponentielle Phase geht vom Zyklus 1 bis 28. Der C_T -Wert wird im 21. Zyklus erreicht. Nach dem 28. Zyklus geht die Kurve in die nicht-exponentielle Phase über ⁸⁶.

3.2.5. TaqMan Assay

Für die methylierungsspezifische PCR verwendet man ein TaqMan Assay. Hierdurch kann eine spezielle Zielsequenz detektiert werden. Die PCR wird somit nicht durch unspezifische Reaktionen beeinflusst. Die Zielsequenz für diese Versuchsreihe ist der Östrogenrezeptor 1. Das TaqMan Assay verwendet ein sequenzspezifisches, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (Sonde), sowie einen sequenzspezifischen Primer. Das Oligonukleotid ist am 5'-Ende mit einem Reporter mit Fluoreszenzfarbstoff (in diesem Fall FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (hier TAMRA) ausgestattet. Durch die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter wird die Fluoreszenz bei intakter Sonde durch den Quencher unterdrückt. Während der PCR lagert sich die Sonde an die Zielsequenz des Matrizenstrangs an. In der nachfolgenden Extensionsphase wird die Sonde durch die Taq-Polymerase verdrängt. Die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase sorgt dafür, dass der Quencher vom Reporter getrennt wird. Durch die Trennung wird die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr unterdrückt. Das Fluoreszenzsignal kann nun detektiert werden. Abbildung 6 veranschaulicht diesen Vorgang noch einmal bildlich ⁸⁶.

Der Reaktionsansatz für die MSP ist in Tabelle 8 dargestellt. Das Reaktionsvolumen beträgt 20 µl. Die Primersequenzen für die PCR lauten wie folgt:

Primer Forward: 5'-GGCGTTCGTTTTGGGATTG-3'

Primer Reverse: 5'-GCCGACACGCGAACTCTAA-3'

Sonde: FAM-5'-CGATAAAACCGAACGACCCGACGA-3'-TAMRA

Die methylierungsspezifische real-time PCR wird bei unseren Versuchen nach dem in Abbildung 7 aufgeführten thermischen Protokoll durchgeführt. Es erfolgt eine initiale Denaturierung bei 95 °C für 2 Minuten, gefolgt von 50 Zyklen zu je 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C.

Die Patientenproben werden in der PCR immer in Tripletts eingesetzt. Zusätzlich werden auf jeder PCR-Plate eine Positiv- und Negativkontrolle, sowie Nuklease-freies Wasser mitsequenziert. Als Positivkontrolle dient die bisulfitbehandelte DNA der MD-MBA-231-Zelllinie. Diese hat einen methylierten ESR1-Promotor. Als Negativkontrolle wird die bisulfitbehandelte DNA der MCF7-Zelllinie (nicht methylierter ESR1-Promotor) verwendet. MD-MBA-231 und MCF7 sind Mammakarzinom-Zelllinien. Um ungewollte Verunreinigungen durch fremde DNA auszuschließen, wird zusätzlich Nuklease-freies Wasser anstatt DNA in der MSP eingesetzt. Die PCR dieser Proben sollte stets negativ ausfallen.

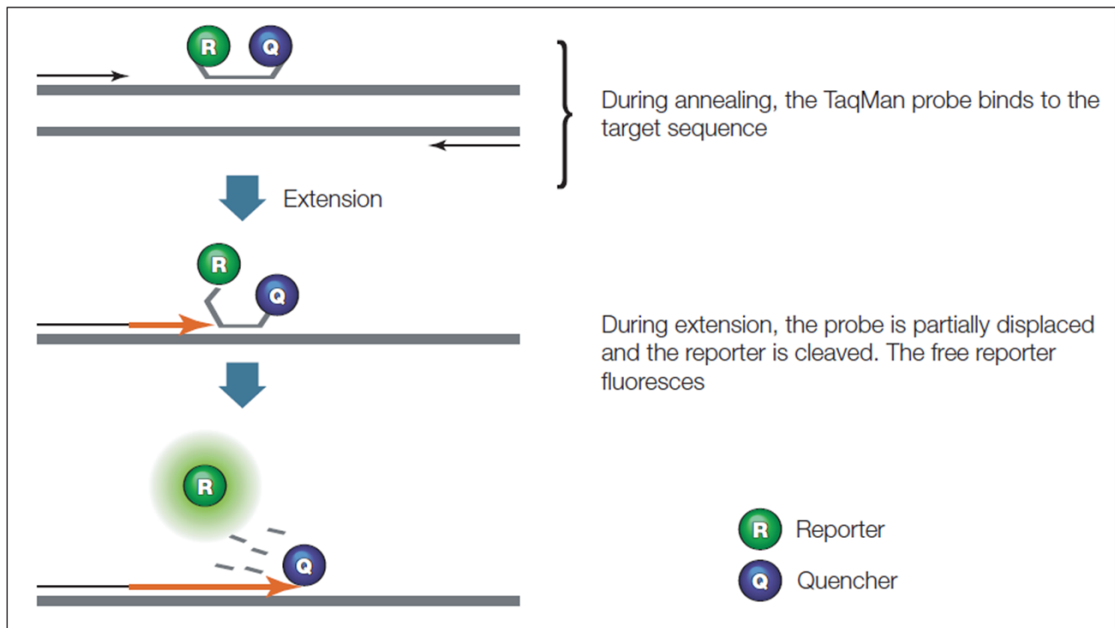


Abbildung 6: TaqMan Assay

Die TaqMan-Sonde wird in der Extensionsphase teilweise verdrängt, sodass der Reporter frei wird und fluoresziert

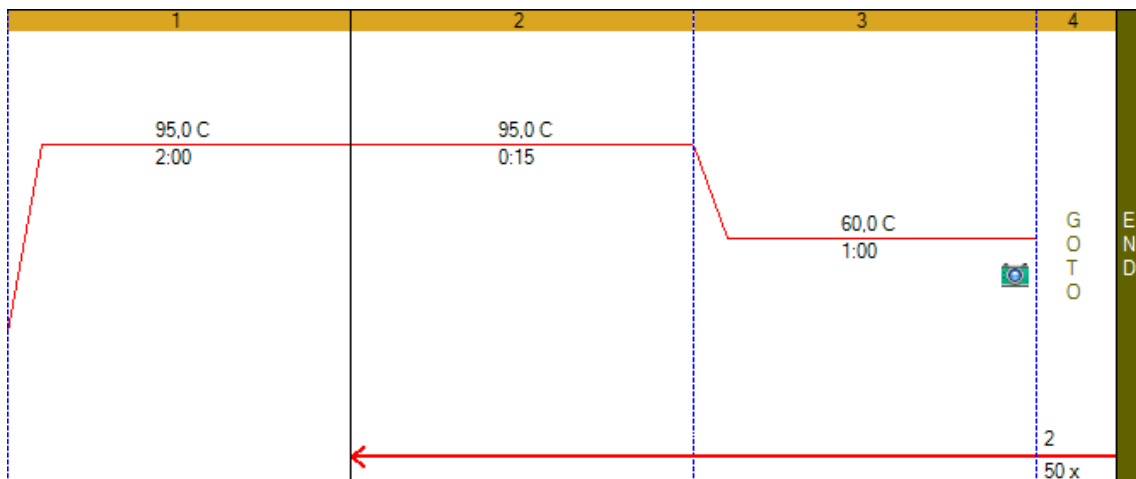


Abbildung 7: Temperaturprotokoll der MSP

Tabelle 8: PCR-Ansatz

PCR-Ansatz Pro Probe	
Master Mix (µl)	8
Primer Forward (µl)	0,6
Primer Reverse (µl)	0,6
Sonde (µl)	0,8
H ₂ O (µl)	4
DNA (µl)	6
Summe (µl)	20

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Arbeit vorgestellt. Der Methylierungsstatus des ESR1-Promotors beim metastasierten Mammakarzinom wurde in unserer Studie mittels PCR erfasst. Die methylierungsspezifische PCR wurde dann als positiv gewertet, wenn der C_T-Wert spätestens im 39. Zyklus erreicht wurde und die Kurve einen typischen Verlauf aufzeigte (siehe Abbildung 5). Amplifikationen nach dem 39. Zyklus wurden als unspezifisch gewertet. Eine PCR wird im Folgenden „positiv“ genannt, wenn eine Methylierung des ESR1-Promotors vorliegt. Eine „negative“ PCR zeigt im Gegenzug keine Promotormethylierung auf.

Bei den untersuchten Tumorproben wurde der Östrogenrezeptorstatus immunhistochemisch bestimmt. Zur Quantifizierung wurde der Immune Reactiv Score (IRS) als Bewertungsskala verwendet. Der Östrogenrezeptorstatus wurde als positiv gewertet, wenn der IRS ≥ 2 war. Bei einem IRS < 2 wurde der Östrogenrezeptor als negativ eingestuft.

Alle folgenden Ergebnisse wurden nach den oben genannten Kriterien ausgewertet.

4.1 Vorversuche

4.1.1. Kontrollgruppe

Wie im Einleitungsteil beschrieben führt eine Promotormethylierung mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Expressionsverlust des entsprechenden Gens. Bezogen auf unsere Studie würde dies bedeuten, dass die Proben mit einer positiven PCR (methylierter ESR1-Promotor) keine immunhistochemische Ausprägung des Östrogenrezeptors aufweisen. Bevor das eigentliche Studienkollektiv untersucht wurde, wurde zunächst überprüft, ob sich die MSP grundsätzlich zum Nachweis einer Methylierung des ESR1-Promotors beim Mammakarzinom eignet. Hierzu wurde eine Kontrollgruppe gebildet, die aus sechs Patientinnen mit einem nicht-metastasierten Mammakarzinom bestand. Die Tumore waren mäßig bis gut differenziert (G1-2). Das TNM-Stadium lag bei pT1b-c N0 und M0. Die Proben wurden genau wie die des Studienkollektivs aufbereitet und untersucht.

Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der methylierungsspezifischen PCR der Kontrollgruppe zusammen. Eine Patientin zeigte bei negativem Östrogenrezeptorstatus auch eine Methylierung des ESR1. Demgegenüber war bei einer anderen Patientin mit positivem Östrogenrezeptorstatus keine Methylierung des ESR1 zu verzeichnen. Die restlichen vier Patientinnen wiesen sowohl einen positiven Östrogenrezeptorstatus als auch eine positive PCR auf. In Abbildung 8 sind die Amplifikationskurven der Kontrollgruppen-Proben dargestellt. Zur Vereinfachung eine PCR-Kurve pro Patienten aufgezeigt.

Tabelle 9: Verteilung in der Kontrollgruppe

Anzahl	ER-Status	ESR1-Methylierung
4	positiv	positiv
1	positiv	negativ
1	negativ	positiv

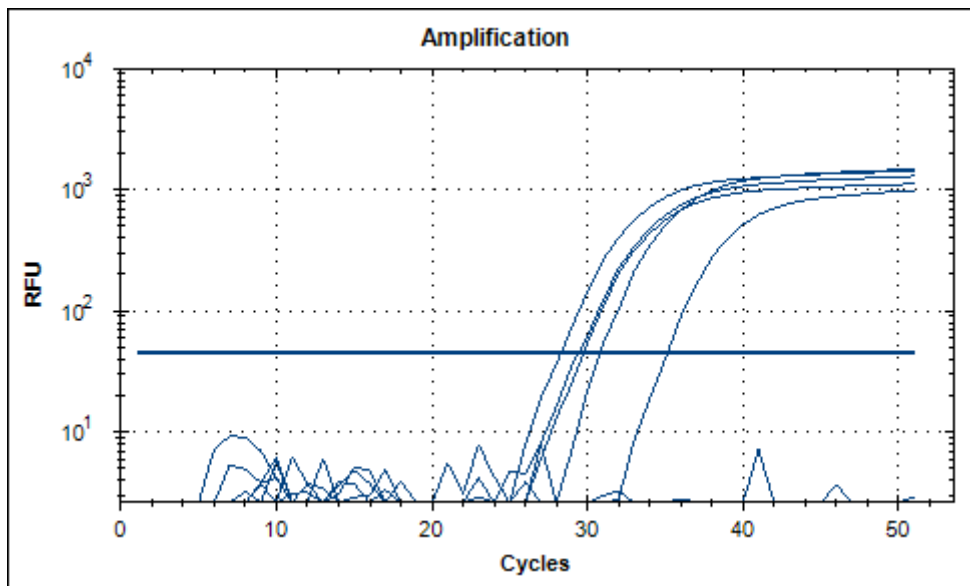


Abbildung 8: PCR der Kontrollgruppe

Bei fünf der Proben der Kontrollpatienten zeigte sich eine Amplifikation in der MSP. Eine Probe zeigte keine Amplifikation. Die PCR wurde in Triplets durchgeführt. Zur Veranschaulichung wurde in der Abbildung nur eine Kurve pro Patienten dargestellt.

4.1.2. Validierung der Methodik

Für die MSP wurde die DNA wie im Methodenteil beschrieben gezielt aus den Tumorealen genommen. In diesen Bereichen befinden sich auch Stromazellen, Gefäße und lymphozytäre Infiltrate. Zusätzlich erscheinen bei einigen Tumoren die Tumoreale bei starker Vergrößerung inhomogen bezüglich der Östrogenrezeptorausprägung (siehe Abbildung 9).

Um auszuschließen, dass andere Zelltypen oder gemischt ER-positive und ER-negative Tumorbereiche die MSP beeinflussen, wurden aus den 50 Patientenproben sieben Präparate ausgewählt, die folgende Eigenschaften erfüllten:

1. möglichst homogener Tumorbereich in der ER-Färbung,
2. scharf abgegrenztes Tumoreal
3. ausreichend großer Bereich für eine MSP
4. wenn vorhanden ein zweiter Tumorbereich mit gemischter ER-Ausprägung

Es wurden 5 µm dicke Schnitte gefertigt, in denen der Östrogenrezeptor nach Routineverfahren gefärbt wurde. Anschließend wurde unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung das Präparat betrachtet und mit einem Skalpell die Tumorinsel abgekratzt. Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen das genaue Vorgehen exemplarisch an einem ER-positiven und einem ER-negativen Fall.

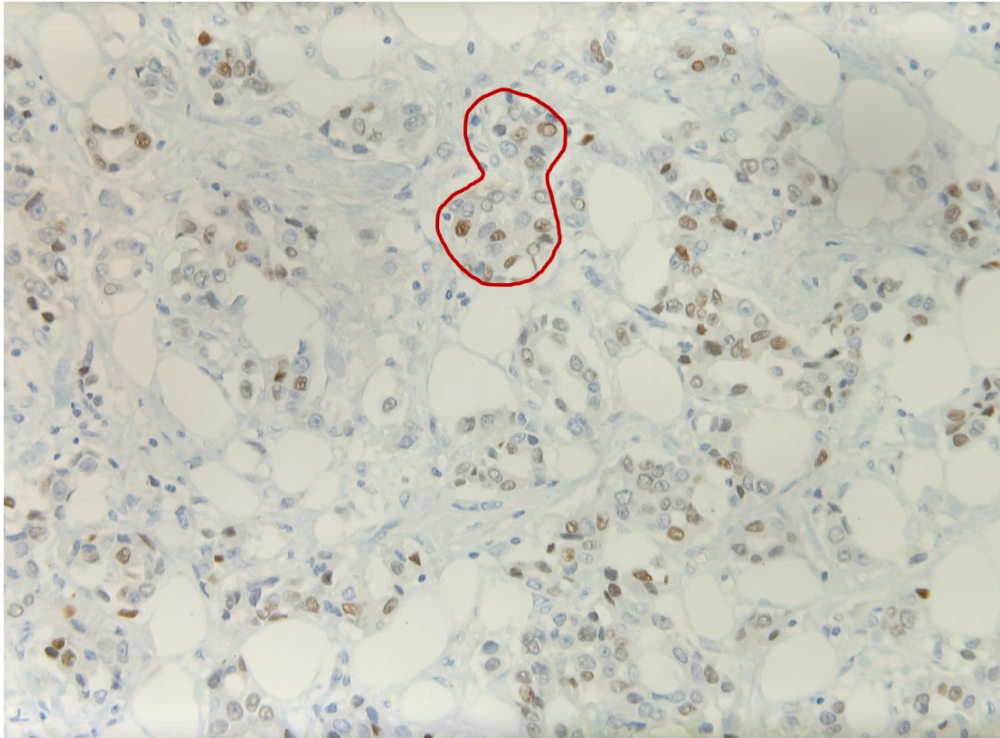


Abbildung 9: Mamma-Ca 200-fache Vergrößerung

In dem rot markierten Bereich liegen ER-positive Zellen direkt neben ER-negativen Zellen

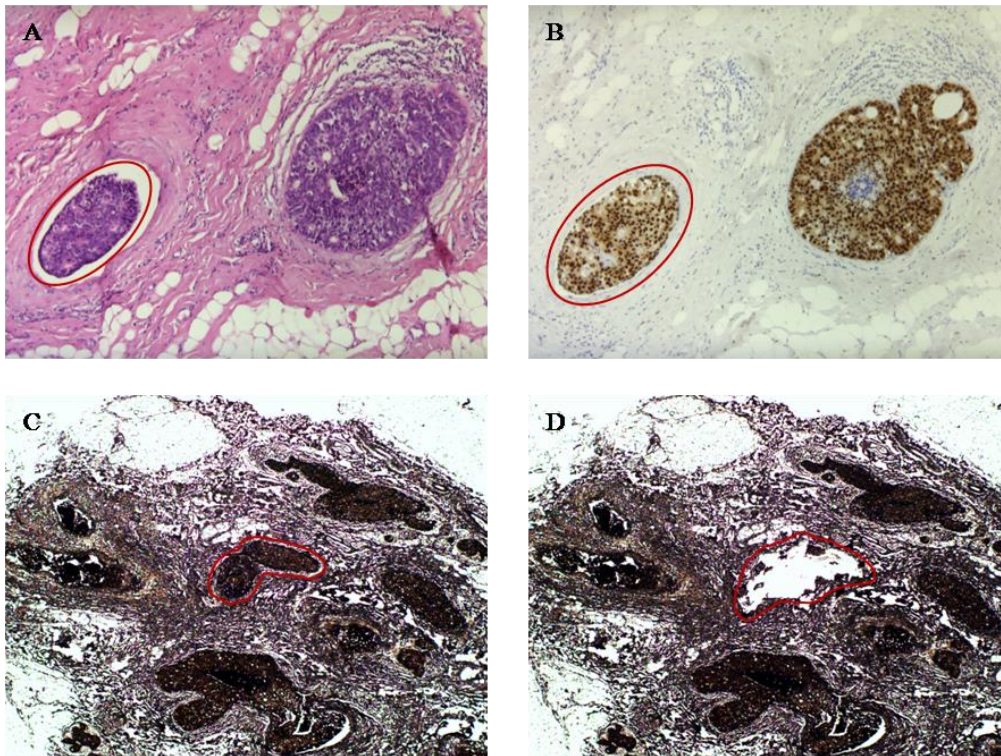


Abbildung 10: ER-positive Probe

Exemplarische Darstellung einer ER-positiven Patientenprobe. Die homogenen Tumorinseln lassen sich in 100-facher Vergrößerung sowohl in der HE-Färbung (A) als auch in der ER-Färbung (B) gut erkennen. (C) zeigt das ungefärbte Präparat vor der Makrodissektion in 40-facher Vergrößerung. (D) zeigt das Präparat nach der Makrodissektion in 40-facher Vergrößerung. Die Tumorinsel wurde mit dem Skalpell sorgfältig entfernt und für die weitere Analyse verwendet.

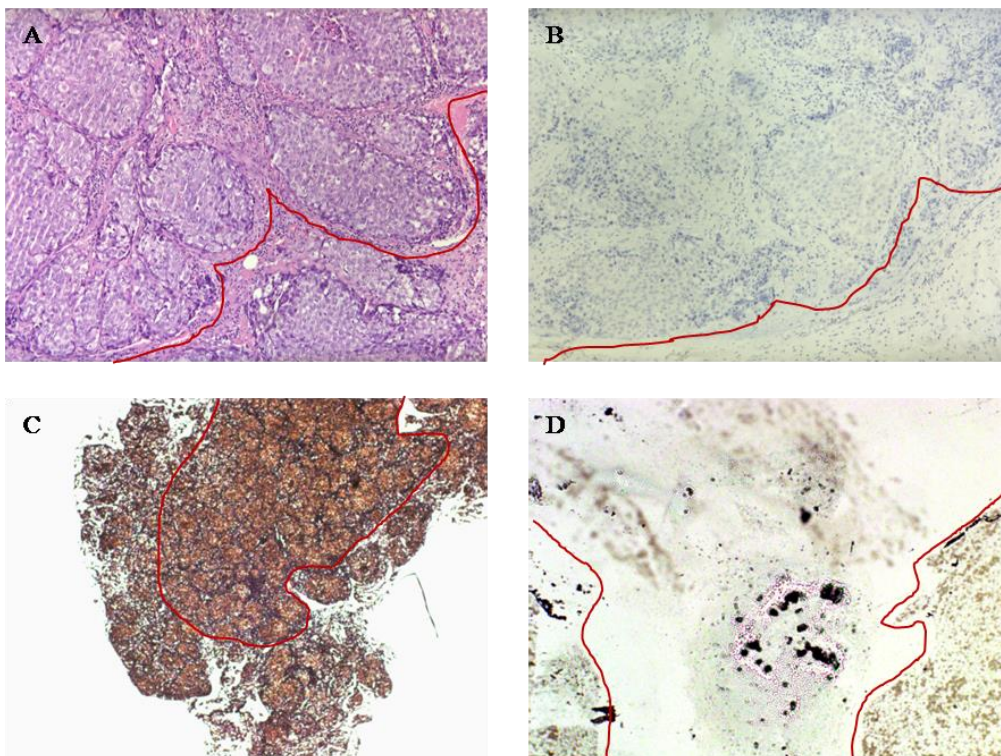


Abbildung 11: ER-negative Probe

Die Abbildung zeigt die Probe einer Patientin mit negativem ER-Status. (A) und (B) stellen die Tumorinsel in HE- bzw. ER-Färbung in 100-facher Vergrößerung dar. (C) zeigt das Präparat vor Makrodissektion in 40-facher Vergrößerung. In (D) wurde das Tumorareal entfernt (100-fache Vergrößerung).

Die DNA der makrodissektierten Tumorareale wurde wie beschrieben bearbeitet. Anschließend wurde eine MSP durchgeführt.

Um die MSP vergleichen zu können, wurden drei Versuchsreihen durchgeführt:

1. Der Tumorbereich wurde mit Stroma und lymphozytären Zellen analysiert (Tripletts)
2. Die Tumorzellen wurden makrodissektiert und 1 µl in die PCR eingesetzt (Tripletts)
3. Die Tumorzellen wurden makrodissektiert und 5 µl in die PCR eingesetzt (Duplett)

Tabelle 10 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse. Durch die Makrodissektion konnte deutlich weniger DNA gewonnen werden, da nur ein kleiner Tumorbereich und somit eine geringere DNA-Konzentration verwendet wurde. Durch die geringere DNA-Menge kam es erwartungsgemäß zu höheren C_T-Werten. Die PCR mit 1 µl hat bei allen Patienten C_T-Werte über 39 (entspricht negativer PCR) gezeigt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die DNA-Menge zu gering war. Durch die Erhöhung des eingesetzten Volumens auf 5 µl konnten validere Ergebnisse erzielt werden. Zwar sind die C_T-Werte höher, dennoch lassen sich positive PCR-Ergebnisse erfassen. So zeigen sieben der neun verschiedenen Proben sowohl in der PCR ohne Makrodissektion als auch in der PCR mit 5 µl makrodissektierter DNA gleiche positive bzw. negative Ergebnisse. Bei zwei Proben kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen. Dies lässt sich am ehesten durch eine zu geringe DNA-Menge trotz 5 µl eingesetzter DNA erklären. Es trat kein Fall auf, bei der die PCR aus einer makrodissektierten Probe positiv und aus der dazugehörigen gesamten Probe negativ war. Für die weiteren Versuche wurde unverändert die DNA aus den Tumorarealen genommen.

Tabelle 10: PCR der makrodissektierten Proben

Proben-Nr.	ER-Status	C _T -Wert gesamte Probe	C _T -Wert	C _T -Wert
			1 µl Makrodissektion	5 µl Makrodissektion
1 homogen	positiv	0	0	0
1 gemischt	positiv	0	0	0
2	positiv	0	39,65 ± 0	39,43 ± 0
3	positiv	33,14	0	35,41
4	negativ	35,70	0	35,97
5	negativ	33,27	0	39,08 (grenzwertig)
6 homogen	negativ	27,29	41,84 ± 0	36,83
6 gemischt	negativ	27,29	41,02 ± 0	43,65 ± 0
7	positiv	32,09	0	0

4.1.3. Positiv- und Negativkontrolle

Um Fehler in der Durchführung auszuschließen, wurde bei jedem PCR-Durchlauf eine Positiv- und Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle wurde bisulfithandelte DNA der MD-MBA-231-Zelllinie und als Negativkontrolle bisulfithandelte DNA der MCF7-Zelllinie benutzt. Bei der Negativkontrolle ergab sich in der MSP keine Amplifikation (siehe Abbildung 13). Auch beim nuklease-freien Wasser kam keine Amplifikation zustande, wie in Abbildung 12 dargestellt.

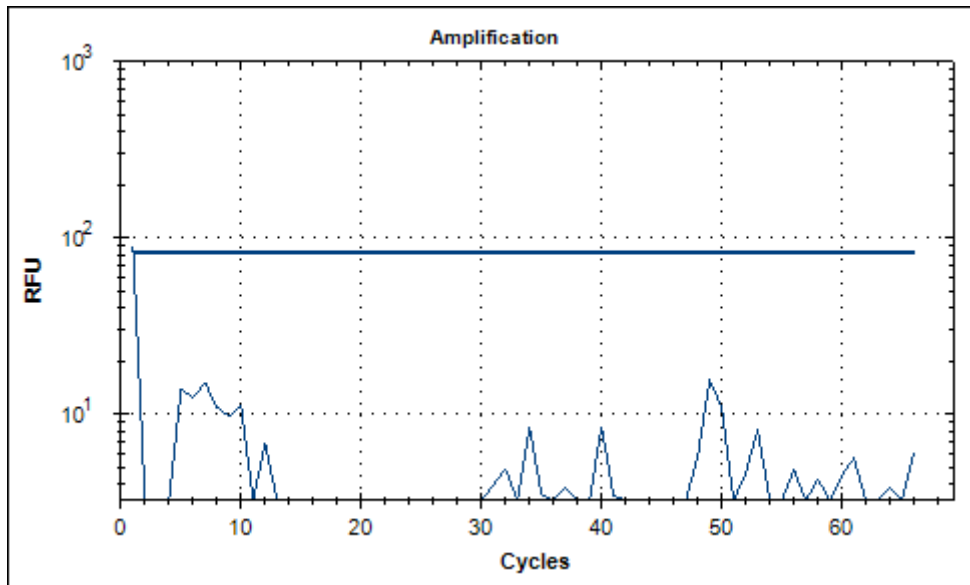


Abbildung 12: PCR mit Nuklease-freiem Wasser
Die PCR-Kurve zeigt wie erwartet keine Amplifikation.

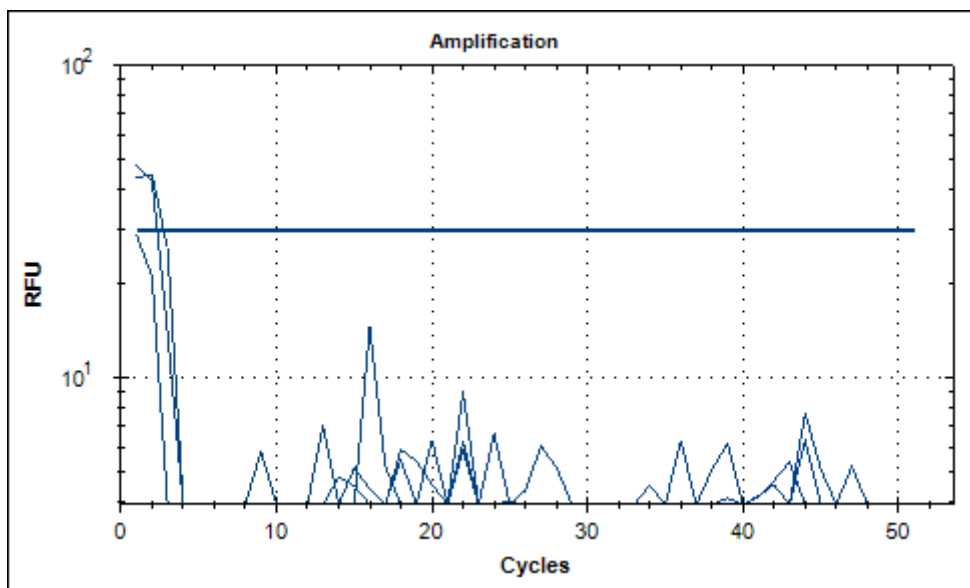


Abbildung 13: Negativkontrolle MCF7
Die PCR der Negativkontrolle zeigt keine Amplifikation. Es ist lediglich ein unspezifisches Hintergrundrauschen zu erkennen.

Mithilfe der Positivkontrolle (MD-MBA-231-Zelllinie) wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, um die Sensitivität zu prüfen. Die graphische Darstellung ist in Abbildung 14 zu sehen. Selbst bei der höchsten Verdünnung von 1:512, was einer DNA-Menge von 0,1953 ng entspricht, konnte eine Promotormethylierung nachgewiesen werden. Mithilfe der PCR der Verdünnungsreihe wurde eine Standardkurve erstellt (siehe Abbildung 15). Sie erlaubt eine Quantifizierung der PCR-Ergebnisse der Patientenproben.

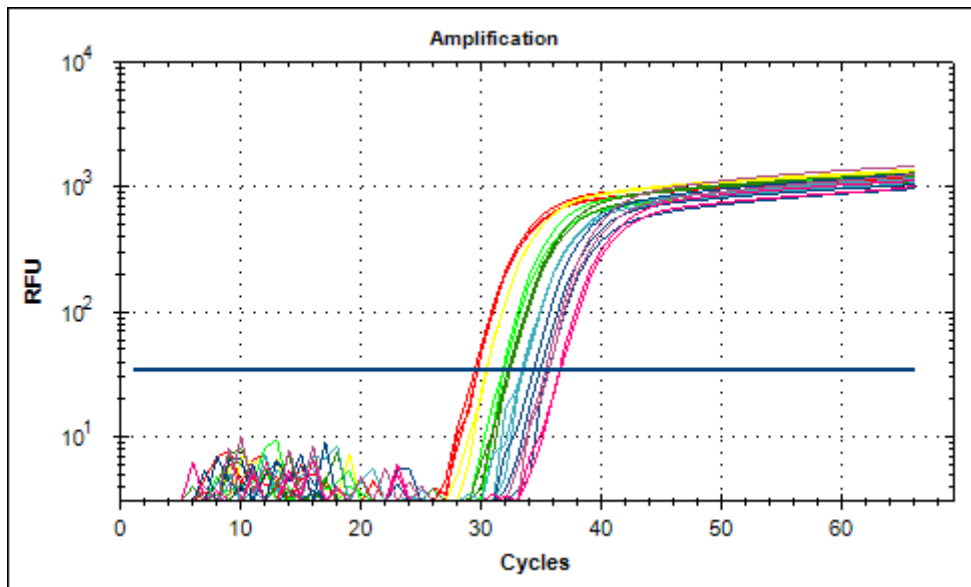


Abbildung 14: Verdünnungsreihe der Positivkontrolle MD-MBA-231

Dargestellt ist die PCR der Positivkontrolle mit Verdünnungen von 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 und 1:512. Die PCR wurde in Triplets durchgeführt. Die linke Kurve (rot) zeigt die 1:4 verdünnte DNA mit einem C_T -Wert von 30. Es wurden hierfür 25 ng DNA eingesetzt. Die rechte Kurve (pink) stellt die 1:512 Verdünnung dar (C_T -Wert bei 36,5) mit einer DNA-Menge von 0,1953 ng.

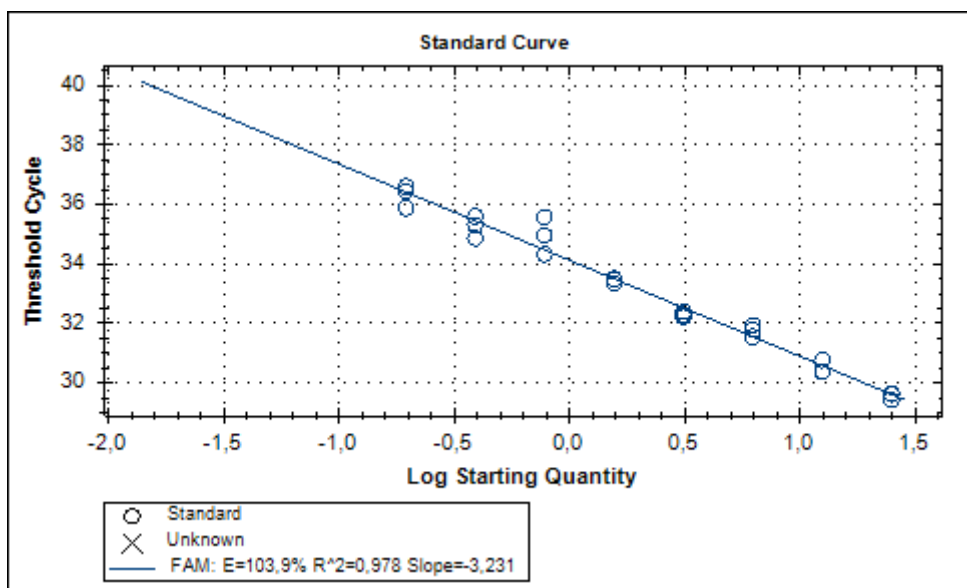


Abbildung 15: Standardkurve MD-MBA-231

Anhand der Verdünnungsreihe der MD-MBA-231-Zelllinie lässt sich eine Standardkurve erstellen. Auf der x-Achse ist die eingesetzte DNA-Menge in logarithmischer Form angegeben. Die y-Achse zeigt den dazugehörigen C_T -Wert. Die Kreise stellen die einzelnen Proben der Verdünnungsreihe dar. Pro DNA-Menge gibt es 3 Kreise, da Triplets verwendet wurden.

4.2 Patientenkollektiv

Mithilfe des Tumordokumentationssystems der Universitätsfrauenklinik wurden 81 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom identifiziert, die sowohl bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms als auch bei der Diagnose der Metastase in der Universitätsfrauenklinik betreut wurden. Bei 29 der 81 Patientinnen standen Gewebeproben des Primarius und der Metastase im Institut für Pathologie zur Verfügung. In der anschließenden makroskopischen Begutachtung zeigte sich, dass die Gewebeproben von 25 Patientinnen für die weitere Analyse geeignet waren. Bei den vier ausgeschlossenen Fällen war zu wenig oder zu schlecht erhaltenes Material vorhanden, um eine epigenetische Analyse durchführen zu können.

Ein Großteil der Patientinnen wurde bereits in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (21 von 25). Nur vier Patientinnen zeigten bei Erstdiagnose keinen Lymphknotenbefall. Bei drei Patientinnen wurde das Mammakarzinom bereits im metastasierten Stadium diagnostiziert. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die vertretenen Tumore bei Erstdiagnose mit UICC-Stadium, TNM-Klassifikation sowie dem Anteil der im Kollektiv vorhandenen Fälle.

Tabelle 11: Übersicht der Tumorstadien bei Erstdiagnose

Stadium (UICC)	T	N	M	Absolute Patientenzahl	Anteil in %
IA	T1	N0	M0	4	16
IB	T0-1	N1mi	M0	0	0
IIA	T0-1	N1	M0	3	12
	T2	N0	M0		
IIB	T2	N1	M0	7	28
	T3	N0	M0		
IIIA	T0-2	N2	M0	3	12
	T3	N1-2	M0		
IIIB	T4	N0-2	M0	2	8
IIIC	T1-4	N3	M0	2	8
IV	T1-4	N0-3	M1	3	12
<i>nicht klassifiziert</i>				<i>1</i>	<i>4</i>

Die verwendeten Gewebeproben der Patientinnen wurden zwischen 2001 und 2014 entnommen und in FFPE-Blöcken archiviert.

Die Patientinnen sind zwischen 1935 und 1974 geboren und waren bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms im Mittel 52,3 Jahre alt. Die jüngste Patientin war bei Diagnosestellung 37 Jahre, die älteste 71 Jahre alt. Im Schnitt trat nach 4,7 Jahren eine Metastase auf, wobei in drei Fällen das Karzinom bereits im metastasierten Stadium diagnostiziert wurde. Die längste Zeitspanne bis zur Metastasierung lag bei 16 Jahren. Von den Patientinnen waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung im April 2017 bereits 19 Patientinnen verstorben. Im Verlauf

wiesen 4 Patientinnen ein Lokalrezidiv auf. Am häufigsten metastasierte das Mammakarzinom in die Leber, dicht gefolgt von Knochen und Lymphknoten. 88 % der Tumore ließen sich histologisch als invasiv duktales Karzinom klassifizieren. Die restlichen 12 % waren invasiv lobulär. Die Altersverteilung und Charakteristika des Patientenkollektivs lassen sich Tabelle 12 und Tabelle 13 entnehmen.

Tabelle 12: Altersverteilung des Patientenkollektivs

	Alter bei Erstdiagnose (in Jahren)	Zeit bis zur Metastasierung (in Jahren)
Mittelwert	52,32	4,68
Anzahl (N)	25	25
Std.-Abweichung	10,069	4,766
Median	54,00	3,00
Standardfehler des Mittelwerts	2,014	0,955
Minimum	37	0
Maximum	71	16

Tabelle 13: Charakteristika des Patientenkollektivs

Merkmal	Subgruppe	Anzahl	Anteil in %
Rezidiv	Lokalrezidiv	4	16
	kein Rezidiv	21	84
Todesfälle	verstorben	19	76
	lebend	6	24
histologischer Subtyp	invasiv duktal	22	88
	invasiv lobulär	3	12
Metastasen	Leber	8	32
	Knochen	5	20
	Lymphknoten	5	20
	Pleura	2	8
	Weichteil/Muskel	3	12
	Kontralaterale	2	8
	Mamma		

4.3 Aufteilung des Primarius und der Metastasen

Von den 25 Primärtumoren hatten 22 einen positiven Östrogenrezeptorstatus. 17 von ihnen zeigten in der MSP eine Methylierung des ESR1. Bei den restlichen drei ER-negativen Primärtumoren wiesen zwei einen methylierten Östrogenrezeptor auf. 16 der 25 Metastasen hatten einen positiven ER-Status, hiervon zeigten 15 eine positive MSP. Die neun ER-negativen Fälle zeigten alle eine Methylierung des ESR1-Promotors. Insgesamt verringerte sich die Anzahl der Tumore mit positivem ER-Status von 22 bei den Primärtumoren auf 16 bei den Metastasen. Die Zahl der methylierten ESR1-Promotoren stieg dagegen von 19 auf 24 an (siehe Tabelle 14 und 15).

Tabelle 14: Aufteilung Primärtumor

	Methylierter ESR1	Unmethylierter ESR1	Summe
Positiver ER-Status	17	5	22
Negativer ER-Status	2	1	3
Summe	19	6	25

Tabelle 15: Aufteilung Metastase

	Methylierter ESR1	Unmethylierter ESR1	Summe
Positiver ER-Status	15	1	16
Negativer ER-Status	9	0	9
Summe	24	1	25

4.4 Wechsel des Methylierungs- und immunhistochemischen Rezeptorstatus

Betrachtet man den Primarius und die korrespondierende Metastase, lassen sich sowohl im Methylierungsstatus als auch im Rezeptorstatus Ausprägungswechsel erkennen.

Ein ER-Statuswechsel von positivem ER des Primärtumors zu einem negativen ER der zugehörigen Metastase findet sich bei sieben der 25 Fälle. Auffallend ist hier, dass bei allen sieben Fällen bereits der ESR1-Promotor des Primarius methyliert war und auch die Metastase eine Amplifikation in der MSP zeigte.

Zwei Patientinnen weisen einen negativen Östrogenrezeptorstatus des Primarius und der Metastase auf. In den dazugehörigen MSP zeigte sich eine Methylierung des ESR1 sowohl beim Primarius als auch bei der korrespondierenden Metastase.

In dem untersuchten Kollektiv findet sich am häufigsten sowohl bei dem Primarius als auch bei der korrespondierenden Metastase ein positiver Östrogenrezeptorstatus (15 Fälle). Zwei Drittel dieser Fälle zeigten auch eine Promotormethylierung des Primarius und der Metastase.

Tabelle 16: Wechsel des ER-Status und der ESR1-Methylierung von Primarius zu Metastase in absoluten Zahlen ($p=0.238$)

		ESR1-Promotor-Methylierungswechsel			Summe
		positiv zu positiv	negativ zu positiv	negativ zu negativ	
ER-Statuswechsel	positiv zu positiv	10	4	1	15
	positiv zu negativ	7	0	0	7
	negativ zu positiv	0	1	0	1
	negativ zu negativ	2	0	0	2
Summe		19	5	1	25

Tabelle 17: ER-Statuswechsel bezogen auf die ESR1-Methylierung des Primarius ($p=0.082$)

		ER-Statuswechsel				Summe
		positiv zu positiv	positiv zu negativ	negativ zu positiv	negativ zu negativ	
Methylierung Primarius	negativ	5	0	1	0	6
positiv	10	7	0	2	19	
Summe		15	7	1	2	25

4.5 Überlebensanalyse

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung waren 19 Patientinnen verstorben und die restlichen sechs lebend. In der Gruppe, in der der Primarius einen methylierten ESR1-Promotor aufwies, waren 16 von 19 Patientinnen verstorben. Bei den Patientinnen mit unmethyliertem ESR-1-Promotor waren drei von sechs verstorben. Das mittlere Überleben ab Metastasierung lag bei Patientinnen mit unmethyliertem ESR1-Promotor des Primärtumors bei 54,3 Monate. Hingegen überlebten die Patientinnen mit methyliertem ESR1-Promotor im Schnitt 38,1 Monaten. Eine statistische Signifikanz liegt nicht vor ($p=0,158$).

In Abbildung 16 ist die Kaplan-Meier-Kurve für das Überleben ab Metastasierung bezogen auf den ESR1-Methylierungsstatus dargestellt.

Auch im Gesamtüberleben zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezogen auf die Methylierung des ESR1-Promotors des Primarius ($p=0,619$). Patientinnen mit methyliertem Promotor des Primarius lebten durchschnittlich 105,3 Monate, Patientinnen mit unmethyliertem Promotor 126,0 Monate (siehe Abbildung 17).

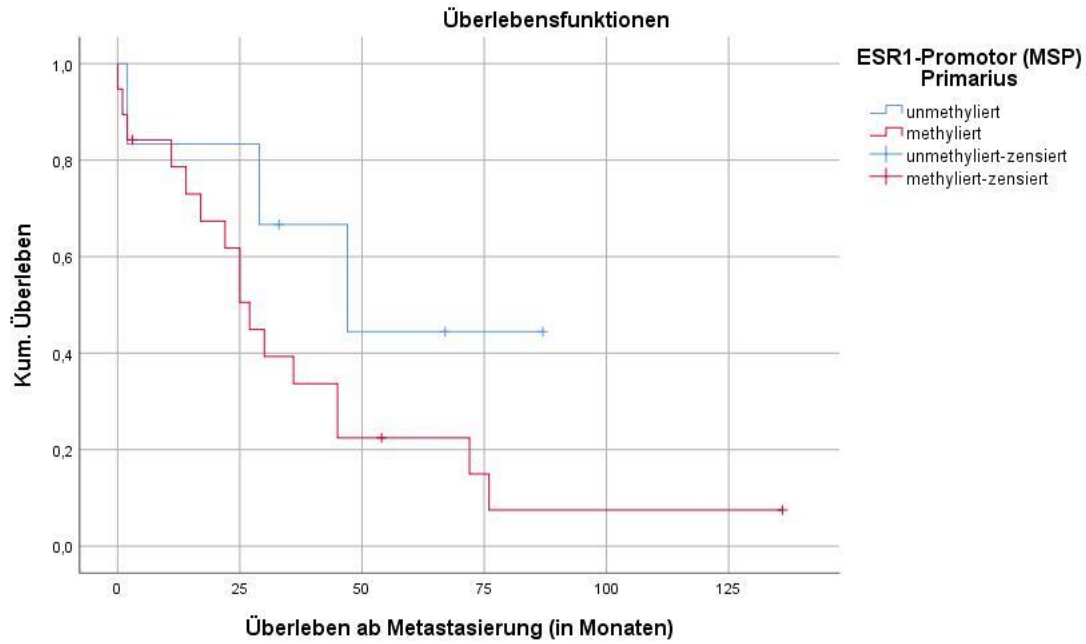


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve für das Überleben ab Metastasierung (in Monaten)

Die obere Kurve zeigt das Überleben ab Metastasierung bei Patientinnen mit unmethyliertem ESR1-Promotor des Primarius. Die untere Kurve stellt das Überleben der Patientinnen mit methyliertem Primarius dar ($p=0,158$)

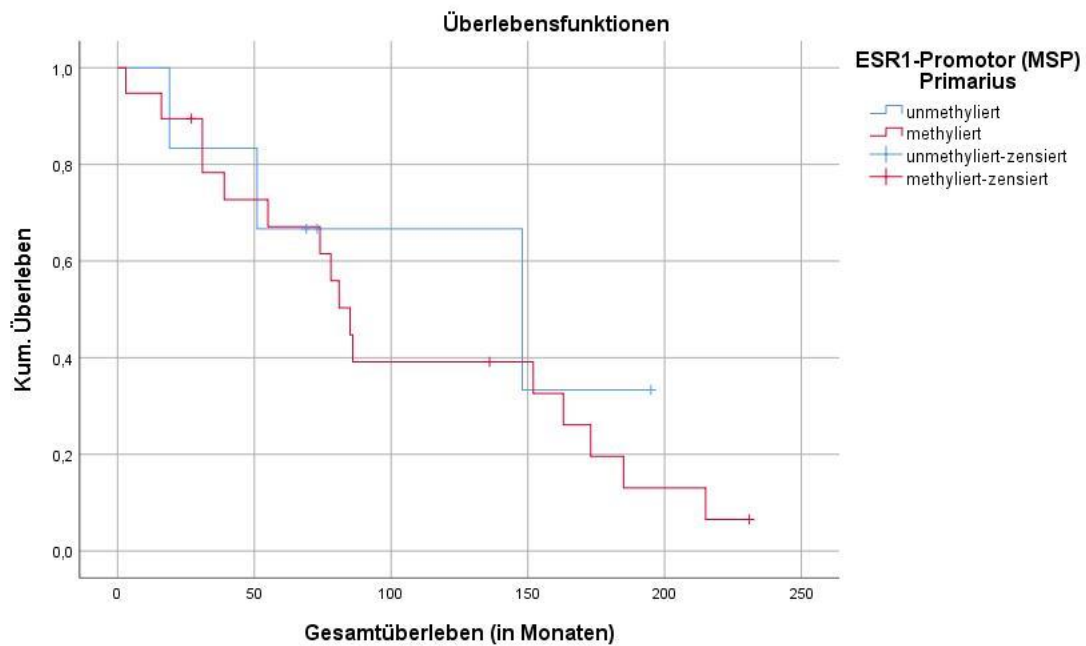


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve für das Gesamtüberleben (in Monaten)

Die obere Kurve stellt das Gesamtüberleben der Patientinnen mit unmethyliertem ESR1-Promotor des Primarius dar. Die untere Kurve zeigt das Gesamtüberleben bei methyliertem Promotor.

5. Diskussion

5.1 Repräsentativität des Kollektivs

Die vorliegende Arbeit soll als klinische Studie eine valide Aussage für die Praxis treffen. Daher ist eine hohe Repräsentativität des untersuchten Patientenkollektivs wichtig.

Laut Robert Koch-Institut (RKI) liegt das mittlere Erkrankungsalter beim Mammakarzinom bei 64 Jahren³. Die höchste Erkrankungsrate mit 45 % tritt in der Gruppe der 50- bis 69-Jährigen auf². Die Patientinnen in unserem Kollektiv waren bei Erstdiagnose durchschnittlich 52 Jahre alt und somit zwölf Jahre jünger als in der Gesamtbevölkerung. Die Gruppe der 50- bis 69-Jährigen macht auch in unserer Studie mit 48 % den größten Anteil aus. Dies deckt sich mit den Daten des RKI. Auffallend ist, dass sehr wenige Patientinnen in unserem Kollektiv bei Erstdiagnose älter als 70 Jahre alt waren.

Das frühere Erkrankungsalter unserer Studiengruppe könnte mit einer besseren medizinischen Versorgung sowie Inanspruchnahme medizinischer Leistungen und Früherkennung im Großstadtbereich zusammenhängen. Dadurch können Neuerkrankungen früher diagnostiziert werden. Für diese Studie wurden Patientinnen ausgewählt, die in der Universitätsfrauenklinik angebunden und deren Gewebeproben von Primarius und Metastase im Institut für Pathologie der Uniklinik archiviert waren. Die Universitätsklinik als Maximalversorger und Kompetenzzentrum hat viel Erfahrung in der Behandlung von komplexen und seltenen Erkrankungen. Da an Unikliniken häufig auch Forschungszentren sind, steht den Patienten oft ein größeres Angebot an diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten zur Verfügung. Somit ist es gut vorstellbar, dass sich vor allem jüngere Patientinnen mit dem Wunsch nach bestmöglicher Therapie an die Uniklinik anbinden. Dies könnte demnach ein wesentlicher Grund für das geringere Alter bei Erstdiagnose in unserem Studienkollektiv sein.

Drei der 25 Patientinnen (12 %) wurden bereits im metastasierten Stadium diagnostiziert. Dies deckt sich in etwa mit den Zahlen des RKI, wonach ca. 4 % aller Mammakarzinome bereits im metastasierten Stadium (UICC Stadium IV) diagnostiziert werden³⁴. Bei den anderen Patientinnen dauerte es im Schnitt drei Jahre, bis eine Metastase auftrat. In einer Studie von Kim et al. wird die mediane Zeit bis zur Metastasierung mit 31 Monaten angegeben⁸⁷. Diese Zeitspanne kommt der in unserem Kollektiv sehr nahe.

Bezogen auf alle Mammakarzinome in Deutschland in den Jahren 2015/2016 stellt sich die Verteilung bei Erstdiagnose in folgenden UICC-Stadien dar: 41 % in Stadium I, 39 % in Stadium II, 13 % in Stadium III und 7 % in Stadium IV. In unserem Kollektiv ergaben sich folgende Werte nach UICC-Stadium: 16 % Stadium I, 40 % Stadium II, 28 % Stadium III und 12 % Stadium IV. Vergleicht man die Zahlen, zeigt sich in unserem Studienkollektiv eine deutlich erhöhte Zahl an fortgeschrittenen UICC-Stadien bei Erstdiagnose. Je größer der

Tumor und je mehr Lymphknoten beteiligt sind, desto höher ist das UICC Stadium. Da unsere Patientinnen im Verlauf alle eine Metastasierung entwickeln und für diese Studie gezielt danach ausgesucht wurden, ist es nachvollziehbar, dass deshalb überproportional oft fortgeschrittene Stadien in unserem Kollektiv vertreten sind. Demnach sind Tumorgöße und Lymphknotenbeteiligung als Risikofaktoren für die Entstehung von Fernmetastasen anzusehen^{36,88,89}.

In einer Metaanalyse von Gerber et al. metastasiert das Mammakarzinom vor allem in Knochen (20-60 %), Lunge/Pleura (15-20 %), Leber (5-15 %) und lokal (20-40 %). In unserem Patientenkollektiv zeigt sich eine ähnliche Verteilung. Ein Fünftel der Metastasen sind Knochenmetastasen⁴³. Dies deckt sich gut mit den Daten der Metaanalyse. Die größte Fraktion der Metastasen bilden jedoch die Lebermetastasen mit 32 %. In der Pleura fanden sich 8 % aller Metastasen. Ein Grund für die abweichende Verteilung von Leber- und Pleurametastasen könnte die diagnostische Materialgewinnung sein. In die Studie wurden nur Patientinnen eingeschlossen, bei denen ausreichend Material für die Untersuchung bereitstand. Eine Leberstanze ist oft einfacher als eine Pleurabiopsie durchzuführen. Soll aus der Pleura eine Probe entnommen werden, wird hierfür vorwiegend eine video-assistierte Thorakoskopie durchgeführt. Der Patient wird hierfür intubiert und über einen Doppellumentubus beatmet⁹⁰. Oft kann eine Pleurakarzinose schon bei einer Pleurapunktion aus den Zellen im Erguss diagnostiziert werden, sodass eine Thorakoskopie, welche deutlich invasiver ist, nicht notwendig ist⁹¹. Für die Gewinnung einer Leberbiopsie genügt eine lokale Anästhesie⁹². Deshalb ist die Zahl an Lebermetastasen in unserer Studiengruppe größer und die der Pleurametastasen kleiner als in der Metaanalyse. Lokalrezidive treten in 20 bis 40 % der Fälle auf. In unserem Kollektiv haben vier von 25 Frauen ein Lokalrezidiv bekommen, was 16 % entspricht. Somit weicht die Metastasenlokalisation etwas von der Literatur ab, die Lokalrezidivrate ist jedoch in etwa repräsentativ für alle Mammakarzinom Patientinnen. Allgemein lässt sich jedoch sagen, dass aufgrund der relativ niedrigen Patientenzahl in unserer Studie bereits kleine Abweichungen in den absoluten Zahlen für große Änderungen der prozentuellen Zahlen sorgen.

Laut Klassifikation der World Health Organisation (WHO) für Brustkrebs sind 40 bis 75 % aller invasiven Karzinome vom invasiv duktalem Typ. Sie sind damit die größte histologische Untergruppe. Die invasiv lobulären Karzinome machen hingegen 10 bis 15 % aller Mammakarzinome aus²¹. Auch in unserer Studie ist der vorwiegende histologische Subtyp mit 88 % das invasiv duktales Karzinom. Die restlichen Karzinome sind invasiv lobulär, was sich mit den oben genannten Zahlen deckt. Demnach spiegelt unser Patientenkollektiv auch im Hinblick auf die histologische Klassifikation die reale Situation wider.

5.2 Ist die ESR1-Methylierung ein valider Marker?

Diese Studie beschäftigt sich mit der Methylierung des ESR1-Promotors beim metastasierten Mammakarzinom. Die Expression des Östrogenrezeptors wird schon seit vielen Jahren in der klinischen Routinediagnostik verwendet. Patientinnen, die den Östrogenrezeptor ausbilden, haben in der Regel ein besseres Outcome und ein niedrigeres Rezidivrisiko als ER-negative Patientinnen. Zusätzlich ist auch ein besseres Ansprechen auf eine endokrine Therapie mit einer Ausprägung des ER vergesellschaftet^{70,71}.

Lapidus et al. entwickelte 1996 eine methylierungsspezifische PCR, mit dessen Hilfe man die Methylierung des Östrogenrezeptors untersuchen konnte⁷⁴. Mit dieser MSP analysierte er den Methylierungsstatus des Östrogenrezeptors in gesundem Brustgewebe und bei Mammakarzinomzelllinien. In den Zelllinien, welche den Östrogenrezeptor nicht exprimieren, konnte eine deutliche Methylierung des ESR1-Promotors gezeigt werden. Keine Methylierung zeigte hingegen das untersuchte gesunde Brustgewebe und die Zelllinie, welche den Östrogenrezeptor exprimiert. Wir wählten die untersuchte Zelllinie MD-MBA-231 als Positivkontrolle. Sie ist ER-negativ und weist in der MSP eine Methylierung des ESR1 auf. Als Negativkontrolle verwendeten wir die ER-positive Zelllinie MCF-7, welche einen methylierten Promotor hat.

Zur Etablierung und Validierung der MSP beim metastasierten Mammakarzinom führten wir zunächst Vorversuche durch. Wir stellten uns die Frage, ob das TNM-Stadium Auswirkungen auf den Methylierungsstatus des ESR1 hat. Dafür stellten wir eine Kontrollgruppe zusammen, die aus sechs Patientinnen bestand, welche an einem nicht-metastasierten Mammakarzinom im TNM-Stadium pT1b-c N0 M0 erkrankt waren. Die Proben wurden, wie die des Studienkollektivs, aufbereitet und untersucht. Die einzige ER-negative Probe zeigte eine ESR1-Methylierung. Jedoch war auch bei vier der fünf ER-positiven Proben der Östrogenrezeptor methyliert. Nimmt man die Studie von Lapidus et al. als Referenz müssten die ER-positiven Proben keine Amplifikation in der MSP zeigen.

Die Vermutung war zunächst, dass Stromazellen, Gefäße oder lymphozytäre Infiltrate zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen. Auch zeigte sich bei der genaueren Mikroskopie die Ausprägung des ER bei einigen Tumoren innerhalb eines Tumoreals inhomogen. Deshalb wurden weitere neun Patientenproben ausgewählt, bei denen sowohl eine Makrodissektion der Tumorzellen als auch der gesamte Tumorbereich analysiert werden konnten. Die C_T -Werte der makrodissektierten Proben waren viel höher als die des gesamten Tumorbereichs. Dies lässt sich dadurch erklären, dass durch die Makrodissektion viel weniger DNA in die PCR eingesetzt werden konnte. Bei sieben der neun Proben waren die Ergebnisse nach Makrodissektion und bei Untersuchung des Tumorbereichs gleich. Bei den zwei übrigen Proben waren die PCR der makrodissektierten Proben als negativ zu werten. Die Vermutung liegt hier jedoch nahe, dass zu wenig DNA für die PCR eingesetzt wurde, um einen C_T -Wert

von unter 39 zu erlangen. Es gab jedoch keinen Fall, bei der die makrodissektierte Probe positiv war und die zugehörige gesamte Probe negativ. Daraus lässt sich folgern, dass durch Stromazellen oder inhomogene Proben keine Beeinflussung der PCR-Ergebnisse auftritt.

Der Anteil der positiven PCR-Ergebnisse der Vorversuche stimmen mit denen der Studiengruppe überein. Weder TNM-Stadium, noch Stromazellen, Gefäße oder lymphozytäre Infiltrate scheinen die MSP-PCR zu beeinflussen.

5.3 ESR1-Methylierung als prädiktiver Marker

Beim metastasierten Mammakarzinom spielt die endokrine Resistenz eine entscheidende Rolle. Patientinnen mit initial positivem ER des Primarius zeigen einen Expressionsverlust in der Metastase. Hierdurch verringern sich die Therapiechancen und das Überleben^{72,73}. Noch gibt es keinen verlässlichen Marker, der den Expressionsverlust vorhersehen kann.

Betrachtet man unsere Studienergebnisse, so fällt auf, dass sowohl bei den Primärtumoren, als auch bei den Metastasen der ESR1-Promotor häufig methyliert vorliegt. Laut Lapidus et al. führt die CpG-Insel-Methylierung zu einem Ausbleiben der Expression und Transkription des assoziierten Gens⁷⁴. Somit erwartet man, dass die Tumore mit einem methylierten Promotor den Östrogenrezeptor nicht exprimieren. Auch eine Studie von Martínez-Galán et al. zeigt diese inverse Relation auf⁷¹. In unserer Untersuchung findet sich diese einfache Korrelation jedoch nicht. 22 der 25 Primärtumore zeigten eine Expression des Östrogenrezeptors. Von den 22 ER-positiven Tumoren war bei 17 der ESR1-Promotor methyliert. Auch bei den Metastasen ist bei 15 der 16 ER-positiven Proben der Östrogenrezeptor methyliert. Entgegen der Annahme konnten wir zeigen, dass trotz methyliertem ESR1-Promotors in den meisten Fällen der Östrogenrezeptor exprimiert wird. Ein möglicher Grund hierfür könnten andere epigenetische Veränderungen sein, die in die Genexpression eingreifen können. Hierfür sprechen auch andere Studien, bei denen ebenfalls eine hohe Rate an ER-positiven Mammakarzinomen methyliert ist^{79,93}. In unserer Studie haben wir einzig erfasst, ob der ESR1-Promotor methyliert ist oder nicht. Es ist möglich, dass es Tumore gibt, bei denen in der Promotorregion nur wenige CpG-Inseln methyliert sind. Der epigenetische Einfluss der geringen CpG-Inselmethylierung wäre somit zu schwach, um die Expression des Östrogenrezeptors vollständig zu blockieren. Da auch Methylierungen in geringem Umfang in unserer Studie zu einem positiven PCR-Ergebnis führen, wäre zusätzlich eine quantitative Analyse sinnvoll. Hierdurch könnte man die Menge der methylierten DNA bestimmen.

Betrachtet man die ER-negativen Tumore, ist lediglich in einem Fall der ESR1 nicht methyliert. Bei den anderen elf Malignomen zeigt sich eine Promotormethylierung. Hier trifft die inverse Korrelation von Methylierung und Rezeptorexpression in neun von zehn Fällen zu. In vergleichbaren Studien liegt die Rate bei 77 bis 83 %^{93,94}.

Die ER-negativen Tumore nehmen eine Sonderstellung ein. Durch den Expressionsverlust sind die sonst gut wirksamen antiöstrogenen Therapieoptionen mit Östrogenrezeptormodulatoren nicht anwendbar. Die Therapiemöglichkeiten sind somit limitiert. Die ESR1-Rezeptormethylierung erfasst zwar nur mit einer Spezifität von 25 % die ER-negativen Tumore, die Sensitivität liegt jedoch bei 91 %.

In unserem Studienkollektiv kommt es bei sieben der 19 Patientinnen mit methyliertem ESR1-Promotor des Primarius zu einem Expressionsverlust des ER der Metastase. Bei den übrigen sechs PCR-negativen Primärtumoren kam es in keinem Fall zu einem Expressionsverlust. Somit lässt sich mit der ESR1-Methylierung des Primarius mit einer Spezifität von 37 % und einer Sensitivität von 100 % ein Expressionsverlust vorhersagen. Überträgt man das Ergebnis auf die Allgemeinheit lässt sich daraus schlussfolgern, dass sobald der ESR1-Promotor in einem Mammakarzinom unmethyliert ist, kein Risiko zur Entwicklung einer endokrinen Resistenz bei möglichen Metastasen besteht. Ist der ESR1-Promotor methyliert, kann es bei etwa einem Drittel der Fälle zu einem Expressionsverlust kommen. Die fehlende Methylierung des Primarius kann in unserer Studie in allen Fällen einen Statuswechsel von ER-positiv zu ER-negativ ausschließen. Ein Statuswechsel bedeutet oft die Entwicklung einer endokrinen Resistenz. Durch eine negative PCR konnte in unserer Studie die Zahl der Patienten hierfür von 25 auf 19 reduziert werden. Damit steigt das Risiko zur Entwicklung einer endokrinen Resistenz in unserer Studienpopulation bei positiver PCR von 28 % (7/25) auf 37 % (7/19). Die Bestimmung der ESR1-Methylierung zum Erstdiagnosezeitpunkt wäre also sinnvoll. Als prädiktiver Marker könnte er die Risikopatienten für die Entstehung einer endokrinen Resistenz detektieren und eingrenzen. Diese Patientinnen könnten von einer intensivierten und höherfrequentierten Nachsorge profitieren.

Die Therapieoptionen für Brustkrebspatientinnen sind umfangreich und gut untersucht. Der Therapieansatz ist meist kurativ. Im metastasierten Stadium hingegen ist die Therapie in der Regel palliativ. Dennoch sind Verzögerung des Progresses und Erhalt der Lebensqualität ein wichtiges therapeutisches Ziel.

Von den Patientinnen mit initial methyliertem ESR1-Promotor waren 84 % bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung verstorben. Von den Patientinnen mit negativer MSP waren dies deutlich weniger (50 %). Auch die Überlebenszeit war in der Gruppe mit methyliertem Promotor kürzer als ohne Methylierung. Patientinnen mit methyliertem Promotor des Primarius wiesen ein Gesamtüberleben von 105,3 Monaten auf. Die Patientinnen ohne Methylierung lebten hingegen 20,7 Monate länger. Auch ab Metastasierung hatten die Patientinnen mit unmethyliertem ESR1-Promotor einen Überlebensvorteil (54,3 Monate vs. 38,1 Monate). Die Ergebnisse sind zwar statistisch nicht signifikant, es lässt sich jedoch ein Trend aufzeigen. Hierzu passt auch unser Ergebnis, dass es bei keiner der unmethylierten Primariusproben zu einem Statuswechsel von positivem zu negativem ER kam. Die korrespondierende Metastase

war somit weiterhin ER-positiv und eine Therapie mit Östrogenrezeptormodulatoren weiterhin möglich. Dadurch erhöhten sich die Überlebens- und Remissionschancen. Ist der Primärtumor hingegen methyliert, kann es zu einem Wechsel des Östrogenrezeptorstatus kommen. Für einen ER-negativen Tumor sind deutlich weniger Therapiemöglichkeiten vorhanden, was mit einer geringeren Lebenserwartung vergesellschaftet ist.

Jedoch kann die Methylierung des ESR1-Promotors auch ungeachtet vom Einfluss auf den Hormonrezeptorstatus direkt das Überleben verringern. In einer Publikation von Mastoraki et al. wurde die ESR1-Promotormethylierung in zirkulierenden Tumorzellen im metastasierten Stadium untersucht. War in den Zellen der ESR1-Promotor methyliert, führte dies zu einem signifikant kürzerem Überleben ⁹⁵.

In dieser Studie sollte gezeigt werden, ob ein Zusammenhang zwischen Methylierung des ESR1-Promotors im Primärtumor und der korrespondierenden Metastase bei Mammakarzinom-Patientinnen vorliegt. Die methylierungsspezifische PCR kann die Prognose und das Überleben der Patientinnen vorhersagen und Frauen mit dem Risiko zur Entwicklung einer endokrinen Resistenz detektieren. Unsere Ergebnisse zeigen welchen Beitrag die Bestimmung der ESR1-Promotormethylierung bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom leisten kann.

5.4 Limitationen und Ausblick

In unserer Studie wurden 25 FFPE-Proben von Primarius und korrespondierender Metastase untersucht. Da für unsere Untersuchung von beiden Tumoren Präparate vorliegen mussten, konnte eine Vielzahl an Patientinnen nicht in die Studie eingeschlossen werden. Hierdurch war das untersuchte Kollektiv sehr klein, weshalb sich signifikante Aussagen nur schwer treffen lassen. Um die vielversprechenden Ergebnisse unserer Studie zu untermauern, wären weitere Untersuchungen mit größerer Fallzahl wünschenswert. Zusätzlich könnte auch eine prospektive Studie einen besseren Überblick über den Verlauf der erkrankten Patientinnen liefern.

Für unsere Studie wurden FFPE-Proben verwendet. Durch die Behandlung der Gewebeprobe mit Formaldehyd kommt es zu einer Stabilisierung der Gewebestruktur. Dadurch entstehen Querverbindungen zwischen der DNA an sich und der DNA mit anderen Proteinen. Bei der DNA-Extraktion aus der formalinfixierten Probe kann die Auflösung dieser Querverbindungen zu Strangbrüchen und Fragmentierung der DNA führen. Das Vorhandensein von DNA-Fragmenten kann eine fehlerhafte PCR-Analyse bedeuten, wenn beispielsweise der Strangbruch genau in einer Primerregion liegt. Eine Möglichkeit dieses zu umgehen, wäre die DNA-Untersuchung an frischen Gewebeproben. Da bei frischem Gewebe keine chemische Vorbehandlung durchgeführt wird, ist die Gefahr für eine Fragmentierung deutlich geringer ⁹⁶.

Die Konzentration der eluierten Proben wurde photometrisch mit dem Nano-Drop® bestimmt. Zur besseren Einschätzung der Qualität der extrahierten DNA und zur Bestimmung der Fragmente kann ergänzend eine Kapillarelektrophorese durchgeführt werden. Hierbei wird die DNA nach Größe der Fragmente aufgetrennt und quantifiziert. Da wir jedoch nur geringe DNA-Konzentrationen vorliegen hatten, wurde auf die Elektrophorese verzichtet, um möglichst viel DNA in die MSP einsetzen zu können ⁹⁷.

Die verwendeten Primersequenzen in unserer Studie wurden bereits im Vorfeld von mehreren Studien zur Untersuchung des Methylierungsstatus des ESR1-Promotors etabliert und verwendet ⁹⁸⁻¹⁰⁰. Es ist möglich, dass es noch andere CpG-Inseln in dem ESR1-Promotor gibt, welche eine Methylierung aufweisen können. Eine Analyse mit Next-Generation-Sequencing wäre hierfür in weiterführenden Studien sinnvoll, um weitere CpG-Inseln zu detektieren und eine methylierungsspezifische PCR durchzuführen. Auch könnte die Methylierung des ESR2 eine Rolle für den Expressionsverlust des Östrogenrezeptors spielen.

Bei der methylierungsspezifischen PCR wurde als Positivkontrolle bisulfitbehandelte DNA der MD-MBA-231-Zelllinie benutzt, welche eine Methylierung des ESR1-Promotors aufweist. Mit der bisulfitbehandelten DNA dieser Zelllinie wurde eine Verdünnungsreihe angelegt. Hiermit wurde die Sensitivität der methylierungsspezifischen PCR getestet. Bis zu einer DNA-Menge von 0,1953 ng war eine Amplifikation zu verzeichnen. Mithilfe der Standardkurve kann eine Quantifizierung der PCR erfolgen. In unserer Analyse haben wir uns zunächst auf eine qualitative Aussage der PCR beschränkt. In weiteren Versuchen könnte über die Standardkurve eine Quantifizierung erfolgen, um Rückschlüsse auf die Menge an methylierter DNA in den untersuchten Patientenproben zu ziehen.

In unserer Studie ist eine hohe Anzahl der durchgeführten MSP trotz bestehender Östrogenrezeptorausprägung wider Erwarten positiv. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass keine quantitative Analyse durchgeführt wurde, es wurden rein qualitative Ergebnisse ermittelt. Schon eine relativ geringe Zahl an methylierten CpG-Inseln kann zu einer positiven PCR führen. Quantitative Untersuchungen könnten Klarheit darüber schaffen, inwiefern die Menge an methylierter DNA Einfluss auf die Rezeptorausprägung hat.

Epigenetische Veränderungen wie die Promotormethylierung sind bereits in anderen Bereichen der Medizin in der klinischen Routine angekommen. So wird bei Glioblastom-Patienten die Methylierung des MGMT-Promotors bereits als prognostischer Parameter für das Therapieansprechen genutzt. Werden die Patienten, die nicht von einer Therapie profitieren, frühzeitig entdeckt, können diese vor möglichen Nebenwirkungen der Chemotherapie bewahrt werden ¹⁰¹.

Durch die Etablierung eines neuen epigenetischen Markers könnte die Tumorthherapie deutlich personalisierter und zielgerichteter eingeleitet werden. Dies könnte zukünftig auch für

Brustkrebspatientinnen, insbesondere im metastasierten Stadium, eine erheblich effektivere Behandlung bedeuten.

6. Literaturverzeichnis

- 1 DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2014; **64**: 52–62.
- 2 Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Berlin 2016.
- 3 Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Krebs in Deutschland für die Jahre 2017/2018. Berlin 2021.
- 4 Valencia OM, Samuel SE, Viscusi RK, Riall TS, Neumayer LA, Aziz H. The Role of Genetic Testing in Patients With Breast Cancer. A Review. *JAMA Surg* 2017; **152**: 589–94.
- 5 Paul A, Paul S. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2014; **19**: 605–18.
- 6 Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review). *Oncol Rep* 2013; **30**: 1019–29.
- 7 Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 2015; **14**: 196–202.
- 8 Chen Y, Thompson W, Semenciw R, Mao Y. Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999; **8**: 855–61.
- 9 Tamimi RM, Colditz GA, Hazra A, et al. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; **131**: 159–67.
- 10 Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer Causes Control* 2009; **20**: 1071–82.
- 11 Setiawan VW, Monroe KR, Wilkens LR, Kolonel LN, Pike MC, Henderson BE. Breast cancer risk factors defined by estrogen and progesterone receptor status. The multiethnic cohort study. *Am J Epidemiol* 2009; **169**: 1251–59.
- 12 Millikan RC, Newman B, Tse C-K, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **109**: 123–39.
- 13 Li CI, Malone KE, Daling JR, et al. Timing of menarche and first full-term birth in relation to breast cancer risk. *Am J Epidemiol* 2008; **167**: 230–39.
- 14 Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 2003; **362**: 419–27.
- 15 Lacey JV, Kreimer AR, Buys SS, et al. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* 2009; **9**: 84.

- 16 Ritte R, Lukanova A, Berrino F, et al. Adiposity, hormone replacement therapy use and breast cancer risk by age and hormone receptor status. A large prospective cohort study. *Breast Cancer Res* 2012; **14**: R76.
- 17 Suzuki R, Orsini N, Saji S, Key TJ, Wolk A. Body weight and incidence of breast cancer defined by estrogen and progesterone receptor status--a meta-analysis. *Int J Cancer* 2009; **124**: 698–712.
- 18 Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P. Active and passive smoking and risk of breast cancer. A meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2015; **154**: 213–24.
- 19 Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, et al. Breast cancer after chest radiation therapy for childhood cancer. *J Clin Oncol* 2014; **32**: 2217–23.
- 20 Makki J. Diversity of Breast Carcinoma. Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clin Med Insights Pathol* 2015; **8**: 23–31.
- 21 Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012.
- 22 Böcker W, Heitz PU, Aguzzi A, eds. Pathologie. München: Elsevier Urban & Fischer, 2008.
- 23 Grundmann E, Roessner A, Müller-Hermelink HK, Pfeifer U, eds. Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. München: Elsevier Urban & Fischer, 2010.
- 24 Weyerstahl T, Stauber M. Gynäkologie und Geburtshilfe. Stuttgart: Thieme, 2013.
- 25 Diedrich K, Holzgreve W, Jonat W, Schneider K-TM, Schultze-Mosgau A, Weiss JM, eds. Gynäkologie und Geburtshilfe. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007.
- 26 Gemeinsamer Bundesausschuss. Richtlinie über die Früherkennung von Krebserkrankungen (Krebsfrüherkennungs-Richtlinien/KFE-RL). *Bundesanzeiger* 2009.
- 27 Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med* 2010; **134**: e48-72.
- 28 Yalcin B. Staging, risk assessment and screening of breast cancer. *Exp Oncol* 2013; **35**: 238–45.
- 29 Haag P, Hanhart N. Gynäkologie und Urologie. Für Studium und Praxis : inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen. Breisach: Medizinische Verlags- und Informationsdienste, 2016.
- 30 Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer. Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991; **19**: 403–10.

- 31 Uehiro N, Horii R, Iwase T, et al. Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer. *Breast Cancer* 2014; **21**: 748–53.
- 32 Brierley J, Gospodarowicz MK, Wittekind C, eds. TNM classification of malignant tumours. Chichester, West Sussex, UK, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2017.
- 33 Kimbung S, Loman N, Hedenfalk I. Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. *Semin Cancer Biol* 2015; **35**: 85–95.
- 34 Barrett T, Bowden DJ, Greenberg DC, Brown CH, Wishart GC, Britton PD. Radiological staging in breast cancer: which asymptomatic patients to image and how. *Br J Cancer* 2009; **101**: 1522–28.
- 35 Kozłowski J, Kozłowska A, Kocki J. Breast cancer metastasis - insight into selected molecular mechanisms of the phenomenon. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2015; **69**: 447–51.
- 36 Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 3271–77.
- 37 Rahman M, Mohammed S. Breast cancer metastasis and the lymphatic system. *Oncol Lett* 2015; **10**: 1233–39.
- 38 Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer* 2003; **98**: 413–23.
- 39 Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology* 2010; **17**: 229–51.
- 40 Darbre PD. Recorded quadrant incidence of female breast cancer in Great Britain suggests a disproportionate increase in the upper outer quadrant of the breast. *Anticancer Res* 2005; **25**: 2543–50.
- 41 Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* 1989; **8**: 98–101.
- 42 Jin X, Mu P. Targeting Breast Cancer Metastasis. *Breast Cancer (Auckl)* 2015; **9**: 23–34.
- 43 Gerber B, Freund M, Reimer T. Recurrent breast cancer. Treatment strategies for maintaining and prolonging good quality of life. *Dtsch Arztebl Int* 2010; **107**: 85–91.
- 44 Leitlinienprogramm Onkologie L, ed. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 4.1, September 2018. Germering: Zuckschwerdt, 2018.
- 45 Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie. Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome. München: Zuckschwerdt Verlag GmbH, 2020.
- 46 Dear RF, McGeechan K, Jenkins MC, Barratt A, Tattersall MHN, Wilcken N. Combination versus sequential single agent chemotherapy for metastatic breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2013: CD008792.

- 47 Badwe R, Hawaldar R, Nair N, et al. Locoregional treatment versus no treatment of the primary tumour in metastatic breast cancer: an open-label randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 2015; **16**: 1380–88.
- 48 Dominici L, Najita J, Hughes M, et al. Surgery of the primary tumor does not improve survival in stage IV breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; **129**: 459–65.
- 49 Cardoso F, Costa A, Norton L, et al. ESO-ESMO 2nd international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC2)†. *Ann Oncol* 2014; **25**: 1871–88.
- 50 Zhang L, Li Z, Zhang J, Wu Y, Zhu Y, Tong Z. De novo metastatic breast cancer: Subgroup analysis of molecular subtypes and prognosis. *Oncol Lett* 2020; **19**: 2884–94.
- 51 Cortesi L, Toss A, Cirilli C, et al. Twenty-years experience with de novo metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 2015; **137**: 1417–26.
- 52 Leone BA, Vallejo CT, Romero AO, et al. Prognostic impact of metastatic pattern in stage IV breast cancer at initial diagnosis. *Breast Cancer Res Treat* 2017; **161**: 537–48.
- 53 Wang H, Zhang C, Zhang J, Kong L, Zhu H, Yu J. The prognosis analysis of different metastasis pattern in patients with different breast cancer subtypes: a SEER based study. *Oncotarget* 2017; **8**: 26368–79.
- 54 Lobbezoo DJA, van Kampen RJW, Voogd AC, et al. Prognosis of metastatic breast cancer subtypes: the hormone receptor/HER2-positive subtype is associated with the most favorable outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2013; **141**: 507–14.
- 55 Arciero CA, Guo Y, Jiang R, et al. ER+/HER2+ Breast Cancer Has Different Metastatic Patterns and Better Survival Than ER-/HER2+ Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2019; **19**: 236–45.
- 56 Shen H, Laird PW. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell* 2013; **153**: 38–55.
- 57 Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA. Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med* 2008; **59**: 267–80.
- 58 Dehan P, Kustermans G, Guenin S, Horion J, Boniver J, Delvenne P. DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications. *Expert Rev Mol Diagn* 2009; **9**: 651–57.
- 59 Klutstein M, Nejman D, Greenfield R, Cedar H. DNA Methylation in Cancer and Aging. *Cancer Res* 2016; **76**: 3446–50.
- 60 Illingworth R, Kerr A, Desousa D, et al. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol* 2008; **6**: e22.
- 61 Acconcia F, Kumar R. Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Lett* 2006; **238**: 1–14.
- 62 Yaşar P, Ayaz G, User SD, Güpür G, Muyan M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol* 2017; **16**: 4–20.

- 63 Jeffreys SA, Powter B, Balakrishnar B, et al. Endocrine Resistance in Breast Cancer: The Role of Estrogen Receptor Stability. *Cells* 2020; **9**.
- 64 Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 5925–30.
- 65 Hewitt SC, Winuthayanon W, Korach KS. What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J Mol Endocrinol* 2016; **56**: R55-71.
- 66 Walter P, Green S, Greene G, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; **82**: 7889–93.
- 67 Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 2013; **19**: 197–209.
- 68 Hewitt SC, Korach KS. Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocr Rev* 2018; **39**: 664–75.
- 69 Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997; **138**: 863–70.
- 70 Lapidus RG, Nass SJ, Davidson NE. The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998; **3**: 85–94.
- 71 Martínez-Galán J, Torres-Torres B, Núñez MI, et al. ESR1 gene promoter region methylation in free circulating DNA and its correlation with estrogen receptor protein expression in tumor tissue in breast cancer patients. *BMC Cancer* 2014; **14**: 59.
- 72 Aurilio G, Disalvatore D, Pruneri G, et al. A meta-analysis of oestrogen receptor, progesterone receptor and human epidermal growth factor receptor 2 discordance between primary breast cancer and metastases. *Eur J Cancer* 2014; **50**: 277–89.
- 73 Yang Y-F, Liao Y-Y, Yang M, Peng N-F, Xie S-R, Xie Y-F. Discordances in ER, PR and HER2 receptors between primary and recurrent/metastatic lesions and their impact on survival in breast cancer patients. *Med Oncol* 2014; **31**: 214.
- 74 Lapidus RG, Ferguson AT, Ottaviano YL, et al. Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors. *Clin Cancer Res* 1996; **2**: 805–10.
- 75 Lapidus RG, Nass SJ, Butash KA, et al. Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1998; **58**: 2515–19.
- 76 Yan L, Yang X, Davidson NE. Role of DNA methylation and histone acetylation in steroid receptor expression in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; **6**: 183–92.

- 77 Iwase H, Omoto Y, Iwata H, et al. DNA methylation analysis at distal and proximal promoter regions of the oestrogen receptor gene in breast cancers. *Br J Cancer* 1999; **80**: 1982–86.
- 78 Prabhu JS, Wahi K, Korlimarla A, et al. The epigenetic silencing of the estrogen receptor (ER) by hypermethylation of the ESR1 promoter is seen predominantly in triple-negative breast cancers in Indian women. *Tumour Biol* 2012; **33**: 315–23.
- 79 Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, et al. DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 2003; **63**: 7641–45.
- 80 Widschwendter M, Siegmund KD, Müller HM, et al. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 2004; **64**: 3807–13.
- 81 Ramos EAS, Camargo AA, Braun K, et al. Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. *BMC Cancer* 2010; **10**: 23.
- 82 Zurita M, Lara PC, Del Moral R, et al. Hypermethylated 14-3-3-sigma and ESR1 gene promoters in serum as candidate biomarkers for the diagnosis and treatment efficacy of breast cancer metastasis. *BMC Cancer* 2010; **10**: 217.
- 83 Solanki G. Polymerase Chain Reaction. *Int Jour of Pharmc Res* 2012; **2**: 98–102.
- 84 Harris S, Jones DB. Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci* 1997; **54**: 166–73.
- 85 Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 2005; **29**: 151–59.
- 86 Bio Rad Laboratories. Real-Time PCR. Applications Guide, 2006.
- 87 Kim HJ, Ahn SG, Lee HM, et al. Metastasis-Free Interval Is Closely Related to Tumor Characteristics and Has Prognostic Value in Breast Cancer Patients with Distant Relapse. *J Breast Cancer* 2015; **18**: 371–77.
- 88 Koscielny S, Tubiana M, Lê MG, et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* 1984; **49**: 709–15.
- 89 Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 1989; **63**: 181–87.
- 90 Mehrotra M, D'Cruz JR, Arthur ME. StatPearls. Video-Assisted Thoracoscopy. Treasure Island (FL), 2020.
- 91 Ried M, Hofmann H-S. The treatment of pleural carcinosis with malignant pleural effusion. *Dtsch Arztebl Int* 2013; **110**: 313–18.
- 92 Semmo N, Spangenberg HC, Blum HE. Die perkutane Leberbiopsie. *Dtsch Med Wochenschr* 2007; **132**: 2643–45.

- 93 Wei M, Xu J, Dignam J, et al. Estrogen receptor alpha, BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 2008; **111**: 113–20.
- 94 Pirouzpanah S, Taleban F-A, Mehdipour P, Sabour S, Atri M. Hypermethylation pattern of ESR and PgR genes and lacking estrogen and progesterone receptors in human breast cancer tumors: ER/PR subtypes. *Cancer Biomark* 2018; **21**: 621–38.
- 95 Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, et al. ESR1 Methylation: A Liquid Biopsy-Based Epigenetic Assay for the Follow-up of Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Treatment. *Clin Cancer Res* 2018; **24**: 1500–10.
- 96 Ottestad AL, Emdal EF, Grønberg BH, Halvorsen TO, Dai HY. Fragmentation assessment of FFPE DNA helps in evaluating NGS library complexity and interpretation of NGS results. *Exp Mol Pathol* 2022; **126**: 104771.
- 97 Smith A, Nelson RJ. Capillary electrophoresis of DNA. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 2003; **Chapter 10**: Unit 10.9.
- 98 Müller HM, Fiegl H, Widschwendter A, Widschwendter M. Prognostic DNA methylation marker in serum of cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1022**: 44–49.
- 99 Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**: E32.
- 100 Harder J, Engelstaedter V, Usadel H, et al. CpG-island methylation of the ER promoter in colorectal cancer: analysis of micrometastases in lymph nodes from UICC stage I and II patients. *Br J Cancer* 2009; **100**: 360–65.
- 101 Taylor JW, Schiff D. Treatment considerations for MGMT-unmethylated glioblastoma. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2015; **15**: 507.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weg der lymphogenen Metastasierung.....	15
Abbildung 2: Lokalisation des Mammakarzinoms	16
Abbildung 3: Weg der hämatogenen Metatasierung	17
Abbildung 4: HE-Präparat mit Markierung	25
Abbildung 5: Amplifikationsverlauf	29
Abbildung 6: TaqMan Assay.....	31
Abbildung 7: Temperaturprotokoll der MSP	31
Abbildung 8: PCR der Kontrollgruppe.....	33
Abbildung 9: Mamma-Ca 200-fache Vergrößerung	34
Abbildung 10: ER-positive Probe.....	35
Abbildung 11: ER-negative Probe	35
Abbildung 12: PCR mit Nuklease-freiem Wasser.....	37
Abbildung 13: Negativkontrolle MCF7	37
Abbildung 14: Verdünnungsreihe der Positivkontrolle MD-MBA-231	38
Abbildung 15: Standardkurve MD-MBA-231	38
Abbildung 16: Kaplan-Meyer-Kurve für das Überleben am Metastasierung (in Monaten)	43
Abbildung 17: Kaplan-Meyer-Kurve für das Gesamtüberleben (in Monaten)	43

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grading nach Elston und Ellis	12
Tabelle 2: TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms.....	13
Tabelle 3: Stadieneinteilung des Mammakarzinoms nach UICC.....	14
Tabelle 4: Lokalisation und Inzidenz von Metastasen.....	17
Tabelle 5: Bisulfit-Reaktionsansatz.....	28
Tabelle 6: Thermocycler Einstellungen.....	28
Tabelle 7: Zusammensetzung Buffer BL und Träger-RNA.....	28
Tabelle 8: PCR-Ansatz.....	31
Tabelle 9: Verteilung in der Kontrollgruppe.....	33
Tabelle 10: PCR der makrodissektierten Proben.....	36
Tabelle 11: Übersicht der Tumorstadien bei Erstdiagnose.....	39
Tabelle 12: Altersverteilung des Patientenkollektivs	40
Tabelle 13: Charakteristika des Patientenkollektivs	40
Tabelle 14: Aufteilung Primärtumor	41
Tabelle 15: Aufteilung Metastase	41
Tabelle 16: Wechsel des ER-Status und der ESR1-Methylierung von Primarius zu Metastase in absoluten Zahlen	42
Tabelle 17: ER-Statuswechsel bezogen auf die ESR1-Methylierung des Primarius	42

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Teile des Inhalts und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab in der Zeitschrift „Clinical & Experimental Metastasis“ (Springer Verlag) veröffentlicht.

Kirn V, Strake L, Thangarajah F, et al. ESR1-promoter-methylation status in primary breast cancer and its corresponding metastases. *Clin Exp Metastasis* 2018; **35**: 707–12.