

Aus der Abteilung Transfusionsmedizin
(PD Dr. med. J. Riggert)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Epigenetische Veränderungen von
zirkulierender Tumor-DNA im
Blutplasma von Patienten mit
Mammakarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ilka Berger

aus

Bremen

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. T. Legler
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. Elisabeth Zeisberg
Drittreferent/in:	Prof. Dr. rer. nat. Peter Burfeind

Datum der mündlichen Prüfung: 23.11.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Epigenetische Veränderungen von zirkulierender Tumor-DNA im Blutplasma von Patienten mit Mammakarzinom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 15.02.2021

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Überblick über die epidemiologischen Daten zu Krebs und dem Mammakarzinom	3
1.2 Risikofaktoren des Mammakarzinoms	4
1.3 Pathogenese und beteiligte Gene bei der Entstehung des Mammakarzinoms	6
1.4 Tumorentstehung und Kanzerogenese der Mamma auf Genebene	6
1.5 Epigenetische Mechanismen des Mammakarzinoms	8
1.6 Anatomischer und histologischer Aufbau der Mamma	22
1.7 Das Mammakarzinom und seine Differentialdiagnosen	24
2 Material und Methoden	39
2.1 Studiendesign und Patientenauswahl	39
2.2 Materialverarbeitung	39
2.3 Oligonukleotide	40
2.4 DNA-Proben und -Kontrollen	42
2.5 Lagerung der Materialien	42
2.6 Mammakarzinom-Zelllinien	43
2.7 Isolation der DNA aus Blutspender- und Patientenplasmaproben	44
2.8 Restriktionsenzym	44
2.9 Methylierungsspezifische <i>Real-Time</i> -PCR	45
3 Ergebnisse.....	53
3.1 Alters- und Geschlechtszusammensetzung von Mammakarzinom-Patienten und Blutspendern	53
3.2 Tumorstadien, Tumorarten und Rezeptorstatus des Patientenkollektivs	54
3.3 Etablierung der quantitativen, methylierungsspezifischen Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR und Auswahl der Promotorregionen durch methylierungsspezifische Diskrimination zwischen nicht methylierten und methylierten DNA-Kontrollen	55
3.4 Ermittlung des Messbereichs für die Promotorregionen <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i> sowie für die internen Referenzgene <i>β-Globin</i> und <i>β-Actin</i>	58
3.5 Festlegung von <i>Cut-Off</i> -Ct-Werten für die methylierungsspezifische Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR mittels Plasmaproben von Blutspendern	61
3.6 Diagnostische Spezifität und Sensitivität der quantitativen, methylierungsspezifischen Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR für <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i>	62
3.7 ROC-Analysen der getesteten Promotorregionen <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i>	66

3.8	Vergleich der Methylierungen von den Promotorregionen <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i> zwischen Mammakarzinompatienten und Blutspendern	68
4	Diskussion	72
4.1	Diagnostische Sensitivität und Spezifität der getesteten Promotorregionen <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i> im Vergleich zu anderen wissenschaftlichen Studien beim Mammakarzinom	74
4.2	Tumorzellinientestung	83
4.3	Klinische Bedeutung zirkulierender Tumor-DNA und Hypermethylierung von Promotorregionen bei anderen Karzinomerkrankungen	84
4.4	Klinische Bedeutung zirkulierender Tumor-DNA im Vergleich zu anderen Biomarkern beim Mammakarzinom	85
4.5	Stärken und Schwächen der angewandten Methode	87
4.6	EDTA-Plasma als geeignetes Ausgangsmaterial und die Präanalytik für die quantitative, methylierungsspezifische Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR	88
4.7	Vor- und Nachteile der Prävention durch die Mammographie und die Gesamtsterblichkeit des Mammakarzinoms	90
4.8	Zusammenhang des Mammakarzinoms mit endogenen und exogenen Faktoren	92
4.9	Fazit und Ausblick	96
5	Zusammenfassung	102
6	Literaturverzeichnis	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel einer Amplifikationskurve einer methylierungsspezifischen Multiplex-PCR für das Gen <i>RASSF1A</i>	47
Abbildung 2: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR für die <i>MAL</i> -Promotorregion	59
Abbildung 3: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR für die <i>RARβ2</i> -Promotorregion	60
Abbildung 4: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR für die <i>RASSF1A</i> -Promotorregion	60
Abbildung 5: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt- <i>Real-Time</i> -PCR für die <i>SOX17</i> -Promotorregion	61
Abbildung 6: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens <i>MAL</i>	63
Abbildung 7: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens <i>RARβ2</i>	64
Abbildung 8: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens <i>RASSF1A</i>	65
Abbildung 9: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens <i>SOX17</i>	66
Abbildung 10: ROC-Kurven der Ct-Mittelwerte der getesteten Promotorregionen von <i>MAL</i> und <i>RARβ2</i>	67
Abbildung 11: ROC-Kurven der Ct-Mittelwerte der getesteten Promotorregionen von <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i>	68
Abbildung 12: Alkoholkonsum	69
Abbildung 13: Nikotinkonsum	70
Abbildung 14: Ethnie	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Tumorstadien des Mammakarzinoms	32
Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms	35
Tabelle 3: Primer und Sondensequenzen der Promotorregionen sowie der internen Referenzgene	41
Tabelle 4: Verdünnungsreihe	50
Tabelle 5: Altersverteilung und Geschlecht des Patientenkollektivs	53
Tabelle 6: Altersverteilung und Geschlecht des Blutspenderkollektivs	54
Tabelle 7: Tumorarten aufgeschlüsselt nach der histologischen Analyse	55
Tabelle 8: Tumorarten aufgeschlüsselt nach dem klinischen Stadium	55
Tabelle 9: Darstellung der Ct-Mittelwerte der Positiv- und Negativkontrolle sowie der Tumorzellinientestung im Vergleich mit und ohne Restriktionsenzym <i>BstUI</i>	57
Tabelle 10: Ct-Mittelwerte, Standardabweichung (SD) und T-Test der Promotor-Regionen <i>DKK3</i> , <i>ESR1</i> , <i>HOXB4</i> , <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i>	58
Tabelle 11: Darstellung der Ct-Mittelwerte der Blutspender, die Standardabweichung (SD), der T-Test und die ermittelten <i>C_{mt}-Off-Ct</i> -Werte der Promotor-Regionen <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i>	62
Tabelle 12: Diagnostische Sensitivität und Spezifität der methylierungsspezifischen <i>Real-Time</i> -PCR für <i>MAL</i> , <i>RARβ2</i> , <i>RASSF1A</i> und <i>SOX17</i>	63

Abkürzungsverzeichnis

ACR	<i>American College of Radiology</i>
APC	Adenomatosis-Polyposis-Coli-Gen
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
BET	Brusterhaltene Therapie
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
BI-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
Bp	Basenpaar(e)
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
BstUI	<i>Bacillus stearothermophilus</i> U458
CEA	karzinoembryonales Antigen
Chr.	Chromosom
CT	Computertomographie
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
CTC	<i>Circulating Tumor Cell</i>
ctDNA	<i>Circulating Tumor DNA</i>
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DKK3	Dickkopf-3-Gen
DNA	<i>Desoxyribonuclein Acid</i>
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESR1	Östrogenrezeptor-1-Gen
FAM	<i>Fluorophor 6-Carboxyfluorescein</i>
Her2/neu	humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2
HOXB4	Homeobox-B4-Gen
Ki-67	Proliferationsmarker
KM	Kontrastmittel
LCIS	Lobuläres Carcinoma in situ
LIN	Lobuläre intraepitheliale Neoplasie
MAL	Myelin-und-Lymphozyt-Protein-Gen
MCa	Mammakarzinom
MGB	<i>Minor-Groove-Binder</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MSP	methylierungsspezifische PCR
MYC	Myelocytomatose-Gen
NST	<i>No Special Type</i>
NTC	<i>Non Template Control</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PgR	Progesteronrezeptor
RAR β 2	All-trans-Retinsäure-Rezeptor <i>beta</i> 2-Gen
RASSF1A	Ras-Assoziationsdomäne Familienmitglied 1, Isoform A-Gen
RKI	Robert Koch-Institut
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
Rpm	<i>revolutrons per Minute</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SOX17	<i>SRY-High Mobility Group Box 17-Gen</i>
TCF	T-Zell-Faktor
TP53	Tumor Protein 53
UICC	<i>Union Internationale Contre Le Cancer</i>
VIC	<i>2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wnt	<i>W</i> für <i>Wingless</i> und <i>nt</i> für <i>Int-1</i>

1 Einleitung

Das Thema dieser Dissertation lautet: „Epigenetische Veränderung von zirkulierender TumordNA im Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Plasma von Mammakarzinompatienten“. Im Folgenden soll definiert werden, was epigenetische Veränderungen sind, warum die Epigenetik in der Pathogenese von Karzinomerkrankungen, speziell beim Mammakarzinom (MCa), so eine wichtige Rolle spielt und weshalb diese Erkenntnis in der Wissenschaft von großem Interesse ist.

In den 1970er und 1980er Jahren wurde die Forschung über die Beziehung zwischen der DNA-Methylierung, Zelldifferenzierung und Genexpression mit der Epigenetik aufmerksam. Man einigte sich auf eine gemeinsame, umfassende Definition der Epigenetik nach Holliday (1994) sowie Wu und Morris (2001), in der die Epigenetik die Untersuchung von Phänomenen, Mechanismen und Veränderungen in der Genexpression beschreibt, die in Organismen mit differenzierten Zellen auftreten und diese während der mitotischen und oder meiotischen Vererbung von gegebenen Mustern der Genexpression unterliegen, welche jedoch nicht auf Unterschiede bzw. Veränderungen in der DNA-Sequenz selbst basieren. Somit wird die Aktivität von Genen gesteuert und beeinflusst (Böcker et al. 2012; Deans und Maggert 2015; Holliday 1994; Holliday und Pugh 1975; Wu und Morris 2001).

Da die Umwelt ebenfalls Einwirkungen auf das Genom sowie Epigenom hat und dieses verändern kann, beeinflusst die Epigenetik die Genregulation, Zelldifferenzierung und Genexpression. Alle intrazellulären Abläufe sind genetisch und epigenetisch bedingt und determiniert. Das Epigenom ist die Gesamtheit der epigenetischen Merkmale einer Zelle, wobei die Vorsilbe „Epi“, griechisch für „darüber“ oder „darauf“ bedeutet. Epigenetische Veränderungen finden ständig statt, beispielsweise in Form von DNA-Methylierung und Histonmodifikation durch Acetylierung. Diese werden während der Mitose und Meiose auf die nächste Zellgeneration weitergegeben und bilden ein Gedächtnis für stattgefundene Ereignisse. Epigenetische Veränderungen sind der Grund dafür, dass aus identischen Erbinformationen multizelluläre Organismen entstehen und sich aus Stammzellen mehr als 200 unterschiedliche Gewebearten bzw. verschiedene Zellentitäten entwickeln können, die jeweils differente Funktionen ausüben. Diese Tatsache zeigt, dass in jeder genetisch gleich aufgebauten Zelle nur ein gewisser Teil unserer über 22.000 Gene abgelesen wird. Der übrige, größte Teil unseres Genoms bleibt jedoch inaktiv, sodass in verschiedenen Gewebearten und Zellen jeweils unterschiedliche Gene aktiv sind, abgelesen bzw. eingeschaltet werden als in anderen (Johnstone und Baylin 2010).

Für diese Dissertation steht die DNA-Methylierung im Fokus. Unter einer DNA-Methylierung versteht man eine chemische Genmarkierung mit folgender Genabschaltung. Dies erfolgt durch das Anhängen von Methylgruppen (-CH₃) an DNA-Basen durch spezifische Enzyme, wie den Methylasen, ohne die Basensequenz zu verändern. Dieser chemische Prozess ist mit Hilfe von Demethylasen reversibel. Damit ist das Epigenom stets variabel und reagiert jederzeit auf Veränderungen. Epigenetische Mechanismen werden von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst, wie beispielsweise durch evolutionärer Weiterentwicklung, Umweltchemikalien, Medikamente, Diäten und auch durch das biologische Altern (Kaiser 2010). Diese Feststellungen über das Zusammenspiel und die Beeinflussung der Umwelt und der Gene zeigt, dass epigenetische Mechanismen bzw. Veränderungen in unserem Genom zur Krankheitsentstehung im Allgemeinen beitragen können. Besonders in der Tumorphagenese und -entstehung liegt diese Theorie nahe, dass fast in allen Tumoren epigenetische Veränderungen zu finden sind (Johnstone und Baylin 2010). Im Vergleich zu gesunden Zellen zeigt das Epigenom von malignen entarteten Zellen tiefgreifende Veränderungen von DNA-Methylierung- sowie Histonmodifikationsmustern (Rodríguez-Paredes und Esteller 2011).

Da maligne Erkrankungen einen erheblichen Anteil der Erkrankungen in Deutschland ausmachen und somit eine häufige Todesursache darstellen, liegt der Fokus in diversen Studien darauf Mutationen oder Promotorhypermethylierungen in zirkulierenden zellfreien DNA-Strukturen zu detektieren um die Tumorphagenese, -metastasierungsverhalten und -regression besser verstehen zu können. Eine Stratifizierung der Tumorthherapie erfolgt vorwiegend nach Untersuchung der Tumorphistologie, der Tumorgöße, der Untersuchung von Lymphknoten sowie der Suche bzw. dem Ausschluss von Tumormetastasen. In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Biomarker im Tumorgewebe beschrieben worden, die eine Personalisierung der Tumorthherapie theoretisch ermöglichen könnten. Jedoch werden nur wenige Biomarker heutzutage zur Stratifizierung der Tumorpatienten im klinischen Alltag eingesetzt (Schwarzenbach et al. 2011a).

Frei zirkulierende tumorassoziierte Nukleinsäuren, die im Rahmen einer Blutentnahme gewonnen werden können, sind auch bekannt als eine sogenannte *liquid biopsy*, englisch für flüssige Biopsie. Mit Hilfe von PCR-Verfahren wird versucht spezifische Mutationen, Hyper- oder Hypomethylierungen von tumorassoziierten Genen aus zirkulierender zellfreier DNA, die aus unterschiedlichen Probenmaterialien gewonnen werden kann, nachzuweisen. Es kann zwischen tumorassoziierten Mutationen und epigenetischen Veränderungen unterschieden werden. Zu den epigenetischen Veränderungen zirkulierender Nukleinsäuren zählen Veränderungen der Methylierung von Genen, die für bestimmte Tumoren typisch sind. Eine Hypermethylierung der Promotorregion eines Tumorsuppressorgens führt zu einer Störung der

Tumorsuppressorfunktion und ist wahrscheinlich an Tumorgenese und/oder Tumorwachstum beteiligt. Bei Patienten mit malignem Melanom ist in ca. 70 % der Fälle die *BRAF*-Mutation *V600E* nachweisbar. Bei diesen Patienten kann die Untersuchung der *BRAF*-Mutation *V600E* in zirkulierenden Nukleinsäuren zur Personalisierung der Therapie beitragen. Bei kolorektalen Karzinomen wurde beispielsweise eine Hypermethylierung von Genen wie *APC*, *RUNX3*, *SDC2* und *SEPT9* bereits in klinischen Studien untersucht (Schwarzenbach et al. 2011a).

Beim malignen Melanom wurden methyliertes *RASSF1A* und *RARβ2* als Tumormarker beschrieben (Alix-Panabieres et al. 2012), beim Pankreaskarzinom wurde die Hypermethylierung von *ADAMTS1*, *BNC1*, *NPTX2*, *RUNX3* (Park et al. 2012; Yi et al. 2013) und beim Mammakarzinom wurde eine Hypermethylierung von den Genen *APC*, *RASSF1A*, *SFRP1*, *CST6*, *GSTP1*, *ESR1*, *MAL*, *SOX17* und *RARβ2* (Alix-Panabieres et al. 2012; Schwarzenbach 2013) sowie von *DKK3* (Kloten et al. 2013) und *HOXB4* (Benezeder et al. 2017) beschrieben.

1.1 Überblick über die epidemiologischen Daten zu Krebs und dem Mammakarzinom

Weltweit sind im Jahr 2015 8,7 Millionen Menschen an einer bösartigen Tumorerkrankung gestorben, während 17,5 Millionen an einer erkrankt sind. In den Jahren 2005 bis 2015 stieg somit die absolute Zahl der Krebserkrankungen um 33 % an. Global betrachtet, erkranken Männer am häufigsten an Prostatakrebs (1,6 Millionen) und versterben am häufigsten an Lungenkrebs. Die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau ist das Mammakarzinom mit 2,4 Millionen Erkrankten weltweit und ebenfalls die häufigste malignombedingte Todesursache der Frau (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. 2017).

In Deutschland starben 2016 insgesamt ca. 230725 Menschen an Krebs. National betrachtet war das Mammakarzinom die häufigste, malignombedingte Todesursache der Frau mit 17670 Todesfällen im Jahr 2014. So ergibt sich statistisch betrachtet, dass jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs erkrankt. Mammakarzinome treten am häufigsten zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr auf, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei 64 Jahren liegt. Statistische Erhebungen zeigen, dass die Mehrheit, der an Mammakarzinom verstorbenen Patientinnen, erst im höheren Alter erkrankten und der Krankheit erlagen. So waren 2014 63 % von ihnen 70 Jahre oder älter. Die Zahl der Brustkrebs-Letalitätsfälle ist in diesem Zeitraum jedoch nahezu gleichgeblieben. In Deutschland beliefen sich die Neuerkrankungszahlen im Jahre 2014 auf 226960 für Frauen und 249160 für Männer an einem malignen Krebsleiden zu erkranken. Betrachtet man nur das Mammakarzinom, so erkrankten 650 Männer und 69220 Frauen in der

Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2014 daran, was einer Inzidenz von 114,6 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen ausmacht. Beim männlichen Geschlecht ist die Inzidenz mit 1,1 Neuerkrankungen pro 100.000 Männer angegeben und tritt daher nur bei ca. jedem hundertsten Mann auf. Die Mortalität beim männlichen Geschlecht beläuft sich 2013 auf 156 und 2014 auf 134 Fälle (Barnes et al. 2016; Robert Koch-Institut 2017). Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt beim Mann bei 71 Jahren. Die Erkrankung tritt vor allem in den Lebensjahren 65 bis 79 auf, was ein generell höheres Lebensalter darstellt und damit im Durchschnitt zehn Jahre später als es bei Frauen zu verzeichnen ist (Fentiman et al. 2006). Beim Mann wird das Mammakarzinom statistisch oft erst in einem höheren Stadium erkannt, da es im Gegensatz zur Frau kein Früherkennungsscreening für den Mann gibt. Zudem ist das seltene Auftreten des männlichen malignen Brusttumors ebenfalls ein Grund, dass dieser häufig spät diagnostiziert wird (Ruddy und Winer 2013). Die weiteren Risikofaktoren, die Symptome, das Wachstums- sowie Metastasierungsverhalten, das Staging, die TNM-Klassifikation, die Therapie- und die Nachsorgemöglichkeiten des Mammakarzinoms des Mannes entsprechen denen des Mammakarzinoms bei der Frau, da die Studienlage eine gesonderte und dem männlichen Geschlecht zugeschnittene Leitlinie bis jetzt noch nicht ermöglichen konnte (Doebar et al. 2017; Ruddy und Winer 2013).

1.2 Risikofaktoren des Mammakarzinoms

Der Brustkrebs tritt zufällig auf, jedoch gibt es aber sowohl genetische als auch erworbene Risikofaktoren. Die Risikofaktoren werden zudem noch in hormonelle, sonstige und hereditäre unterschieden. Unter dem Begriff der hormonellen Risikofaktoren fallen ein lang andauernder, hormonell aktiver Zeitraum, wie eine frühe Menarche und eine späte Menopause, Adipositas, besonders eine Gewichtszunahme nach dem 18. Lebensjahr oder postmenopausal, sowie eine Hormonersatztherapie (HET) in der Postmenopause, wenige beziehungsweise keine Schwangerschaften sowie keine oder kurze Stillzeiten. Es existieren außerdem prädisponierende Läsionen, zu denen mit absteigender Entartungstendenz, das duktales sowie lobuläres in-situ-Karzinom (DCIS, LCIS), der Morbus Paget, die Mastopathie Grad II und III, die Fibroadenome sowie Milchgangspapillome zählen (Böcker et al. 2012; Geyer et al. 2017). Zu den sonstigen Risikofaktoren gehören zunehmendes Alter, hohe Brustgewebedichte, Karzinome der kontralateralen Mamma, Ovarial-, Endometrium- oder kolorektale Tumorerkrankungen in der eigenen Krankheitsgeschichte, Nikotinabusus, Makromastie, Diabetes mellitus, vermehrter Alkoholkonsum sowie ionisierende Strahlungsexposition der Brust in der Vorgeschichte des Patienten (Sun et al. 2017). Ca. zehn Prozent der Mammakarzinomerkrankungen sind

hereditärer Genese, jedoch kann man nur bei einer von 500 Frauen eine genaue, pathogenetisch verantwortliche Mutation finden und nachweisen. Zudem unterscheidet man Gene, die mit einem hohen, mittleren und niedrigen Risiko einhergehen, an einem Mammakarzinom zu erkranken. An der Pathogenese beteiligte Gene bei der Entstehung des Mammakarzinoms mit hoher Penetranz sind die Gene *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) und *BRCA2* (*Breast Cancer 2*), *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*), *TP53* (Tumor Protein 53), *STK11* (Serine/Threonine Kinase 11), *CDH1* (E-Cadherin) und *FANCO* (*Fanconi Anemia complementation group o*). Zu den Genen mit mäßiger und niedriger Penetranz gehören *CHEK2* (*checkpoint kinase 2*), *TGFβ1* (*transforming growth factor beta 1*), *CASP8* (Caspase 8), *BRIP1* (*BRCA1-Interacting Protein 1*), *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2*), *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*), *FGFR2* (*fibroblast growth factor receptor 2*), *ATM* (*Ataxia teleangiectatica mutated*) und *RB1* (Retinoblastom 1) (Mangia et al. 2011; Meindl et al. 2010; Thomssen und Wand 2012). Ein weiterer hereditärer Risikofaktor ist die Erkrankung von Verwandten ersten Grades. Auch genetische syndromale Erkrankungen, wie das Li-Fraumeni-Syndrom (*p53*- Mutation), das Peutz-Jeghers-Syndrom, einer Mutation im Gen *STK11* und das Cowden-Syndrom, einer *PTEN*-Genveränderung bürgen ein erhöhtes Risiko an Brustkrebs zu erkranken und stehen so im engen kausalen Zusammenhang mit dem Mammakarzinom. (Gage et al. 2012; Stratton und Rahman 2007; Sun et al. 2017). Die Pathogenese des männlichen Mammakarzinoms liegt vorwiegend an einer bestehenden Hyperöstrogenämie, die durch genetische Ursachen bedingt sein kann, wie beispielsweise dem Klinefelter-Syndrom, bei dem der Mann zu seinem Y- ein oder mehrere zusätzliche X-Chromosome besitzt, was zu einem zwanzig- bis sechzigfach erhöhtem Brustkrebsrisiko führt. Aber auch durch den verminderten bzw. gestörten Östrogenabbau infolge einer Leberzirrhose oder chronischen Hepatitis kann es zur Entstehung eines Mammakarzinoms beim Mann kommen. Eine weitere Ursache kann ein östrogenproduzierendes Karzinom im Körper sein, aber auch eine Östrogentherapie bei vorherigem Prostatakarzinom des Mannes kann zu einem erhöhten Östrogenspiegel im Organismus führen. Weitere geschlechtsspezifische Risikofaktoren, die zur Entstehung des Mammakarzinoms beim männlichen Geschlecht führen können, werden diskutiert. Diese spielen ebenfalls eine Rolle im Östrogenhaushalt, wie zum Beispiel ein Hodenhochstand, frühere stattgefundene Orchitis, Epididymitis sowie eine Gynäkomastie (Doebar et al. 2017; Ruddy und Winer 2013). Bei der Transformation von Mammaepithelzellen zu Karzinomstammzellen kommt es also zu genetischen Veränderungen. Diese veränderten Gene weisen dann Funktionsstörungen auf und können so beispielsweise die Proliferation von Zellen beeinflussen. Auch DNA-Reparaturgene, Onko- und Tumorsuppressorgene, Regulationsgene in der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, Wachstumsgene, Enzymaktivitäten regulierende Gene sowie Gene, die die Tumormotilität beeinflussen, können beeinträchtigt sein (Remmele et al. 2012).

1.3 Pathogenese und beteiligte Gene bei der Entstehung des Mammakarzinoms

Die genetischen Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen *BRC A1* (Chromosom, Chr. 17) und *BRC A2* (Chr. 13), welche autosomal-dominant vererbt werden, weisen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung besonders von Mamma- und Ovarialkarzinomen auf, jedoch auch für andere Malignome, wie beispielsweise für das Kolon-, Pankreas- und Prostatakarzinom (Lee et al. 2017). Genetische Mutationen in den *BRC A*-Genen sind bei ca. 5-10 % der Brustkrebspatienten nachweisbar. Diese Patienten haben ein bis zu 80 %-iges Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken. Zudem liegt der Erkrankungszeitpunkt ca. 15-20 Jahre früher als bei Patienten ohne dieses genetisch bedingte, familiäre Risiko. Bei diesen genmutierten Karzinomen der Mamma handelt es sich häufig um Hormonrezeptor-negative Tumore (Antoniou et al. 2003; Gage et al. 2012).

Silvestri et al. (2016) beschrieb, dass durch genetische *BRC A1*- und -2-Mutationen ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko beim Mann gegenüber der Allgemeinbevölkerung besteht sowie dass es zu einem verfrühten Auftreten schon im Alter von 55 bis 60 Jahren beim Mann komme. Eine *BRC A2*-Mutation tritt circa bei 10 % der männlichen Brustkrebstumore auf. Neben der positiven Familienanamnese, die etwa ein zweieinhalbfach erhöhtes Erkrankungsrisiko mit sich bringt, kann man speziell bei männlichen Mammakarzinomen eine *CHEK2*-1100delC-Mutation finden, die in ca. 9 % aller männlichen Brustkrebstumoren vorkommt. Wenn diese vorliegt, besteht eine ca. zehnfach erhöhte Auftrittswahrscheinlichkeit von einem Mammakarzinom des Mannes in Bezug zur Normalbevölkerung (Bartkova et al. 2005).

1.4 Tumorentstehung und Kanzerogenese der Mamma auf Genebene

Wie aus gesunden Zellen entartete Zellen werden, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Doch Grundlage einer jeden Tumorzelle ist oft ein genetischer Schaden. Dieser kann durch diverse Ursachen entstanden sein, wie beispielsweise durch Punktmutationen, Translokationen oder Amplifikationen. Auch diese genetischen Veränderungen können durch unterschiedlichste Mechanismen entstanden sein, durch sogenannte Mutagene und Kanzerogene, welche dann direkt oder indirekt zu einem genetischen Schaden in den vorhandenen Zellen führen. Diese Phase in der Kanzerogenese ist die Initiationsphase. Die Folge eines solchen DNA-Schadens ist oftmals die Aktivierung von Protoonko- bzw. die Abschaltung von Tumorsuppressorgenen, die in jeder Zelle vorhanden sind. In der Tumorentstehung kann es eine Latenzphase geben, die bis zu Jahrzehnten andauern kann und in der weder Wachstum noch weitere Entartungsprozesse

geschehen. Während der Promotionsphase kommt es durch verschiedene Reize oder Akkumulation von Stoffen, Hormonen oder Mutagenen zu einer weiteren genetischen Veränderung in der schon initial geschädigten Zelle. Ab diesem Zeitpunkt kommt es dann zur Progression, was die komplette Entartung der Zelle meint und zur klonalen Expansion führen kann (Hanahan und Weinberg 2000). Im Epithel der Mamma existieren Gewebestammzellen, die sich innerhalb von Gewebsnischen befinden, um die Mammarydrüse aufrechtzuerhalten, da sie unter kontinuierlichen Auf-, Um- und Abbauprozessen steht. Die Gemeinsamkeit von Stammzellen und Karzinomzellen ist die beinahe endlose Proliferationskapazität, weshalb man unter anderem davon ausgeht, dass Karzinomzellen sich nicht nur aus differenzierten Zellen sondern auch aus teilungsfähigen Zellen gesunder Epithelien entwickeln (Sun et al. 2017).

1.4.1 Myelocytomatose-Gen (*MYC*)

Das Protoonkogen *MYC*, welches auf Chr. 8q24 liegt, wird durch Amplifikation aktiviert und somit zum Onkogen. Dieser Transkriptionsfaktor ist am Zellwachstum und der Zelldifferenzierung beteiligt und fördert die Proliferation und Immortalisierung von Tumorzellen, weshalb man diese genetische Auffälligkeit im *MYC*-Gen bei stark proliferierenden Mammakarzinomen mit schlechter Prognose findet, was einem Anteil von ca. 20 % aller genetisch bedingten Karzinome der Mamma ausmacht. Zudem wird die Expression des Transkriptionsfaktors durch viele Signaltransduktionswege aktiviert, wie unter anderem durch die *Wnt*-, die *Shh*- und die *MAPK/ERK*-Signalkaskade, welche ganz gezielt die Proliferation von Zellen steuern (Dang 2013).

1.4.2 Tumorsuppressorgen 53 (*TP 53*)

Durch Mutation oder Deletion kommt es zur Inaktivierung dieses Tumorsuppressorgens, welches auf dem Chr. 17p13 liegt und das Protein *p53* codiert. Das *TP53*-Gen ist auch als „Wächter des Genoms“ bekannt, da es die Apoptose von alten Zellen einleitet sowie das *14-3-3-σ*-Gen aktiviert, welches im Zusammenspiel mit dem *TP53* dafür sorgt, dass eine Zelle nach einer DNA-Schädigung nicht in die G0-Phase übergeht und sich nicht weiter teilt. Diese Genveränderung ist ebenfalls bei ca. 20 % der Mammakarzinompatienten zu detektieren und wird autosomal dominant vererbt (Mangia et al. 2011; Meindl et al. 2010).

1.4.3 Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2 (*Her2/neu*)

Das Protoonkogen *erbB2neu*, auch als *Her2/neu* bekannt, welches auf dem Chr. 17q12 lokalisiert ist, codiert ein 185 kD schweres transmembranöses Glykoprotein, das als humaner epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor vom Tyrosinkinase-Typ fungiert. Ca. zwanzig Prozent der Patienten

mit einem Mammakarzinom zeigt eine Amplifikation bzw. Überexpression des *Her-2/neu*-Proteins, weshalb dieser Wachstumsfaktorrezeptor auch als prognostischer Faktor dient und entscheidend für die Therapie ist. Dieses Onkogenprodukt stimuliert durch Homo- und Heterodimerisierung das Tumorzellwachstum, die Tumormotilität und -invasion ohne einen entsprechenden Liganden zu benötigen. Das Vorliegen der Überexpression bzw. Amplifikation des *Her2/neu*-Proteins wird mittels einer FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) am histologischen Untersuchungspräparat festgestellt. So können Mammakarzinompatienten, die *Her2/neu* positiv sind mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab gezielt therapiert werden, da dieser Antikörper zu einer Inaktivierung der Signaltransduktionskaskade des *Her2/neu*-Proteins führt. Diese wird in 10 % bis 34 % der invasiven Brustkrebsarten berichtet. Sowohl eine Amplifikation und Über- sowie Oberflächenmembranproteinexpression des *Her2/neu*-Gens sind in mehr als 90 % der Fälle vorhanden. Die Gegenwart des *Her2/neu* korreliert mit einer schlechteren Prognose bei jedem gegebenen Stadium des Mammakarzinoms (Olayioye 2001; Sotiriou und Pusztai 2009). In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Biomarker im Tumorgewebe beschrieben worden, die möglicherweise als Screeningmarker in der Prävention eines Karzinoms, eine Personalisierung der Tumorthherapie oder eine Rezidiverkennung theoretisch ermöglichen könnten. Jedoch werden nur wenige genetische Biomarker heutzutage zur Stratifizierung der Tumorpatienten im klinischen Alltag eingesetzt (Schwarzenbach et al. 2011b).

Beispiel hierfür ist das *Her2/neu* beim Mammakarzinom, was erhebliche Bedeutung in der Festlegung des Stagings sowie therapier regimeentscheidend ist (Wöckel et al. 2018b).

1.5 Epigenetische Mechanismen des Mammakarzinoms

Ein weiterer Ansatz der Forschung stellt aktuell die Epigenetik dar, die mit Veränderung in Form von DNA-Hyper- und/oder Hypomethylierungen an der Karzinomentstehung beteiligt ist. Diese Erkenntnis hat enorme Bedeutung und nimmt großen Einfluss auf die Erforschung der Karzinogenese (Johnstone und Baylin 2010).

Bei malignen Entartungen findet die Methylierung der DNA in ganz spezifischen Bereichen statt, in den sogenannten *CpG-Islands*, die aus der Base Cytosin und Guanin besteht. Diese Basen sind im ganzen Genom zu finden, jedoch gibt es auch Bereiche, in denen sie gehäuft vorkommen. Diese zwei DNA-Basen sind durch eine Phosphodiesterbindung mit einander verknüpft, sodass nach jedem Cytosin ein Guanin folgt. Tritt dies mehrmals hintereinander auf so spricht man von *CpG-Islands*, die oftmals in genregulierenden Abschnitten vorkommen. Physiologisch liegen *CpG-Islands* unmethyliert vor (Bird 2002). Bei einer Vielzahl von Karzinom-erkrankungen

findet man neben DNA- und Chromosomenmutationen Veränderungen dieser *CpG-Islands*. *CpG-Islands* weisen Cytosin-Guanin-Dinukleotide mit einer bis zu zwanzigmal höherer Frequenz auf als sie in dem restlichen Genom auftreten und befinden sich in einem Abschnitt 0,5-2 kb um den Transkriptionsstartpunkt herum. Der GC-Gehalt in diesen Bereichen beträgt ca. 60 % im Vergleich zum Gesamtgenom (40 %) (Bird 1986; Gardiner-Garden und Frommer 1987; Summers et al. 2013). Essentiell für das Verständnis der Epigenetik und die Pathogenese von Erkrankungen ist die Analyse der Verteilungsmuster der *CpG-Islands* und deren spezifischen Methylierung im menschlichen Körper (Fransquet et al. 2018; Ginder und Williams 2018).

Bei einer Methylierung erfolgt die Bindung von einer Methylgruppe an das fünfte C-Atom des Cytosins durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT). Die Aufgabe der DNMT1 ist es während des Zellzyklus für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Methylierungsstatus zu sorgen (Bestor 2000; Hermann et al. 2004). DNMT3A und DNMT3B sind verantwortlich für eine de novo-Methylierung. Dabei wird unmethylierte DNA erstmalig methyliert (Bestor 2000; Kelly und Trasler 2004). Die Funktion der DNMT2 ist noch nicht gänzlich geklärt, jedoch weist sie nur eine geringe Aktivität auf (Hermann et al. 2004). Damit eine DNA-Methylierung stattfinden kann, ist das Vorhandensein von Methylgruppen-Donoren nötig. Das S-Adenosylmethionin (SAM) ist ein solcher Methylgruppen-Donor, das aus der Aminosäure Methionin entsteht. Bei diesem Methylierungsschritt wird SAM zu S-Adenosyl-homocystein umgewandelt (Loenen 2006).

Hypermethylierungen in Promotorbereichen von Genen führen oft zu einer verminderten Genexpression, die mit einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen einhergehen kann. Wo hingegen eine Hypomethylierung oft zu einer vermehrten Expression von Genen führt, im Speziellen kann es dabei zur Aktivierung von Onkogenen kommen (Bhaumik et al. 2007; Bird 2002; Cheung et al. 2009; Johnstone und Baylin 2010). Eine maligne Entartung kann dabei sowohl als Folge einer zu starken Methylierung von DNA-Bereichen entstehen, als auch bei erniedrigten Methylierungsgrad. Oftmals hemmt ein hypermethylierter DNA-Abschnitt Transkriptionsfaktoren oder Enzyme. Die Folge kann dann eine Aktivitätsinhibierung von regulatorischen Genen sein, die sich ebenfalls auf ein benachbartes Gen auswirkt (Daura-Oller et al. 2009). Man spricht dann vom sogenannten Gen-*Silencing*, Geninaktivierung (Kondo und Issa 2004). Da die Analyse von Tumorgewebe oftmals erst nach invasiver Probenentnahme gelingen kann, verfolgt man das Vorhaben zirkulierende tumorassoziierte Nukleinsäuren im Blut nachweisen zu können. Für diese wissenschaftliche Arbeit zur Detektion tumorassoziiierter Hypermethylierungen aus zirkulierender Tumor-DNA im EDTA-Plasma unter Anwendung einer methylierungsspezifischen, quantitativen Real-Time-PCR wurden nach einer Literaturrecherche die epigenetischen Tumormarker *APC*, *ESR1*, *DKK3*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* für

die experimentelle Analyse ausgewählt. Für die Literaturrecherche wurden die Datenbank *PUBMED* verwendet und in dem Zeitraum von Oktober 2014 bis Januar 2015 auf die zum Thema passenden Publikationen durchsucht.

1.5.1 Adenomatosis-Poliposis-Coli-Gen (*APC*)

Das *APC*-Gen, welches auf dem Chr. 5 lokalisiert ist, kodiert ein Tumorsuppressorprotein, das aus 2843 AS besteht, 6,6 kb lang ist und ein Gewicht von 311,6 kDa ausmacht. Das codierte Protein des *APC*-Gens ist ein wichtiger Bestandteil des β -Catenin-Abbaufunktion. Das *APC*-Genprodukt weist Domänen für diverse unterschiedlicher Proteine auf, einschließlich für β -Catenin, Axin, CtBP (*C-terminal-binding protein 1*), Asefs (*APC*-stimulierten Guaninnukleotid-Austauschfaktoren), *IQGAP1* (IQ-Motiv enthaltende GTPase-aktivierendes Protein 1), *EB1* (Mikrotubuli-Plusende-bindendes Protein 1) und Mikrotubuli. Die Abkürzung *APC* steht dabei für Adenomatosis-Poliposis-Coli und wurde erstmals bei einem bestimmten Typ von einem Kolonkarzinom mutiert vorgefunden. Ein kompletter Verlust bzw. die Mutation des beschriebenen Gens löst die Erkrankung der familiären Adenomatosis-Poliposis-Coli (*FAP*) aus, was die enorme Ausbildung von Polypen im Kolon und Rektum zur Folge hat. So führen unter anderem *APC*-Mutationen zu diversen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Gardner- sowie Turcot-Syndrom, aber auch Neoplasien wie das Kolonkarzinom, Medulloblastom, hepatozelluläre Karzinom und Mammakarzinom sind mit einer abnormalen *APC*-Funktion assoziiert (Aoki und Taketo 2007; Friedrich und Kullmann 2003; Hamilton et al. 1995; Nagase und Nakamura 1993). Die Änderung des DNA-Methylierungsstatus stellt eine der häufigsten molekularen Veränderungen in Neoplasien dar. So liegt auch das *APC*-Gen hypermethyliert bei Mammakarzinompatienten vor und kann als möglicher epigenetischer molekularer Früherkennungsmarker genutzt werden. So zeigt die Arbeit von Swellam et al. 2015, dass in Mammakarzinomserumproben eine *APC*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 93,4 % bei einer Spezifität von 95,4 % nachzuweisen war. Auch die Testung von van der Auwera et al. (2009) beschrieb, dass bei Mammakarzinompatienten im Serum (n = 80) eine *APC*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 29 % bei einer Spezifität 95 % (n = 20) vorlag.

Im gesunden Organismus geht das *APC*-Protein zusammen mit dem Stabilisierungsprotein Axin und der Proteinkinase *GSK-3 β* eine Proteinkomplexbindung ein, welcher β -Catenin bindet und so die Ubiquitinierung und den Abbau des β -Catenins im Proteasom bewirkt. Die Mutation dieses Tumorsuppressorgens führt dazu, dass seine Beteiligung im β -Cateninabhängigen (kanonischen) *Wnt*-Signaltransduktionsweg gestört ist, die Affinität des β -Catenins zum Degradationskomplex dadurch vermindert ist und daher der β -Catenin-Abbau nicht oder nur inkomplett erfolgen kann. Daher kommt es zur Akkumulation des Proteins β -Catenin im

Zellkern, wo dieses mit dem T-Zell-Faktor (TCF) und Mitgliedern der *LEF* (*lymphoid enhancer binding protein Factor*)-Familie interagiert und die Transkription von Zielgenen begünstigt (Logan und Nusse 2004). Diese pathologische β -Catenin-Ansammlung im Nukleus bewirkt eine unkontrollierte, maligne Zellproliferation, was einem ständigen *Wnt*-Signal gleichkommen würde. Weitere Funktion des *APC*-Proteins sind die Stabilisierung und Polymerisation der Mikrotubuli sowie die chromosomale Segregation, indem das *APC*-Gen die Regulation der Kinetochorfunktion steuert (Dikovskaya et al. 2007; Wen et al. 2004). Ist das beschriebene Gen pathologisch verändert, so führt dies zur Instabilisierung von Chromosomen. Eine Beteiligung an Zelladhäsionsprozessen und in Zellmigrationsvorgängen wird ebenfalls beschrieben (Aoki und Taketo 2007; Dikovskaya et al. 2007).

1.5.2 Dickkopf-3-Gen (*DKK3*)

Das Dickkopf-3-Gen (*DKK3*), liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 und kodiert ein 38 kDa schweres, aus 350 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein, welches aus der Dickkopf-Familie stammt und so ein Dickkopf-verwandtes Protein 3 im humanen Organismus verkörpert (Krupnik et al. 1999; Niehrs 2006).

Die menschliche *DKK*-Familie besteht aus den unterschiedlichen Proteinen *DKK-1*, *DKK-2*, *DKK-3* und *DKK-4* und einem *DKK-3*-verwandten Protein namens Soggy (Sgy), welchem jedoch die cysteinreichen Regionen fehlen. Diese verschiedenen *DKK*-Proteine unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau, in ihrem Expressionsmuster und in der Fähigkeit den *Wnt*-Signalweg zu beeinflussen. Das *DKK3*-Protein weist zwei cysteinreiche Regionen am C- und N-Terminus auf und ist an der embryonalen Entwicklung durch seine spezifische Interaktion mit dem *Wnt*-Signalweg beteiligt. Die gebräuchlichsten Synonyme für das Dickkopf-verwandte Protein 3 sind *RIG* (*regulated in glioma*) bzw. *REIC* (*reduced expression immortalised cells*). Da die Expression von *DKK3* in einer Vielzahl von Tumorarten bzw. -zelllinien verringert ist, trifft auf *DKK3* wohl die Bezeichnung Tumorsuppressorgen zu (Veeck et al. 2008). Zudem unterdrückt *DKK3* das Tumorzellwachstum (Krupnik et al. 1999; Leonard et al. 2017). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Karzinomarten *DKK3* hypermethyliert vorliegt, insbesondere auch beim Mammakarzinom (Kobayashi et al. 2002; Krupnik et al. 1999; Nusse 2005). Kloten et al. (2013) zeigte, dass in der Untersuchung von 112 Mammakarzinomserumproben eine *DKK3*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 33 % bei einer Spezifität von 99 % (n = 102) sowie 100 % (n = 20) bei Testung von Patienten mit einer benignen Mammaerkrankung vorlag. Außerdem lag bei 87 % (n = 112) eine *DKK3*-Hypermethylierung im Mammakarzinomgewebe der Testgruppe vor (Kloten et al. 2013). Eine *Wnt*-Signalweg modulierende Funktion des *DKK3* und des entsprechenden Dickkopf-verwandten Proteins 3 wird für unterschiedliche maligne

Erkrankungen, wie dem Gliom (Mizobuchi et al. 2008), Prostata- (Kawano et al. 2006), Lungen- (Yue et al. 2008) und Mammakarzinom (Zhou et al. 2014) beschrieben. So ist das *DKK3*-Protein ein Antagonist in der *Wnt*- β -*Catenin*-Signalkaskade, indem die C-terminale Domäne des *DKK*-verwandten Proteins 3 die Interaktion der Co-Rezeptoren des *Wnt*-Signalwegs *LRP5* und *6* (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) mit dem *Wnt*-Signalmolekül hemmt (Krupnik et al. 1999; Luu et al. 2004). Die *Wnt*-Signalwege gehören zu einer Gruppe der zellulären Signaltransduktionewege, die mithilfe von spezifischen Liganden und den entsprechenden Zelloberflächenrezeptoren aktiviert werden. Es werden drei unterschiedliche *Wnt*-Signalübertragungswege in der Literatur beschrieben und zwar der kanonische *Wnt*-Signalweg (*Wnt*- β -*Catenin*-Weg) und zwei nicht-kanonische, d.h. β -*Catenin*-unabhängige Signalwege, zu denen der planare Zellpolaritäts-Signalweg und der *Wnt*-Kalzium-Signalweg zählen. So hat dieser wichtige Stoffwechselweg seinen Namen aufgrund des zuerst entdeckten Signalproteins *Wnt* Roel Nusse 1982 aus einer aus 19 Genen bestehenden *Wnt*-Familie (Nusse und Varmus 2012). Die Abkürzung *Wnt* ist einer Kombination aus dem erstmalig entdeckten Protagonisten *wingless* (*wg*), benannt nach der flügellosen Taufliege *Drosophila melanogaster*, die aufgrund einer Mutation im *wingless*-Gen keine Flügel hatte, und dem *Int-1*, welches heute als das *Wnt1*-Gen bekannt ist. Ist das *Wnt1* aktiviert, so kann es bei Mäusen die Brustkrebsentstehung fördern (Nusse 2005).

Die Proteinmitglieder des *Wnt*-Signalweges, welche als Signalmoleküle fungieren, spielen eine große und entscheidende Rolle in diversen zellulären Abläufen sowie Stoffwechselvorgängen besonders in der embryologischen Entwicklung und in der Karzinogenese. Daher ist der *Wnt*-Signalweg ein wichtiger Bestandteil in der Embryogenese und ist an der Regulierung vieler embryologischer Vorgänge beteiligt, wie beispielsweise der Entstehung von Segmentpolaritäten, Körperachsen sowie Organen (Knochen, Herz, Muskel) und diversen Zellaktivitäten. Im gesunden erwachsenen Organismus ist der *Wnt*-Signalweg generell inaktiv. In diversen Karzinomzellen bzw. in der Pathogenese von Karzinomentstehungen konnte jedoch eine Aktivierung bzw. Reaktivierung des *Wnt*-Signalweges beobachtet werden. Eine weitere molekulare Funktion des *DKK3*-Proteins wird diskutiert in Bezug auf die Bildung eines Proteintrikomplexes mit den Proteinen *Kremen1* und *2* an der Zellmembran, welcher die Internalisierung der *Wnt*-Co-Rezeptoren *LRP5* und *6* fördert (Nusse 2005).

Die intrazelluläre Interaktion des *DKK3* codierenden Proteins mit dem Protein β -*TrCP1*, welches Mitglied der F-Box-Familie ist, erleichtert den Abbau des β -*Catenins*. Die Bindung des β -*TrCP1*, welche eine spezifische β -*Transducin*-Ligase (β -*transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) darstellt, führt zu Ubiquitinierung und anschließendem Abbau von Substraten in Proteasomen (Lee et al. 2009).

Eine häufige tumorbedingte epigenetische Veränderung in der humanen Mammakarzinomentstehung ist die Methylierung und die damit verbundenen Herabregulierung der *DKK3*-Proteinexpression, was eine weitere Bestätigung der Annahme ist, dass das *DKK*-verwandte Protein 3 eine antagonisierende Wirkung auf dem β -*Catenin*-unabhängigen *Wnt*-Signalweg hat und somit ursächlich an der Entstehung von Mammakarzinomen beteiligt ist (Nusse 2005).

1.5.3 Östrogenrezeptor-1-Gen (*ESR1*)

Das *ESR1* (*estrogen receptor 1*), welches auf dem Chromosom 6 lokalisiert ist, kodiert einen Östrogenrezeptor 1 dessen Primärstruktur aus 596 Aminosäuren besteht. Östrogenrezeptoren bestehen chemisch aus dem Steroidgrundgerüst und gehören demzufolge zu der Klasse der Steroidrezeptoren, die wiederum zu der Großfamilie der nukleären Rezeptoren (*NR*, *nuclear receptor*) gezählt werden und von dem Hormon Östrogen aktiviert werden (Dahlman-Wright et al. 2006). Der *ES*-Rezeptor-1 hat somit auch diverse Synonyme, wie beispielsweise *ER*, *ESR*, *ESRA* (*estrogen receptor alpha*) oder auch *NR31* (*nuclear receptor subfamily 3, group 1*). Man konnte bisher zwei humane Rezeptorsubtypen (*ESR alpha* und *beta*) identifizieren, die beide den gleichen strukturellen Aufbau zeigen, sich jedoch funktionell unterscheiden. So zeigen die Östrogenrezeptoren *alpha* und *beta* eine unterschiedliche Gewebeverteilung und Ligandenaktivierung sowie interagieren sie bei der Genaktivierung in verschiedener Weise. Biochemisch ist der *ER* ein DNA-bindender Transkriptionsfaktor, der aus sechs Domänen (A-F) aufgebaut ist. Die A/B-Domäne besitzt eine Transkriptionsaktivierungsfunktion, die ligandenunabhängig ist (AF-1). Die DNA-Bindungsdomäne, welche zwei Zinkfingerregionen beinhaltet, wird als C-Domäne bezeichnet. Die D-Domäne ist die sogenannte Dimerisierungsregion, die E/F-Domäne hat die Ligandenbindungsfunktion inne und hat einen Transaktivierungsbereich am C-Terminus aufzuweisen. So kann man zusammenfassen, dass der komplexe Aufbau des Östrogenrezeptors 1 für die spezifische Hormonbindung des Östrogens, die intrazelluläre DNA-Bindung sowie die Aktivierung der Transkription wichtig ist. Östrogene haben diverse Funktionen und Aufgaben in unserem Körper und das in unterschiedlichen Systemen, wie beispielsweise im ossären Stoffwechsel (Knochenwachstum und -reifung), humoralen Immun- und zentralen Nervensystem sowie im kardiovaskulärem und besonders im endokrinen System des weiblichen und männlichen Organismus. Eine große Rolle kommt den Östrogenen und seinen Rezeptoren im Fortpflanzungssystem des Menschen zu, wie z. B. bei der Ovulation, Implantation, der Aufrechterhaltung der Schwangerschaft, Geburt, Laktation sowie der Spermiogenese, Fertilität und Hodenfunktion. Ausschließlich bei Zellen, die Östrogenrezeptoren exprimieren, kann die biologische Wirkung von Östrogenen verzeichnet und beobachtet werden. Die spezifische Wirkung der Östrogene hängt von den Interaktionen

der Rezeptoren mit verschiedensten Proteinen, die an unterschiedlichen Prozessen beteiligt sind, ab. Daraus folgt, dass die östrogene Hormonwirkung sehr komplex ist. Östrogenrezeptoren und die daraus resultierenden Östrogeninteraktionen sind auch an mehreren pathologischen Krankheitsprozessen und -entstehungen, wie dem Mamma- und Endometriumkarinom, Osteoporose, kardiovaskulären Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen sowie an neurologischen Erkrankungsbildern beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Patientengruppen mit Mammakarzinomen, die den Östrogenrezeptor β , aber nicht den Östrogenrezeptor α aufweisen, größere Überlebenschancen aufweisen (Tan et al. 2016). Der Östrogenrezeptorstatus sowie diverse weitere Rezeptorexpressionen, wie beispielsweise der des Progesteronrezeptors, bzw. molekulare Besonderheiten der Mammakarzinomzellen haben einen erheblichen Einfluss auf die Mammakarzinombehandlung (Wöckel et al. 2018a; Wöckel et al. 2018b).

Müller et al. (2003) ermittelte eine *ESR1*-Hypermethylierung in Serumproben von primären Mammakarzinompatienten ($n = 26$, Sensitivität von 27 %) als auch von Patienten mit einem rezidierten Mammakarzinom ($n = 10$, Sensitivität von 70 %) bei einer Gesamtspezifität von 100 % ($n = 10$).

So zeigte die Arbeitsgruppe um Martniez-Galán et al. (2008), dass bei 106 Mammakarzinomserumproben eine *ESR1*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 65 % bei einer Spezifität von 62 % bei 108 gesunden analysierten Kontrollserumproben einschließlich Patientinnen mit benignen Mammaerkrankungen vorlag. Außerdem zeigte sich eine *ESR1*-Hypermethylierung vor allem im Serum von Patientinnen mit östrogenrezeptornegativem Mammakarzinom ($p = 0,0179$). Auch der Untersuchung von van der Auwera et al. (2009) konnte bei Mammakarzinompatienten im Serum ($n = 80$) eine *ESR1*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 20 % bei einer Spezifität von 89,5 % ($n = 20$) nachweisen.

1.5.4 Homeobox-B4-Gen (*HOXB4*)

Das *Homeobox-B4*-Gen, welches auf dem Chromosom 17 liegt und Mitglied der großen *Antennapedia-Homeobox*-Großfamilie ist, codiert das *Homeobox* Protein *Hox-B4*. Gene der *HOX*-Gruppe sind allesamt regulative Gene und ihre Genprodukte sind Proteine, die als Transkriptionsfaktoren fungieren. Einer der wichtigsten Aufgaben der *HOX*-Gene im humanen Organismus ist es die Gliederung des Embryos entlang der kranio-kaudalen Körperachse inklusiver der Extremitäten zu induzieren. Dadurch erfolgt eine bestimmte Anordnung des embryonalen Aufbaus, der durch die *HOX*-Gene bestimmt wird. Die Zellen in den entsprechenden Zonen erhalten *HOX*-Genprodukt vermittelte Informationen über ihre weiteren Aufgaben, wie Mitose, Differenzierung und Apoptose. Speziell beim Menschen wird die Entwicklung und Form der

Hals-, Brust- und Lendenwirbel sowie die der Rippen durch die *Homeobox*-Gene gesteuert. Zudem weisen sie eine besondere Beziehung zum Keimblatt des Neuroektoderms auf. Die Anordnung der *HOX*-Gene auf den unterschiedlichen Chromosomen entspricht der Reihenfolge, der von ihnen gegliederten Körperregionen. Bei Wirbeltieren und dem Menschen steht diese Abfolge ebenso im zeitlichen Zusammenhang mit der *HOX*-Gen-Exprimierung sowie weisen die *HOX*-Gene auch einen örtlichen Zusammenhang auf und befinden sich auf dem DNA-Strang in direkter Nachbarschaft. Diese geordnete genetische Anlage und die daraus resultierenden spezifischen Regulationsvorgänge lassen auf eine große Konservierung in der Genetik schließen. Dieses Phänomen wird auch als Kolinearität bezeichnet (McAlpine und Shows 1990). Beim Menschen gibt es insgesamt vier *HOX*-Cluster, die in A-, B-, C- und D-Gengruppen unterteilt werden. Die *HOXA*-Gen-Familie, die sich auf Chromosom 7 befindet, besteht aus 11 Genen. Die *HOXB*-Gen-Familie, von denen es zehn gibt, zu denen auch das *HOXB4* gehörig ist, sind, wie bereits erwähnt, auf dem Chromosom 17 lokalisiert. Zu der *HOXC*-Gen-Familie, welche auf dem Chromosom 12 zu finden ist, gehören neun weitere Genprotagonisten und zur *HOXD*-Gen-Gruppe, welche auf dem Chromosom 2 liegt, neun Gene. Alle *HOX*-Gene weisen ein gemeinsames Charakteristikum in Form einer Homöobox auf, weshalb man sie auch zu den homöotischen Genen zählt. Die Homöobox kodiert eine Homöodomäne, deren Sequenz bei allen Genprodukten der *HOX*-Familie üblicherweise aus 180 Nukleotiden besteht und somit aus 60 Aminosäuren, die in einer definierten Abfolge angeordnet sind. Diese spezifische Sequenz fungiert als eine DNA-Bindungsstelle. Das besagte *HOXB4*-Protein ist ein nukleäres Protein, das ebenfalls wie erläutert, eine *Homeobox*-bindende DNA-Domäne besitzt. Das *HOXB4*-Protein hat demzufolge die Funktion eines sequenzspezifischen Transkriptionsfaktors inne, der wie schon beschriebenen in der kranio-kaudalen Körperachsenentwicklung sowie bei der Histogenese mitwirkt. *HOX*-Gene und deren codierenden Proteine können je nach zu beeinflussenden Genen eine genaktivierende oder gen-reprimierende Funktion übernehmen (Izpisua-Belmonte et al. 1991; Lappin et al. 2006; McAlpine und Shows 1990; Pang und Martindale 2008). Daher kann ein *HOX*-Protein sowohl als Repressor auch als Aktivator in unterschiedlichen Stoffwechselwegen agieren und so gleichzeitig zahlreiche Effektorgene und -moleküle beeinflussen. Synonym werden auch Abkürzungen, wie *HOX2.6*, *HOX2*, *HOX2F* für das Homeobox Protein B4, verwendet (McAlpine und Shows 1990; Scott 1992). Außerdem konnte die Reexpression von *HOX*-Genprodukten *HOXB3*, *B4* und *-C6* bei Mammakarzinomen nachgewiesen werden und lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei diesen Proteinen einschließlich des *HOX-B4*-Moleküls um eine neue Gruppe von onkofetalen Antigenen handelt, die eine Rolle in der Kanzerogenese und bei der Tumorprogression des Mammakarzinoms spielen (Bodey et al. 2000).

So zeigte auch die Arbeit von Fackler et al. (2014), dass es ihnen gelang in einem Panel von zehn ausgewählten Genen (*AKR1B1*, *COL6A2*, *GPX7*, *HIST1H3C*, *HOXB4*, *RASGRF2*, *RHGEF7*, *TM6SF1*, *TMEFF2* und *RASSF1*) malignomspezifische, hypermethylierte zirkulierende cfDNA aus Serumproben mittels einer quantitativen, methylierungsspezifischen Multiplex-PCR in einer Trainingskohorte (n = 28 Gesunde, n = 24 metastasiertes Mammakarzinom, Stadium 4) und einer Testkohorte (n = 27 Gesunde, n = 33 metastasiertes Mammakarzinom, Stadium 4) mit einer Sensitivität von 91 % und einer Spezifität von 96 % der Testkohorte nachzuweisen. Eine *HOXB4*-Hypermethylierung zeigte sich allein betrachtet in der Trainingskohorte mit einer Sensitivität von 46 % bei einer Spezifität von 100 % sowie in Testkohorte mit einer Sensitivität von 36 % bei einer Spezifität von ebenfalls 100 %.

1.5.5 Myelin-und-Lymphozyt-Protein-Gen (*MAL*)

Das *MAL*-Protein, was für Myelin-and-Lymphocyt-Protein steht, gehört zur *MAL*-Familie bestehend aus den Proteolipiden *MALL* (*myelin-and-lymphocyt-protein like*), *MAL2* und Plasmolipin. Das *MAL*-Gen, das auf dem Chr. 2 liegt, codiert ein hydrophobes Integralprotein der Zellmembran und ist aus 153 Aminosäuren aufgebaut, was einem Gewicht von 16,7 kDa entspricht. Das *MAL*-Genexpressionsprodukt ist zudem nicht glykolysiert und weist vier transmembranöse Domänen auf (Alonso und Weissman 1987). Die vier Transmembran-Helices enthalten sogenannte *MARVEL*-Domänen (*mal and related proteins for vesicle trafficking and membrane link domain proteins*, *MAL* und verwandte Proteine für Vesikeltransport- und Membran-Link-Domäne). Proteine, die diese *MARVEL*-Domänen enthalten, sind an dem Vesikeltransport und bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten, den *tight junctions* beteiligt (Magal et al. 2009). Der spezifische Aufbau des *MAL*-Proteins inklusiver seiner transmembranösen Helices dient außerdem der Zellerkennung. Da das *MAL*-Protein im endoplasmatischen Retikulum von T-Zellen gefunden wurde und an der T-Zell-Signaltransduktion beteiligt ist, wird es auch synonym als T-Zelldifferenzierungsprotein bezeichnet. Darüber hinaus ist das Integralproteolipid Bestandteil des Myelins von Neuronen und an der Myelinbiosynthese beteiligt. Das *MAL*-Protein spielt außerdem eine Rolle bei der Bildung, Stabilisierung und Erhaltung von glykosphingolipidreichen Membranabschnitten in Form von Mikrodomänen. Eine weitere Funktion des *MAL*-Proteins ist die Beteiligung am intrazellulären Transport sekretorischer Proteine in apikaler Richtung von polarisierten Epithelzellen. Eine Störung in dieser Transportfunktion kann zu einem Verlust der organischen Polarität führen, der für viele maligne Neubildungen charakteristisch ist. Die Dysregulierung dieses Gens konnte bei diversen epithelialen Karzinomen und deren Initiierung und Progression beobachtet werden, wie beispielsweise beim Mamma-, Ösophagus-, Eierstock- und Zervixkarzinom (Horne et al. 2009). Basierend auf einer besonders

hohen Hypermethylierung des *MAL*-Promotors vor allem bei Brust-, Zervix-, Dickdarm- und Magenkarzinomen im Vergleich zum entsprechenden gesunden Epithel, wird die Promotorhypermethylierung des *MAL*-Gens als diagnostischer Marker für den frühen Nachweis der Tumorentstehung vorgeschlagen (Buffart et al. 2008). Das Fehlen der *MAL*-Protein-Expression bei Mammakarzinompatienten war in hohem Maße mit einem schlechten krankheitsfreien Überleben bei Patienten assoziiert, die keine adjuvante Chemotherapie erhielten, was ebenfalls dafür spricht, dass das *MAL*-Gen als Tumorsuppressor bzw. Onkogen fungiert (Horne et al. 2009). Hinter dem Synonym *MyD88-adaptor-like-protein* kann sich ebenso das *MAL*-Protein verbergen und spielt auf eine weitere Funktion des besagten Moleküls an. Denn für die TLR- (*Toll-Like-Rezeptor*) 4-Signaltransduktion wird das *MAL*-Protein benötigt. Die *Toll-Like-Rezeptoren* gehören zum angeborenen Immunsystem und dienen der Erkennung von pathogenen Oberflächen und Molekülen. *MAL* aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor *NF-kappaB* (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), für das *Mal*-Protein den Kofaktor *IRAK-2* (*IL-1 receptor-associated kinase 2*) benötigt. Zudem ist das *MAL*-Protein ein spezieller Kinasenaktivator und zwar der Jun-Amino-terminale Kinase, synonym auch bekannt als *SAPK* (*stress-activated protein kinase*) die zur Familie der *MAP*-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) gehört. Eine extrazelluläre Signal-regulierende Kinase-1 und -2-Aktivierung (*ESRK1 and 2, extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*) wird dem *MAL*-Genprodukt ebenfalls nachgesagt (Fitzgerald et al. 2001).

1.5.6 All-trans-Retinsäure-Rezeptor-*beta*-2-Gen (*RARB2*)

Das *RAR-B*-Gen, welches auf dem Chr. 3 lokalisiert ist, codiert einen nukleären Transkriptionsfaktor namens all-trans-Retinsäure-Rezeptor-*beta*-2. Es werden insgesamt drei all-trans-Retinsäurerezeptoren (*RAR*) beschrieben und zwar *RAR-alpha*, *RAR-beta* und *RAR-gamma*, codiert durch die entsprechenden *RAR-A*-, *RAR-B*-, *RAR-G*-Gene. Der intrazelluläre Retinsäure-Rezeptor *beta* gehört zur Superfamilie der Schilddrüsen-Steroidhormonrezeptoren und ist so auch als *NR1B2* (*nuclear receptor family 1, group B, member 2*) bekannt, einem Kernrezeptor der Unterfamilie 1, Gruppe B, Vertreter 2 (Mattei et al. 1988). Dieser besagte Rezeptor ist aus drei Domänen aufgebaut, einer modulierenden N-terminalen, einer DNA-bindenden und einer C-terminalen Ligandenbindungsdomäne. Dieser Rezeptor liegt DNA-gebunden im Zellkern vor. Die Rezeptoren der Retinsäure, für Vitamin D und für Schilddrüsenhormone erkennen allesamt die gemeinsame Erkennungssequenz auf der DNA (5'-AGGTCA-3'). Das *RAR-B*-Genprodukt bindet die Retinsäure, die biologisch aktive Form des Vitamin A_s. Bei dieser Rezeptor-Hormonbindung kommt er zur Ausbildung von Heterodimeren, die an der exakten Wiederholung dieser Erkennungsabfolge binden. Dieser Komplex aus *RAR-beta*-2-Rezeptor und der Retinsäure ist

an der zellulären Signaltransduktion in der embryonalen Morphogenese, Zellwachstum und Differenzierung beteiligt. Zudem wirkt das besagte Protein ebenfalls am Wachstum vieler Zellentitäten durch Regulierung der Genexpression mit und begrenzt dieses. Erstmals wurde das Gen in einem hepatozellulären Karzinom identifiziert, wo es einen Hepatitis-B-Virusintegrationsort aufweist (Jung et al. 2010).

RXR- (Rezeptor für die 9-cis-Retinsäure) RAR-Heterodimere, die entstehen, wenn keine spezifischen Hormone oder Bindungspartner vorhanden sind, fungieren als nukleäre Transkriptionsregulatoren durch Bindung an das spezifische Retinolsäure-Reaktionselement, das in den Promotorregionen von Zielgenen gefunden wird. So konnte auch gezeigt werden, dass es eine Hypermethylierung der *RAR-beta-2*-Promotorregion bei Mammakarzinomen gibt und dass diese Methylierung eine unabhängige wichtige Determinante der Brustkrebs-Prognose ist (Cho et al. 2012; Sharma et al. 2009). Die Promotorhypermethylierung des *RAR-β-2* ist signifikant bei Mammakarzinompatienten, sowohl in Gewebe- als auch in Blutproben, gesteigert und mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms assoziiert. So könnte *RARβ2* als potentieller epigenetischer Marker für die Erkennung von Brustkrebs dienen (Fang et al. 2015). Dies bestätigte die Arbeit von Swellam et al. (2015) ebenfalls, sodass in Mammakarzinomserumproben eine *RARβ2*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 95,5 % bei einer Spezifität von 92,4 % nachzuweisen war.

1.5.7 Ras-Assoziationsdomäne Familienmitglied 1, Isoform A-Gen (*RASSF1A*)

Das *RASSF1A*, welches auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist, kodiert ein Ras-ähnliches Effektorprotein namens *RASSF1A*-Proteins (Ras-Assoziationsdomäne Familienmitglied 1, Isoform A). Ras-Proteine gehören funktionell zur Gruppe der Protoonkogenen und beeinflussen so die Proliferations- und Differenzierungsprozesse von Zellen. Das *RASSF1A*-Genprodukt ist 340 Aminosäuren lang, was einer Masse von 38,8 kDa ausmacht. Das Interagieren des Ras-Protein-1-A mit dem *DNA*-Schadenserkennungs- und *DNA*-Reparaturfaktor *XPA* (Xeroderma pigmentosum Komplementierungsgruppe A) ist einer seiner Funktionen. Des Weiteren ist es entscheidend an der Repression der Cycline A und D1 sowie der Unterdrückung der Akkumulation des Cyclins D1 beteiligt. Die damit verbundene Induzierung des Zellzyklusarrests am Übergang der G1- zur S-Phase ist die Folge. Unter anderem interagiert das Ras-Assoziationsdomänen-Mitglied 1 A mit Mikrotubuli-bindenden Proteinen und stabilisiert so die Mikrotubuli und deren Aufbau. Hinzukommt, eine modulierende Funktion in der Dauer der Entzündungsreaktion und in Bezug auf die *NFκB*-Aktivität. Außerdem reguliert das Effektorprotein Ras-1 A die *FAS*-(Todesrezeptor-) ligandenabhängige Mitose, den Zellzyklus und die Apoptose. Die Interaktion des *RASSF1A*-Proteins mit dem *CDC20*-

Molekül, das ein Aktivator des anaphasefördernden Komplexes ist, bewirkt das mitotische Fortschreiten in Zellen. Eine Wechselwirkung des *RASSF1A*-Syntheseprodukts mit diversen anderen Proteinen, wie *CNK1*, *MST1* und *2*, *STK 3* und *4*, *Salvador* und *MOAP1* wird im Zusammenhang mit der Modulation der Apoptose ebenfalls beschrieben (Donninger et al. 2007; Volodko et al. 2014). Die Tumorsuppressorgeneigenschaft des *RASSF1A* liegt darin begründet, dass eine unangemessene Promotorhypermethylierung dieses Gens bei diversen Malignomen zu verzeichnen ist. Der Verlust oder die Inaktivierung des *RASSF1A* durch Deletion, Punktmutation aber vor allem durch die Methylierung der CpG-reichen Promotorregionen korrelieren mit der Entstehung von diversen Karzinomen. Dies bestätigten auch Yeo et al. (2005) und Shinozaki et al. (2005).

Die Untersuchung von van der Auwera et al. (2009) beschrieb, dass bei Mammakarzinompatienten im Serum (n = 80) eine *RASSF1A*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 35 % bei einer Spezifität 100 % (n = 20) vorlag. Auch die Arbeit von Papadopoulou et al. (2006) zeigte, dass in Plasmaproben von Mammakarzinompatienten (n = 50) eine *RASSF1A*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 26 % bei einer Spezifität von 100 % (n = 14) zu finden war.

Die *RASSF1A*-Methylierung wurde auch in Mammaneoplasien als Prädiktor für eine schlechte Prognose des Überlebens beschrieben (Sharma et al. 2009). Diese Tatsache macht die *RASSF1A*-Hypermethylierung, die man in unterschiedlichsten Körperflüssigkeiten detektieren konnte, zu einem attraktiven Biomarker für die Krebsfrüherkennung (Suijkerbuijk et al. 2008). Die Vielzahl an bedeutenden Funktionen des *RASSF1A*-Proteins unterstreichen seine Bedeutung in den zahlreichen physiologischen Signalwegen sowie bei abnormer Veränderung durch Hypermethylierung seinen Einfluss in der Tumorgenese.

1.5.8 ***SRY-high-mobility-group-Box-17-Gen (SOX17)***

Die 20 vorhandenen *SOX*-Gene im menschlichen Körper kodieren Transkriptionsfaktoren, die zu einer Superfamilie gehören, die allesamt eine *HMG-Box* (*high mobility group*) in ihren Genprodukten aufweisen. Diese homologe Sequenz der *HMG-Box* fungiert als eine *DNA*-Bindungsdomäne, wobei die Bindungsspezifität und die *DNA*-Affinität eher schwach ist (Katoh 2002). Die *SOX*-Proteine agieren und üben ihre diversen Funktionen in einem komplexen Zusammenspiel mit anderen Transkriptionsfaktoren aus, die enorm vom Zelltyp und vom Promotorkontext abhängig sind. Der Name *SOX* setzt sich aus *SRY* und der *HMG-Box* zusammen, wobei *SRY* für die geschlechtsbestimmende Region auf dem residenten Y-Chromosom steht. Viele der *SOX*-Gene und deren Syntheseprodukten sind an der Geschlechtsbestimmung beteiligt sowie an der Regulierung diverser unterschiedlicher Entwicklungsabschnitte in der

Embryogenese, wie beispielsweise die Keimschichtbildung, vor allem des Endoderms, der Organentwicklung, wie die des Herzens, Nervensystems sowie der Niere und der Zelltypdifferenzierung und -identität (Wegner 1999).

Daher führen Deletionen oder Mutationen von *SRY-related-high-mobility-group-box*-Proteinen oft zu Entwicklungsfehlern und angeborenen Erkrankungen beim Menschen, was ihre Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung widerspiegelt (Katoh 2002). Man unterteilt die *SOX*-Gene in die Gruppen *SOXA*, *-B1*, *-B2*, *-C*, *-D*, *-E*, *-F*, *-G*, *-H*. Das *SRY-related HMG-Box-17*, welches auf dem Chromosom 8 lokalisiert ist, gehört zur *SOX-F*-Gruppe und das Syntheseprodukt besteht aus 414 Aminosäure (Guth und Wegner 2008; Katoh 2002). Dieses *SOX17*-Protein, welches aus der N-Terminal gelegenen, *DNA*-bindenden HMG-Box-Domäne und einer *SOXC*-terminalen Domäne besteht, kann nach einer Proteinkomplexbildung mit anderen Proteinen als Transkriptionsregulator fungieren. Dieser Vorgang verläuft indem der *SOX17*-Proteinkomplex an der kleinen Furche der *DNA*, die als Ziel-Promotor-*DNA* aus der Sequenz 5'-*AACAAT-3'* oder 5'-*AACAAAG-3'* besteht, bindet und diese verbiegt. Dies tut der besagte Transkriptionsregulator über die Interaktion mit dem *Wnt3A* bzw. dessen kodiertem Signalprotein, das an diversen Entwicklungs- und Zellprozesse sowie an der Onkogenese und Adipositasentstehung beteiligt ist. Außerdem hemmt das *SOX17*-Molekül in diesem Aspekt den *Wnt*-Signalweg und fungiert in diesem Zusammenhang als Inhibitor. Die Bindung des β -*Catenins* und somit die Förderung seines Abbaus, welches durch das *CTNNB1*-Gen kodiert wird, ist eine weitere Aufgabe des *SOX17*-Genproduktes. Das Genprodukt des *CTNNB1*, das β -*Catenin*, spielt zum einen eine Rolle bei der Regulierung der Zell-Zell-Adhäsionskoordination zum anderen bei der Gentranskription. Das *SOX17*-Protein ist auch unter dem Synonym *VUR3* (*vesicourethraler reflux type 3*) bekannt, denn bei einer Mutation im *SOX17*-Gen kommt es bei betroffenen Patienten zum Rückfluss von Urin aus der Blase in die Harnleiter oder die Niere (Gimelli et al. 2010). Der *SOX17*-Transkriptionsfaktor steht in Zusammenhang mit der Tumorentstehung und dem Fortschreiten multipler Neoplasien. Ein Mangel an *SOX17*-Proteinexpression wurde besonders in höheren Tumorstadien, Lymphknotenmetastasen und Tumorknotenmetastasen gefunden und hatte ein schlechteres krankheitsfreies Überleben sowie Gesamtüberleben bei Mammakarzinompatienten im Vergleich zur normalen *SOX17*-Expression in gesunden Probanden. So kann man die *SOX17*-Expression als einen nützlichen prognostischen Biomarker für Mammakarzinome in Betracht ziehen (Fu DY et al. 2015). Der Arbeitsgruppe von Chimonidou et al. (2011) gelang es eine *SOX17*-Hypermethylierung aus EDTA-Plasmaproben bei Patienten mit operablem Mammakarzinom (n = 56) bei einer Sensitivität von 53,6 % sowie bei Patienten mit metastasiertem Mammakarzinom bei einer

Sensitivität von 74,1 % bei einer Spezifität ($n = 23$) von 95,7 % mittels einer methylierungsspezifischen PCR nachzuweisen.

Da auch eine *SOX17*-Promotormethylierung eine Tumorangiogenese begünstigen kann, ist dieser prognostische Biomarker bei Mammakarzinom-Patienten mit einem Risiko der Metastasenbildung vergesellschaftet. Möglicherweise kann eine *SOX17*-Methylierung auf Metastasen hinweisen bzw. als Indikator bei der Entwicklung eines Rezidivs nach einer Mastektomie fungieren. So korreliert eine *SOX17*-Methylierung mit einem verminderten Überleben bei Mammakarzinompatientinnen (Fu D et al. 2015).

1.5.9 Altersabhängigkeit epigenetischer Modifikationen

Die epigenetischen Modifikationen in Form einer DNA-Methylierung kann man ebenfalls bei malignen Neubildungen während des Alterungsprozesses beobachten. Die genauen Mechanismen sind nach wie vor unzureichend erforscht. Jedoch zeigten Wang et al. (2016), dass altersassoziierte DNA-Methylierungsveränderungen in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von Karzinomen stehen. Außerdem zeigte die Forschungsgruppe, dass es sowohl ein Methylierungsniveau gibt, das mit zunehmendem Alter ansteigt und bei Krebspatienten höher ausfällt als bei gesunden Kontrollpersonen als auch ein Methylierungsniveau existiert, das mit zunehmendem Altern sinkt und im Vergleich zu gesunden Probanden bei Krebspatienten geringer ausfällt. Heyn et al. (2012) bestätigten ebenfalls diese These und führten eine Bisulfit-Sequenzierung des kompletten Genoms bei Neugeborenen sowie bei Hundertjährigen durch und analysierten das DNA-Methylierungsprofil dieser zwei Gruppen. So konnten sie zeigen, dass Hundertjährige einen niedrigeren DNA-Methylierungsgrad aufweisen als Neugeborenen sowie das Auftreten von benachbarten *CpG*-Dinukleotiden im gesamten Genom von Hundertjährigen im Vergleich zu Neugeborenen vermindert ist. Diese altersassoziierten epigenetischen Veränderungen werden auch als epigenetischer Drift bezeichnet. Das Ereignis der globalen Abnahme der DNA-Methylierung sowie auch spezifische Hypermethylierungsvorkommnisse sind mit dem Altern assoziiert und können diverse unterschiedliche Erkrankungen auslösen (Heyn et al. 2012).

Es kommt im Laufe des Lebens zu gewebespezifischen epigenetischen Veränderungen. So findet beim Mammakarzinom eine altersbedingte Methylierungszunahme vor allem in Mammepithelzell-Enhancerregionen sowie an Bindungsstellen von Onkogenen statt, wie beispielsweise am *MYC*-Gen (Horvath 2013; Johnson et al. 2017).

1.5.10 Epigenetische Veränderungen durch Alkoholkonsum

Die Karzinogenese ist eine der verheerendsten Folgen des Alkoholkonsums und betrifft weltweit etwa 3,6 % aller Krebsfälle (5,2 % bei Männern und 1,7 % bei Frauen). Es stehen außerdem 3,5 % aller malignombedingten Todesfälle im Zusammenhang mit chronischem Alkoholkonsum (Boffetta et al. 2006). Baan et al. (2007) konnten zeigen, dass Alkohol in zahlreichen Organen, wie auch in der weiblichen Brust zur Krebsentstehung führen kann. Folgen des Alkoholkonsums können sowohl eine unphysiologische Hypermethylierung von Promotorregionen, Hemmung von DNA-Methyltransferasen als auch eine Hypomethylierung des restlichen Genoms sein. Somit besteht ein erhöhtes Risiko für eine alkoholinduzierte Karzinogenese (Dumitrescu 2018; Varela-Rey et al. 2013).

1.5.11 Epigenetische Veränderungen durch inhalativen Tabakkonsum

Der inhalative Tabakgebrauch ist ein Risikofaktor für mehrere Karzinomarten, so auch für das Mammakarzinom. Die mehr als 3000 Inhaltstoffe einer Zigarette führen zu einer Veränderung von Genexpressionen, indem diese zu Hypo- und/ oder Hypermethylierungen der CpG-Regionen des Genoms führen. Eine veränderte DNA-Methylierung, die im Zusammenhang zwischen einer Tabakexposition und einer Genexpressionsveränderung auftritt, kann zur Entstehung oder zum Fortschreiten von Brustkrebs führen und beitragen (Conway et al. 2017).

1.5.12 Ethnie und das Mammakarzinom

Es wird beschrieben, dass ethnische Unterschiede in Bezug zum Mammakarzinom bestehen. Es gibt eine Vielzahl klinischer und nicht-klinischer Risikofaktoren, die zu Unterschieden im Überleben von farbigen Brustkrebspatienten zurückzuführen sind (Yedjou et al. 2017). Epigenomstudien haben Variationen in den Methylierungsmustern des Genoms von unterschiedlichen ethnischen Gruppen ergeben, einschließlich Kaukasier, Nichtkaukasier (farbige), Hispanier, Araber und zahlreichen Populationsgruppen des afrikanischen Kontinents. In den Vereinigten Staaten weisen afroamerikanische und hispanische Frauen eine geringere Inzidenz von Brustkrebs auf als weiße Frauen, jedoch weisen sie eine höhere Sterblichkeitsrate als weiße Frauen auf (Kader und Ghai 2017).

1.6 Anatomischer und histologischer Aufbau der Mamma

Das Brustorgan entwickelt sich während der Embryogenese bei beiden Geschlechtern im zweiten Trimenon aus dem Ektoderm, genauer aus den Basalzellen der Epidermis, die sich zu

einfach aufgebauten, funktionellen Milchgängen differenzieren. Des Weiteren besteht die größte Hautdrüse des Menschen aus drei Grundgewebearten, dem Drüsen-, Binde- und Fettgewebe. Die anschließende Entwicklung der weiblichen Mamma in Form, Größe und Funktion erfolgt erst während der Pubertät unter dem Einfluss diverser Hormone, wie dem Östrogen, Progesteron, Glukokortikoiden, Aldosteron, Insulin und anderen Wachstumshormonen. Die männliche Mamma weist eine gleiche Organarchitektur auf, die sich jedoch aufgrund fehlender Hormonstimuli und unter dem Einfluss des Testosterons nicht weiterentwickelt und als flaches, ebenes Drüsenrudiment verbleibt (Drenckhahn und Waschke 2008; Macias und Hinck 2012; McNally und Stein 2017).

Die Mamma wird in vier Quadranten unterteilt. Die Mamille dient der exokrinen Drüse als Ausführungsgangsystem. Die physiologische Funktion der Mamma liegt in ihrer Milchproduktion, der Laktation, und dient so als Stillorgan. Bei dem weiblichen Geschlecht kommt es während der Pubertät unter dem Einfluss diverser Hormone und Stimuli zu einer kontinuierlichen Verzweigung der einfach aufgebauten Milchgänge. Dieser entstandene Drüsenkörper ist in Fettgewebe eingebettet, wird durch umgebenes Bindegewebe stabilisiert und dann als *Corpus mammae* bezeichnet. Bindegewebssepten ziehen ins Innere der exogenen Drüse und gliedern den Drüsenkörper in 12- bis 20 Einzeldrüsen, den sogenannten *Lobi*, die vom fibrösen Stroma umgeben sind. Dadurch kommt es zur Ausbildung einer charakteristischen Drüsenläppchenstruktur. Die *Lobi* weisen ein ausgedehntes Gangsystem auf und unterteilen sich nochmals in kleinere Läppchen, den *Lobuli*, wobei jede Einzeldrüse mit ihrem *Ductus excretorius* (Ausführungsgang) in der Mamille endet. Die Milchgänge (*Ductus lactiferi*) sind aus zweischichtigem kubischem Epithel aufgebaut und liegen einer Membran aus Myoepithelzellen auf. Außerdem liegen im Drüsenepithel sogenannte Progenitorzellen, die als Reservezellen dienen und sich zu Drüsen- oder Myoepithelzellen differenzieren können (Böcker et al. 2012; Drenckhahn und Waschke 2008; McNally und Stein 2017).

Das Mammagewebe reagiert auf die unterschiedlichen hormonellen Einflüsse während des weiblichen Zyklus mit Proliferations- und Apoptoseprozesse der Läppchenepithelien. Lediglich in der Schwangerschaft und während der Laktationsphase, reift die Brustdrüse durch die Prolaktinausschüttung gänzlich in ihrer Funktion aus. Ohne hormonellen Stimulus kommt es zum intramammären histologischen Umbau des laktierenden Epithels zum ursprünglichen Mammaepithel bis hin zu einer menopausalen lobulären Altersatrophie, die mit einer Fibrose und Lipomatose der Mamma einhergeht (Böcker et al. 2012; Hassiotou und Geddes 2013; McNally und Stein 2017). Der Aufbau der männlichen Brust unterscheidet sich insofern von dem der Frau, indem die männliche Mamma nur aus Drüsengängen aufgebaut ist, sie jedoch keine *Azini* aufweist (Doebar et al. 2017). Eine Vergrößerung der männlichen Mamma wird auch als

Gynäkomastie bezeichnet, welche sowohl benigner als auch maligner Entität sein kann und diese häufig beidseits sowie asymmetrisch vorkommt (Böcker et al. 2012).

Die Kenntnis der lymphatischen Abflusswege der Mamma sind für das Verständnis der lymphogenen Metastasierung des Mammakarzinoms von außerordentlicher Bedeutung. Die Mamma ist von einem oberflächlichen und einem tiefen System aus Lymphgefäßen durchzogen, welche miteinander in Verbindung stehen und der axilläre Abfluss am bedeutsamsten ist (Welsch 2006, Drenckhahn und Waschke 2008).

1.7 Das Mammakarzinom und seine Differentialdiagnosen

Es gibt neben dem Mammakarzinom und seinen Vorläuferläsionen auch diverse gutartige Veränderungen des Brustdrüsengewebes, die alle klinisch einem Mammakarzinom ähneln. Hierzu zählen tumoröse Läsionen, wie eine duktale Hyperplasie, eine sklerosierende Adenose, eine radiäre Narbe, Milchgangspapillome, Adenome, Adenomyoepitheliome, ein Fibroadenom sowie entzündliche Veränderungen der Mamma, wie eine Mastitis, ein Abszess oder auch ein Ekzem der Mamille. Weitere Auffälligkeiten der Brustdrüse können eine Schwellung während des Menstruationszyklus und des pubertätsbedingten Wachstums, ein Lipom, Hämatom, Atherom sowie Brustzyste/n sein. Auch andere maligne Erkrankungen im Bereich der Mamma können wie ein Mammakarzinom imponieren, wie ein phylloider Tumor, ein Mammasarkom oder ein Lymphom in der Mamma. Die fibrozystische Mastopathie stellt jedoch die häufigste gutartige Raumforderung der Mamma dar (Böcker et al. 2012; Costa und Zanini 2008).

1.7.1 Histologische Klassifikation des Mammakarzinoms

Bis 2012 unterschied man histologisch nach Ursprungsgewebe, ob eine duktale, vom Milchgangsepithel ausgehende oder eine lobuläre, eben von den Drüsenläppchen ausgehende, Neoplasie vorliegt. Die WHO (*World Health Organisation*) unterteilt die invasiven Mammakarzinome seit 2012 in 24 Subtypen, wobei im Jahre 2012 der histologische Typ des invasiv-duktales Mammakarzinoms in den Subtyp des invasiven Karzinoms, kein spezieller Typ, kurz NST (*no special type*), umbenannt wurde. Gründe hierfür waren, dass diese heterogene Gruppe der duktales Karzinome keine eindeutigen und spezifischen Charakteristika bezüglich der Histomorphologie zeigten um diese zu einer eigenen Tumorsubentität zusammenzufassen (Sinn und Kreipe 2013).

Das Mammakarzinom ist histologisch gesehen in den meisten Fällen ein sogenanntes Adenokarzinom, dass eine Neoplasie ausgehend von Drüsengewebe, speziell von den *Glandulae lactans* (Milchdrüsen) selbst oder deren Drüsengängen ist. Es gibt unterschiedliche Formen des

Adenokarzinoms der Mamma, wobei das invasive lobuläre Mammakarzinom einen Anteil mit 10 bis 20 % aller invasiven Mammakarzinome ausmacht, dem gegenüber steht das invasive Mammakarzinom NST, das mit einem Anteil von ca. 60 % aller invasiven Mammakarzinome zu finden ist (Böcker et al. 2012; Sharma et al. 2010).

1.7.2 Vorläuferläsionen des Mammakarzinoms und Sonderformen

Diverse Untersuchungen belegen, dass sich ein invasives Karzinom der Mamma aus Präkanzerosen entwickeln kann, die man anhand ihres Wachstumsmusters in ein duktales *Carcinoma in situ* (DCIS) und in ein lobuläres *Carcinoma in situ* (LCIS) unterteilen kann. Die häufigste Lokalisation (zu 50 %) der in-situ und auch der invasiven Karzinome der Mamma ist im äußeren oberen Quadranten der Brust zu verzeichnen. Dort ist das meiste Drüsengewebe lokalisiert innerhalb einer Mamma. Im Bereich der Brustwarze tritt das Mammakarzinom inkl. seiner Vorstufen zu ca. 20 % auf und zu etwa 10 % weisen die anderen drei Quadranten der Mamma jeweils eine pathologische Raumforderung auf (Böcker et al. 2012).

Es gibt zwei Präkanzerosen im Spektrum der Brustkrebskrankungen, das duktales bzw. lobuläres *Carcinoma in situ* (CIS) der Mamma. Für ein *Carcinoma in situ* gilt per definitionem, dass diese die Basalmembran des erkrankten Epithels nicht durchbrechen und so stets ein intraepitheliales Wachstum aufweisen. Beim CIS der Mamma ist zudem auch die Myoepithelschicht komplett intakt und nicht von transformierten Zellen durchsetzt. Eine makroskopische Unterscheidung der zwei Präkanzerosen ist nicht möglich. Das duktales *Carcinoma in situ*, kurz DCIS, zeigt ein heterogenes Bild von Aufbau und unterschiedlichen Malignitätsgraden (Grad 1 = niedrig, Grad 2 = intermediär, Grad 3 = hoch). Auch dieses entwickelt sich aus Vorstufen, wie aus der flachen epithelialen Atypie und/oder einer atypischen duktalem Hyperplasie. Diese Erstpathologien des DCIS gehen vor allem von einer entarteten Drüsenzelle in einem Drüsenläppchen aus. So macht das DCIS etwa 5 bis 30 % aller Mammakarzinome aus. Die mikroskopischen Charakteristika des DCIS sind zum einen, dass es innerhalb des Milchgangsgewebes zu einem auffallenden, atypischen papillären oder siebartig wachsenden Epithel kommt, die malignen Zellen kohäsiv proliferieren und sie sich segmental im Drüsengerüst ausbreiten. Das mammographische Korrelat ist der sogenannte Mikrokalk, ein multifokales Wachstum kann auch sichtbar sein sowie das Vorhandensein von Komedonekrosen mit einer schnellen, intraduktalen Zellproliferation sowie einer typischen zentralen Nekrose und der daraus folgenden erhöhten Entartungstendenz (Böcker et al. 2012; Welsch 2006).

Eine Invasivität kann innerhalb von ca. zehn Jahren erfolgen. Ein erhöhtes Auftreten ist zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr zu verzeichnen. Eine Sonderform des DCIS oder der invasiven Form ist der Morbus Paget. Er liegt vor, wenn die Tumorzellen innerhalb der Mamille

auftreten sowie in der umliegenden Haut des Mamillenhofs und sich diese in ihrem Epithel differenzieren. Ein spezifisches Untersuchungszeichen ist die Einziehung der Mamille nach innen (positiver Jacksontest) und es kann ein Juckreiz und Brennen der betroffenen Stelle vorliegen mit entsprechenden blutigen, schuppigen, geröteten Hautauffälligkeiten. Möglich ist außerdem eine pathologische Sekretion aus der Mamille (Böcker et al. 2012).

Die lobuläre *intraepitheliale* Neoplasie, welche als LIN abgekürzt wird und synonym zum lobulären *Carcinoma in situ* (LCIS) verwendet wird, macht ca. nur 1 % aller Mammakarzinome aus und hat ihren Häufigkeitsgipfel prämenopausal zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr bei dem weiblichen Geschlecht. Die Charakteristika des LCIS sind zudem, dass es sich über die Zwischenstufe der atypischen lobulären Hyperplasie (ALH) entwickelt, die transformierten Tumorzellen von den Epithelien der Milchdrüsenlobuli und -gängen ausgehen, stets ein Wachstum innerhalb dieser besteht und sie im Gegensatz zum DCIS diskohäsiv proliferieren, was durch eine Störung des Zellverbandes gekennzeichnet ist. In fast allen lobulären Mammakarzinomen und deren Vorläuferläsionen liegt eine Inaktivierung des *CDH1*-Gens vor, welches auf dem Chr. 16q22 lokalisiert ist und das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin codiert. Die Inaktivierung kann durch Mechanismen, wie Punktmutationen, Deletion und Hypermethylierung ausgelöst werden und führt somit zum Verlust der Adhäsionsfähigkeit. Somit ist ein dissoziiertes Wachstum von malignen Zellen für das lobuläre Mammakarzinom typisch. Ein multifokales Auftreten von Tumorzellverbänden in der Mamma ist häufig und es tritt bis zu 30 bis 40 % bilateral auf. Mikroskopisch ist das LCIS durch die ALH mit monomorphen Tumorzellen sowie hervortretenden Drüsenazini gekennzeichnet. Eine Invasivität kann innerhalb von 25 Jahren auftreten. Es liegt ein zehnfach erhöhtes Risiko für die Entstehung eines invasiven Mammakarzinoms vor. Eine Mikrokalkbildung bei dem LCIS ist in circa 20 bis 40 % der Fälle zu beobachten, die mittels Mammographie sichtbar wird. So wird das LCIS fast ausschließlich im Rahmen einer Biopsie als Zufallsbefund entdeckt, die in Folge von mammographisch sichtbaren Mikroverkalkungen oder anderen Auffälligkeiten durchgeführt wurde (Aulmann 2011; Böcker et al. 2012).

Die Morphologie des männlichen Mammakarzinoms stellt sich häufig makroskopisch als Gynäkomastie dar, die durch die maligne Proliferation der Drüsengänge und des umliegenden fibrösen Strumas bedingt ist. Mikroskopisch wird als maligner Tumor häufig ein duktales Mammakarzinom diagnostiziert. Eine pathologische Invasivität ist in 50 % der Fälle zu beobachten und zeigt sich früh in Haut-, Thoraxwand- und Pleurabefall sowie in Lymphknotenmetastasen (Doebar et al. 2017; Ruddy und Winer 2013).

Das inflammatorische Mammakarzinom, auch als Lymphangiosis carcinomatosa bekannt, ist eine Sonderform eines fortgeschrittenen invasiven Karzinoms, bei dem es zur Ausbreitung der

malignen Zellen in kutane Lymphbahnen kommt. Wie der Name bereits vermuten lässt, ist die Folge eine Entzündung der Lymphgefäße mit typischen Entzündungszeichen und -symptomen. Daher wird diese Sonderform des Mammakarzinoms auch als ein T4-Stadium eingruppiert und weist eine sehr schlechte Prognose auf. Histologisch geht die hier beschriebene Neoplasie oftmals von den Duktuli laktans aus. Es gibt jedoch auch Varianten, bei denen es sich um ein lobuläres Karzinom handelt. Differentialdiagnostisch imponiert dieses T4-Karzinom zu Beginn der Erkrankung häufig als eine benigne Mastitis (Böcker et al. 2012; Sharma et al. 2010; van Uden et al. 2015).

1.7.3 Diagnostik bei Symptomen und Verdacht auf ein Mammakarzinom

Um eine Verdachtsdiagnose zu bestätigen wird als Methode der ersten Wahl die Mammographie beidseits mittels Röntgenstrahlen empfohlen. Die Mammographie dient aber auch als Untersuchungsmethode der Wahl zur Früherkennung von pathologischen Raumforderungen in der Brust sowie als Präventionsinstrument. Sie ist eine röntgenologische Untersuchungsmethode und kann im kranio-kaudalen, medio-lateralen und medio-lateral-obliquen Strahlengang durchgeführt werden. Zurzeit ist die Mammographie die einzige evidenzbasierte, bildgebende Methode zur Erkennung von Präkanzerosen der Mamma. Auch für Frauen im Alter von 40 bis 49 Jahren konnte eine Reduzierung der Mammakarzinomletalität gezeigt werden, jedoch nicht so deutlich wie in der Altersgruppe der 50- bis 69-jährigen Patientinnen. Die Anzahl der relativ falsch-positiven und falsch-negativen Mammographiebefunde ist in diesem Kollektiv höher, weshalb die Entscheidung über die Durchführung einer Mammographieuntersuchung anhand des bestehenden individuellen Risikos und der daraus resultieren Nutzen-Risiko-Bilanz erfolgen sollte, da die sich ergebenden Risiken aus der Strahlenexposition in diesem Alter zu vernachlässigen sind (Nelson et al. 2016; Patterson und Roubidoux 2014; Siu 2016; Wöckel et al. 2018b). Das Ziel des eingeführten Mammographie-Screening-Programms ist es, Parenchymartungen der Mamma in einem so frühen Stadium zu entdecken, in dem die Raumforderung noch klein, begrenzt und prämaligne ist sowie die Lymphknoten noch nicht befallen sind. Je früher und je niedriger das TNM-Stadium ist, desto besser ist die Prognose, sanftere Behandlungsmöglichkeit und größere Chance auf Heilung besteht bei den Patienten. Um die Mammographie besser beurteilen zu können hat das *American College of Radiology* (ACR) die sogenannten ACR- sowie BI-RADS- (*Breast Imaging Reporting and Data System*) Kriterien aufgestellt. Diese Mammographiebefundbeschreibung erfolgt von einem Radiologen, der subjektiv die Dichte und die Beurteilbarkeit des Mammaparenchyms in der Mammographieaufnahme beschreibt. Diese Kriterien werden zum ACR-Grad (eins bis vier) zusammengefasst. Der ACR-Grad gibt Aufschluss über die Zuverlässigkeit der mammographischen Diagnostik bezüglich kleiner Raumforderungen, die

in den Kategorien drei und vier möglicherweise nicht detektiert werden können. Je dichter das Brustdrüsengewebe ist, also je höher der ACR-Grad angegeben wird, desto schlechter beurteilbar und desto leichter können pathologische Herde übersehen werden (Burnside et al. 2009; Magny et al. 2020). Dies betrifft vorwiegend jüngere Frauen, weshalb man in solch einem Fall ein zweites Diagnostikverfahren, wie eine Biopsie oder/und Sonographie beidseits und der Axillaregionen oder ein Mamma-MRT mit Kontrastmittel beider Mammæ empfiehlt (Wöckel et al. 2018b).

Ein ACR von eins besagt, dass die Mamma fast vollständig lipomatös aufgebaut, somit gut durchsichtig und beurteilbar ist sowie weniger als 25 % Parenchym aufweist. Bei einem ACR von zwei besteht die Mamma aus 25 bis 50 % fibroglandulärem Drüsengewebe, das fleckförmig verteilt und mäßig durchsichtig ist. Dabei können Läsionen kleiner einem cm übersehen werden. Ein ACR von drei besteht aus 50 bis 75 % Mammaparenchym, das inhomogen und heterogen dicht ist. Hierbei kann die Sensitivität der Mammographie erniedrigt sein und ein bis zwei cm große Läsionen können übersehen werden. Eine ACR-Kategorie von vier besagt, dass die Mamma extrem dicht ist und aus mehr als 75 % aus drüsigem Gewebe besteht, wobei die Sensitivität der Mammographie erniedrigt ist und Läsionen größer als zwei cm unerkannt bleiben können (Magny et al. 2020). Das BI-RADS, welches weltweit verwendet wird, ermöglicht die standardisierte mammographische Befunderhebung für Radiologen, um objektive und einheitliche Befundungen von Mammographien zu erheben. Diese beinhalten folgende Beurteilungen der Herdbefunde, wie Verkalkungen, Architekturstörungen und spezielle Auffälligkeiten. Die Beurteilung der Mammographie erfolgt in sieben BI-RADS-Kategorien. Ein BI-RADS von null besagt, dass keine Beurteilung des Mammographiebefundes möglich und weitere bildgebende Diagnostik erforderlich ist. Die BI-RADS-Kategorien 1 und 2 beschreiben einen unauffälligen, normalen und gutartigen Befund. Bei einem BI-RADS-3-Befund wird bei einer vermutlich gutartigen Mammographieaufnahme eine Kontrolle nach sechs Monaten empfohlen. Bei einer Mammographieaufnahme der Kategorie BI-RADS 4, die noch in drei Untergruppen a, b, c unterteilt wird, spricht man von einer verdächtigen und suspekten Auffälligkeit, die einer histologischen Abklärung mittels einer Biopsie bedarf. Ein BI-RADS-5-Befund spricht für einen hochgradigen Karzinomverdacht, der eine histologische Sicherung notwendig macht. Die Kategorie BI-RADS 6 beschreibt ein histologisch gesichertes Karzinom. Für alle Mammographiebefunde, die als BI-RADS 4 (a, b, c) oder 5 kategorisiert werden, soll eine histologische Abklärung durch eine Vakuumbiopsie oder einer Stanzbiopsie erfolgen. Auch bei unstimmen klinischen Bild und bildgebenden Befund oder bei bestehendem Risikoprofil eines Patienten, sollten BI-RADS-3-Befunde ggf. biopsiert werden (Burnside et al. 2009; Magny et al. 2020). Zur Auswertung und Befundung von Mammographieuntersuchungen können Radiologen ein

sogenanntes CAD-Systeme (*computer-assisted detection*) unterstützend verwenden. Der Normalfall sieht jedoch eine Doppelbefundung durch zwei Ärzte vor und bei Auffälligkeiten oder nicht übereinstimmenden Beurteilungen kann eine dritte Meinung eines ausgewiesenen Radiologen zusätzlich eingeholt werden (Taylor und Potts 2008).

1.7.4 Biopsie der Mamma

Die Biopsie ist ein diagnostisches Verfahren zur Gewebeprobeentnahme, die dazu dient, eine fragliche Gewebeansammlung histologisch und zytologisch von einem Pathologen begutachten zu lassen. Die Indikation einer Biopsie ist somit eine positive Mammographieuntersuchung mit einer radiologischen Beurteilung BI-RADS 0, 3, 4 und/oder 5 gegeben. Die entnommenen Zellen und Gewebeproben werden anhand sogenannter Grading-Kriterien beurteilt, wie der Zell- und Kernmorphologie, Mitosen und -figuren sowie die Abweichung von einer regelhaften Zellpolarität und Gewebearchitektur (Sawaki et al. 2018). Von diesem mikroskopischen Befund hängen die weiteren Vorgehensweisen und die folgende medizinische Intervention ab. Es existieren mehrere Biopsieverfahren, die sich bei einer pathologischen Mammographie anschließen können bzw. sollten. Die beste geeignete Biopsiemethode für einen Patienten hängt von diversen Faktoren ab, wie die Größe der Mamma, der vermuteten fraglichen Raumforderung, die Lage, das Aussehen sowie die Beschaffenheit von dem angenommenen verdächtigen Gewebe. Die histologische Diagnostik auffälliger Areale in der Mamma kann mittels einer Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder durch eine offene Exzisionsbiopsie erfolgen. Die genannten Biopsiearten haben alle gemeinsam, dass sie mithilfe einer Hohlnadel erfolgen und so Gewebe und einzelne Zellen entnommen werden können. Die minimalinvasiven Biopsien können ambulant sowie unter Lokalanästhesie durchgeführt werden und dauern oftmals nicht länger als 45 Minuten. Man unterscheidet generell folgende populäre endoskopische Verfahren voneinander, wie die Feinnadelpunktion, Vakuum-Kernnadel- und Hochgeschwindigkeits-Stanzbiopsie (Dahabreh et al. 2014; Wang und Ji 2018). Die Feinnadelaspirationsbiopsie, welche keine Standardmethode darstellt, ist ein perkutanes Verfahren, das mit einer Punktionskanüle, die eine dünne Hohlnadel beinhaltet, durchgeführt wird. Ihr Anwendungsgebiet bezieht sich bei der Mamma auf tumorverdächtige Läsionen. Dabei werden diese mehrfach fächerförmig durchstoßen und mit leichtem Unterdruck können die suspekten Zellen bzw. Zellverbände in die Punktionsnadel aspiriert und so gewonnen werden. Dieses Verfahren kann während der Durchführung durch eine manuelle Tastuntersuchung kontrolliert erfolgen und zusätzlich unter der Zuhilfenahme einer Ultraschall-, CT- und MRT-Untersuchung sowie mammographisch gesteuert gesichert und erleichtert werden (Berner et al. 2011; Böcker et al. 2012).

Liegt der Fall vor, dass einzelne Zellen und kleine Zellkonglomerate für die Diagnose der fraglichen Raumforderung nicht ausreichen und man zusätzlich Informationen über den Aufbau des Zellverbandes im veränderten Gewebe benötigt, sollte eine Stanzbiopsie durchgeführt werden. Hierbei werden Hohlnadeln mit einem größeren Durchmesser verwendet, durch einen Hautschnitt wird diese bis zum verdächtigen Herd vorgeschoben, um einen Zylinder und zusammenhängende Zellverbände aus der suspekten Läsion zu stanzen. Auch bei dieser Methode nehmen Ärzte die bildgebenden Verfahren zur Hilfe (Tse und Tan 2010). Die Vakuum-Stanzbiopsie ist die Methode der Wahl der aktuellen S3-Mamma-Karzinom-Leitlinie und eine Kombination aus einer Kernnadel-Biopsie mit einer Vakuum-Technik, wodurch es möglich ist, mehrere histologische Proben, zwischen 15 bis 36, durch eine kutane Eintrittspforte zu gewinnen. Dieses Verfahren erfolgt generell CT-gesteuert, was eine sehr exakte Entnahme von Zellen der suspekten Herdläsion ermöglicht. Sie wird besonders bei mammographischen Verdacht eines DCIS mit Mikrokalkansammlung empfohlen (Dahabreh et al. 2014; Esen et al. 2016).

Bei der Hochgeschwindigkeitsstanzbiopsie werden üblicherweise sechs bis zehn Gewebeproben entnommen, so wie bei der Vakuum-Stanzbiopsie beschrieben. Diese Entnahme erfolgt, wie der Name schon sagt, indem die Stanzbiopsienadel mit einer hohen Geschwindigkeit mithilfe von automatisierten Systemen in das fragliche Areal eingestochen wird. Selten können Komplikationen bei den Biopsieverfahren auftreten in Form von Blutungen, Infektionen und Wundheilungsstörungen. Kleine Narben können und bleiben jedoch durch die endoskopische Hohlnadeleinführung zurück. In vereinzelt, besonderen Fällen reicht eine Stanzbiopsieprobe nicht für eine sichere morphologische Beurteilung aus, so dass eine offene Biopsie erfolgen muss (Wang et al. 2016).

Die primäre Exzisionsbiopsie, die eine komplette Resektion der Gewebeveränderung meint, wird nur in Ausnahmefällen durchgeführt, wenn das bildgesteuerte Standardverfahren der Wahl nicht möglich oder zu risikobehaftet ist. Die verdächtigen Gewebeneoplasien können bei dieser chirurgischen Diagnostikform in toto entnommen werden und ihre Nachbarschaftsbeziehungen zu dem umliegenden Binde- sowie Nervengewebe, Muskeln als auch zu den Blut- und Lymphgefäßen kann beurteilt werden. Bei einer Inzisionsbiopsie erfolgt nur eine Teilresektion der suspekten Gewebeveränderung. Ziele der Untersuchung der Biopsieproben sind der Erkenntnisgewinn über die eindeutige histologische Beurteilung der verdächtigen Läsion und der damit verbundenen Begutachtung, ob es sich um einen benignen oder malignen Tumor, einen entzündlichen Lokalisationsherd oder ein immunologisches Geschehen handelt. Die Ausdehnung bzw. die Infiltration der auffälligen Raumforderung ins umliegende Gewebe ist ebenfalls von sehr großem Interesse hinsichtlich des Stagings des Mammakarzinoms und der

daraus resultierenden Prognose sowie der Behandlungsstrategie (Dahabreh et al. 2014; Park und Hong 2014; Wöckel et al. 2018b).

1.7.5 TNM-System, Grading, Staging und die Metastasierung des Mammakarzinoms

1.7.5.1 TNM-System

Mithilfe des TNM-Systems klassifizieren Pathologen maligne Tumore nach einem international einheitlichen System, wobei die Abkürzungen für T wie Tumor, N wie *Node* (Lymphknoten) und M wie *metastatis* (Metastasen) stehen. Die UICC (*Union internationale contre le cancer*) ist ein internationaler Ausschuss zur Untersuchung, Prävention und Behandlung von Karzinomen, welcher 1933 gegründet wurde und seit über 50 Jahren die TNM-Klassifikation für alle Krebserkrankungen erstellt, regelmäßig überarbeitet und auf den neuesten Stand der Wissenschaft bringt. Das AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) wurde 1959 gegründet um Klassifizierungssysteme, Stagingvorgaben und Endergebnisberichterstattungen für maligne Erkrankungen zu verfassen und zu veröffentlichen. Diese werden von der Ärzteschaft genutzt, um die wirksamsten Behandlungsstrategien anzuwenden, sind hilfreich zur Bestimmung der Prognose und dienen der laufenden Bewertung der Malignombekämpfungsmaßnahmen. Die von der UICC und AJCC aufgestellte TNM-Stadieneinteilung ist der international anerkannte Standard für die Tumoreinstufung und macht es möglich, dass ein Austausch auf nationaler sowie internationaler Ebene erfolgen kann und erleichtert dadurch den Informationsfluss zwischen Behandlungszentren. Vorteile dieser Regelung sind außerdem, dass die behandelnden Ärzte dem Patienten eine individuell angepasste Therapieempfehlung aus Leitlinien leichter zukommen lassen können, wenn klar definiert ist, wie weit fortgeschritten die Erkrankung ist. So ist das TNM-System Entscheidungsgrundlage für das Behandlungsmanagement und gibt Hinweise auf die individuelle Prognose für einen Patienten (Giuliano et al. 2017; Sawaki et al. 2018; Wöckel et al. 2018b).

Die TNM-Klassifikation des Mammakarzinoms beinhaltet das T-Stadium (Tis, T1-T4) und beschreibt die Größe sowie Ausbreitung des Primärtumors. Das Nodalstatus (N0-N3) gibt an, ob umliegende Lymphknoten ebenfalls von Tumorzellen infiltriert sind. In diesem Fall spricht man von Lymphknoten-Metastasen.

Tabelle 1: TNM-Klassifikation und Tumorstadien des Mammakarzinoms

Stadium	Primärtumor	Lymphknotenstatus	Fernmetastasen
0	*Tis	¹ N0	M0
I	**T1mic	¹ N0	M0
	T1a (1-5 mm)	¹ N0	M0
	T1b (6-10 mm)	¹ N0	M0
	T1c (11-20 mm)	¹ N0	M0
IIA	T0, **T1mic, T1	² N1	M0
	T2 (21-50 mm)	¹ N0	M0
IIB	T2	² N1	M0
	T3 (> 51 mm)	¹ N0	M0
IIIA	T0, **T1mic, T1, T2	³ N2	M0
	T3	² N1	M0
IIIB	⁶ T4	¹ N0-2	M0
IIIC	alle T	⁴ N3	M0
IV	alle T	alle N	⁵ M1
¹ N0 (Keine) ² N1 (1-3 LK in der Axilla und/oder der ipsilateralen Mammaria-Interna-Region) ³ N2 (4-9 LK in der Axilla) ⁴ N3 (> 10 LK in der Axilla und/oder Befall intra- oder supraclavikulärer LK) ⁵ M1 (Metastasen außerhalb der Brust und der benachbarten LK-Region) ⁶ T4 (Infiltration der Brustwand und/oder der Haut und/oder ipsilaterale Satellitenmetastasen und/oder inflammatorisches Mammakarzinom)			
*Tis: <i>in-situ</i> Karzinom; **T1mic: Mikroinvasion 0,1 cm oder weniger im größten Durchmesser			

Tabelle 1 wurde modifiziert nach Wöckel et al. (2018b) und Piñeros et al. (2019).

M0-M1 steht dabei für das Nicht- bzw. das Vorhandensein von malignen Tumorzellen in anderen Organen bzw. Körperabschnitten. Diese werden als Fernmetastasen bezeichnet. Die Ziffern beim T- Stadium stehen dabei mit höher werdender Zahl für eine Größenzunahme des Tumors

(in cm), wobei die Zahl Null beim N- und M-Stadium für das Nichtvorhandensein von Lymphknoten- oder Fernmetastasen steht. N1, N2 und N3 stehen für den Nachweis von Tumorzellen in immer mehr oder immer weiter vom Primärtumor entfernten regionären Lymphknoten (Giuliano et al. 2017; Piñeros et al. 2019; Sawaki et al. 2018).

1.7.5.2 Grading

Pathologen erheben anhand einer histologischen Tumorprobe den Differenzierungsgrad (Grading) des Tumors, indem bestimmt wird, wie groß die Abweichung bzw. Entdifferenzierung der Tumorzellen vom gesunden Ursprungsgewebe ist, was gleichzeitig auch Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumors zulässt. Die allgemeine Klassifikation des Gradings von Karzinomzellen umfasst die Einteilung in Grad 1 bis Grad 4 sowie den Grad 9/X, der für Tumorzellen verwendet, deren Grad der Differenzierung nicht beurteilt werden kann. Maligne Zellen, die gut differenziert sind und eine hohe Übereinstimmung mit dem Ursprungsgewebe aufweisen werden als Grad 1 (G1, *low grade*) eingestuft. Grad 2 (G2, *intermediat*) - Tumorzellen sind mäßig differenziert, weisen maligne Zellen eine schlechte Differenzierung auf, spricht man von Grad 3 (G3, *high grade*) - Karzinomzellen, maligne und bei Grad 4 (G4) - Tumorzellen sind diese undifferenziert bzw. anaplastisch und können keinem Ursprungsgewebe mehr zugeordnet werden. Ist dies der Fall, macht man sich immunhistochemische Untersuchungen zu Nutze. Das Grading aller invasiven Mammakarzinome erfolgt nach dem sogenannten Nottingham-System, auch bekannt als Bloom-Richardson-Elston-Klassifizierungsschema (BRE-Score). Die drei Kriterien des BRE-Score des Mammakarzinoms umfassen das Ausmaß der Tubulusbildung, welche als prozentualer Anteil innerhalb des Tumorgewebes angegeben wird (> 75 % 1 Punkt; 10 % bis 75 % 2 Punkte; < 10 % 3 Punkte). Des Weiteren werden vom Pathologen die Kernpolymorphien, wie Kerngröße, -form und Vielgestaltigkeit, befundet (gering ein Punkt, mäßig zwei Punkte, stark drei Punkte). Außerdem wird die mitotische Aktivität, also das Vorhandensein von teilungsfähigen Tumorzellen mikroskopisch analysiert, was als Maß für das Tumorstadium verwendet wird ((Sehfeldzahl (SFZ) 25: mitotische Zellen null bis zehn 1 Punkt; elf bis 20 2 Punkte; > 20 3 Punkte)). Jedes dieser Kriterien wird mit einer Punktzahl von eins bis drei bewertet, wobei eine Punktzahl von eins bedeutet, dass die Zellen und das Tumorgewebe dem gesunden Epithel und Epithelzellen nahezu gleichen, wohingegen eine Punktzahl von drei beschreibt, dass die Tumorzellen sich stark vom gesunden Mammageewebe unterscheiden. Die Gesamtpunktzahl addiert sich dann aus den Einzelpunkten der drei Kategorien, wobei sich diese dann auf eine Punktzahl von drei bis neun beläuft. Die Bewertung der Gesamtpunktzahl und des BRE-Scores mit einem Punktescore von drei bis fünf entspricht dann einem G1-Tumor, ein Score von sechs bis sieben einem G2-Tumor und einem Score von

acht bis neun wird als G3-Tumor klassifiziert. Mammakarzinome mit G1- oder G2-Tumorzellen neigen im Gegensatz zu malignen Tumoren mit einem höheren Differenzierungsgrad zu einem langsameren und weniger invasiven Wachstum mit einer guten Prognose. Daher können niedriggradigere Karzinome weniger aggressiv behandelt werden und weisen eine bessere Überlebensrate auf. Hochgradigere Tumore mit einer mäßigen oder schlechten Prognose rechtfertigen eine aggressive Behandlung (Bloom und Richardson 1957; Christgen et al. 2016; Giuliano et al. 2017; Rakha et al. 2010).

1.7.5.3 Molekulare Subtypen

Die molekulare Subtypeneinteilung des Mammakarzinoms beeinflusst die Therapiestrategie, besonders wenn ein adjuvantes Therapieregime erwägt wird. Da die Subtypen anhand ihres Genexpressionsmusters unterschieden wurden und diese Analysen einen hohen Kosten- sowie Zeitaufwand darstellen, fokussiert man sich seit der Konsensuskonferenz zur Therapieempfehlung des Mammakarzinoms in St. Gallen (2011) auf die Surrogatparameter (Goldhirsch et al. 2011). Die Surrogatparameter, die immunhistochemisch analysiert werden, sind beim Mammakarzinom die schon geschriebenen Östrogen- (ER), Progesteron (PR)- und *Her2/neu*-Rezeptoren. Ebenfalls werden das histologische Grading sowie die Bestimmung der Expressionsrate des Proliferationsmarkers Ki-67 (Kiel, 67. Antikörperklon) zur Subtypisierung hinzugezogen. Das nukleäre Protein Ki-67 lässt Rückschlüsse auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumorzellen zu (Scholzen und Gerdes 2000). Diese Zusammenschau der einzelnen Parameter ist ausschlaggebend und prognosebeeinflussend für die Therapie des Mammakarzinoms in der adjuvanten sowie palliativen Gesamtsituation des Patienten (Goldhirsch et al. 2011; Dowsett et al. 2011).

Tabelle 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms

Molekularer Subtyp	Subgruppe	Definition	Anmerkungen
Luminal A		<ul style="list-style-type: none"> • ER und PgR positiv • <i>Her2</i> negativ • Ki-67 niedrig 	"luminal A-like"
Luminal B	<i>Her2</i> negativ	<ul style="list-style-type: none"> • ER positiv und eines der folgenden Kriterien: • PgR negativ • Ki-67 hoch 	"luminal A-like" <i>Her2</i> negativ
	<i>Her2</i> positiv	<ul style="list-style-type: none"> • ER positiv • <i>Her2</i> überexprimiert oder amplifiziert • Ki-67 niedrig oder hoch 	"luminal A-like" <i>Her2</i> positiv
<i>Her2 enriched</i>		<ul style="list-style-type: none"> • <i>Her2</i> überexprimiert oder amplifiziert • ER und PgR negativ 	
<i>Basal like</i>		<ul style="list-style-type: none"> • ER und PgR negativ • <i>Her2</i> negativ 	weitgehende Überlappung mit dem triple-negativen Karzinom
<p>ER = Östrogenrezeptor PgR = Progesteronrezeptor Ki-67 = Proliferationsmarker <i>Her2</i> = <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i></p>			

Tabelle 3 zeigt die molekularen Subtypen des Mammakarzinoms, welche modifiziert nach Goldhirsch et al. (2011) wurde.

1.7.5.4 Staging

Eine zielgerichtete Suche nach Metastasen und Fernmetastasen ist nach der Diagnose eines Mammakarzinoms bei einem Tumorstadium größer gleich II a ($\geq pT2 > pN0$) dringend empfohlen, da die Metastasierung früh im Erkrankungsverlauf stattfindet und fast alle Körperregionen betreffen kann. So erfolgt sie in der Regel primär lymphogen, vor allem in die ipsilateralen Lymphknoten der Axilla sowie hämatogen. Besonders in Knochen, Lunge, Leber und dem zentralen Nervensystem sind Fernmetastasen zu finden. Daher ist das Wissen des anatomischen Aufbaus der Mamma und der Verlauf der Gefäße von entscheidender Bedeutung, um das Metastasierungsverhalten des Mammakarzinoms zu verstehen. Die Ausbreitungsdiagnostik beim Mammakarzinom beinhaltet bei dem Verdacht auf Skelettmastasen die Durchführung einer Skelettszintigraphie oder alternativ kann auch eine MRT- bzw. CT-Untersuchung erfolgen. Bei Indizien auf Lebermetastasen sollte eine Sonographie bzw. eine Computertomographie des Abdomens durchgeführt werden. Liegt ein klinischer Verdacht auf Lungenmetastasen vor, ist die Untersuchung der ersten Wahl eine CT-Aufnahme des Thorax. Bei klinischen Anzeichen von Metastasen im ZNS ist die bildgebende Darstellung mittels MRT bzw. CT indiziert (Giuliano et al. 2017; Wöckel et al. 2018b).

Mit Hilfe des TNM-Systems, Gradings und Stagings kann die bestmögliche Therapie für den Patienten festgelegt werden.

1.7.5.5 Prävention des Mammakarzinoms und Vorsorgeuntersuchungen

Bei der Prävention und Vorsorge- sowie Nachsorge steht die körperliche Untersuchung durch einen Arzt mit Inspektion und Palpation der beiden Mammae als erstes an. Diese ist Bestandteil der gesetzlichen Früherkennung von Mammakarzinomen für Frauen ab dem 30. Lebensjahr. Wird eine Raumforderung palpatorisch gefunden, handelt es sich häufig um ein Mammakarzinom, dessen TNM-Stadium T2 oder höher ist. Es schließt sich ein bildgebendes Verfahren und ggf. eine Biopsie an. Die Palpation des Lymphabflusses der Mammae und der entsprechenden axillären, supra- und infraklavikulären Lymphknoten beidseits ist ebenso wichtig. Sie ist indiziert bei einem Verdacht auf ein tumoröses Geschehen und wird auch stets im Rahmen des zur Verfügung stehenden Präventionsprogramms angeboten. Da bei der Diagnose durch eine Tastuntersuchung häufig erst höhere Tumorstadien (T2 oder höher) entdeckt werden, wurde im Jahr 2005 in Deutschland das zweijährliche Mammographie-screening für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren eingeführt, dessen Kosten durch die gesetzlichen Krankenversicherungen übernommen werden. Die Frauen im besagten Alter erhalten hierzu eine schriftliche Einladung in eine der 94 Mammographie-Screening-Einrichtungen mit Hilfe der Einwohnermeldeamtsdaten

in Deutschland (Giuliano et al. 2017; Malek und Kaab-Sanyal 2016; Wöckel et al. 2018a; Wöckel et al. 2018b).

1.7.5.6 Therapie des Mammakarzinoms

Das therapeutische Vorgehen hängt vom Tumorstadium (lokal begrenzt, lokal fortgeschritten oder fernmetastasiertes Mammakarzinom) und der kurativen oder palliativen Gesamtsituation ab. Von entscheidender Bedeutung ist vor allem das Karzinomstadium sowie die Karzinomentität inklusive aller relevanten Zusatzbefunde, wie dem histo-pathologischen Befund mit der Proliferationsrate der Tumorzellen (Ki-67-Index/-Marker), dem Hormonrezeptorstatus, der *Her2/neu*-Expression sowie dem individuellen Risikoprofil des Patienten (Wöckel et al. 2018b). Die Diagnostik sowie die Therapieentscheidung über das jeweilige Mammakarzinom werden zumeist in zertifizierten Brustkrebszentren durchgeführt und die exakte therapeutische Strategie jedes Patienten wird individuell in einer Tumorkonferenz, auch Tumorboard genannt, beschlossen. Diese Tumorkonferenz ist eine interdisziplinäre Fallbesprechung aus behandelnden Ärzten, wie Onkologen, Radiologen, Pathologen, Chirurgen und Strahlentherapeuten. Die unterschiedlichen Therapiemaßnahmen des Mammakarzinoms umfassen die Behandlungsmöglichkeiten, wie der operativen Entfernung der pathologischen Raumforderung als brusterhaltende Tumorsektion (BET) oder als komplette Mastektomie, die mit oder ohne Rekonstruktion durchgeführt werden kann. Bei invasiv wachsenden Mammakarzinomformen und einer erfolgten BET ist es zwingend notwendig eine adjuvante lokale Radiatio anzuschließen um das Lokalrezidivrisiko zu senken (Sedlmayer et al. 2013).

Ein operatives Verfahren ggf. mit oder ohne Ausräumung des befallenen Lymphabflussgebietes muss erwogen werden sowie der darauffolgenden eventuellen Bestrahlung dieses nach operativer Lymphonodektomie (Wöckel et al. 2018b).

Die Axilladissektion, die Entfernung von mind. zehn Lymphknoten aus der Achselhöhle, wird nicht mehr generell bei allen invasiven Mammakarzinomen empfohlen und durchgeführt (Wöckel et al. 2018a).

Zudem stehen unterschiedlichste systemische Chemotherapieoptionen zur Verfügung, die primär neoadjuvant oder adjuvant sowie in kurativer als auch palliativer Intention Anwendung finden. Die lokale Radiatio und endokrine sowie immunsystemstimulierende Therapieverfahren stellen ebenfalls Therapieansätze dar und werden auch oft in Kombination angewandt (Wöckel et al. 2018a; Wöckel et al. 2018b).

1.7.6 Ziele der Arbeit

In Anbetracht dessen, dass neben eines umassenden Stagings auch die histopathologische Bestimmung des molekularen Subtyps sowie von Surrogatparametern für eine geeignete und individuell abgestimmte Mammakarzinomtherapie von entscheidender Bedeutung sind, kann die Ermittlung von vorhandener, zirkulierender, hypermethylierter Tumor-DNA in EDTA-Plasma bei Mammakarzinompatienten ein mögliches hilfreiches ergänzendes Untersuchungsverfahren für die Früherkennung, die Feststellung eines Therapieerfolgs oder die Diagnosestellung eines Mammakarzinomrezidivs sein. Aus der Literaturrecherche ergaben sich folgende Forschungsfragen, die experimentell bearbeitet wurden. Zum Einen, ob hypermethylierte Gensequenzen in den Promotor-Regionen von *APC*, *ESR1*, *DKK3*, *HOX B4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* im Plasma von Patientinnen/Patienten mit Mammakarzinom unterschiedlicher Tumorstadien und ausgewählten Mammakarzinom-Zelllinien nachweisbar sind und des Weiteren, ob Alkohol- bzw. Nikotinkonsum, die ethnische Herkunft und/oder das Alter Auswirkungen auf den Methylierungsstatus der genannten Promotor-Regionen haben.

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign und Patientenauswahl

Für diese Dissertation wurde eine Ein-Schritt Real-Time PCR als Methode zum Nachweis Mammakarzinom-assoziiertes, hypermethylierter Promotor-Regionen etabliert. Nach Abschluss der Methodenentwicklung wurde die Methylierung der Gene *APC*, *ESR1*, *DKK3*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* an isolierter DNA aus EDTA-Blut-Proben von 40 Kontrollpersonen, die sich aus 23 weiblichen und 17 männlichen freiwilligen Blutspendern zusammensetzten, und 28 Patienten mit Mammakarzinom (27 weibliche und ein männlicher) analysiert. Die Blutspenderprobanden gaben hierzu schriftlich ihr Einverständnis, dass während ihrer freiwilligen Blutspende in der transfusionsmedizinischen Abteilung zusätzliche Monovetten Blut zu wissenschaftlichen Zwecken abgenommen werden dürfen. Für die Studie wurde von der Ethikkommission Göttingen ein positives Votum erteilt (Antragsnummer 21/12/14). EDTA-Plasmaproben von Patienten mit Mammakarzinom wurden von einer Biobank (Conversant Biologics, Huntsville, USA) erworben. Es erfolgte die methylierungsspezifische Analyse bereits extrahierter DNA aus Zellkulturen von drei Mammakarzinom-Zelllinien *MDA-MB-231*, *MCF7* und *T47D*, die mir freundlicher Weise von der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt wurden.

2.2 Materialverarbeitung

Direkt nach der Blutentnahme bei den Blutspendern erfolgte die Zentrifugation (Hettich Zentrifuge, Rotixa 120 R) der Blutproben für 10 Minuten bei 2200 *rpm*, bei 1350 g ohne Bremse. Aus jeder Blutprobe konnte circa 4 ml EDTA-Plasma gewonnen werden, welches zu 1,5 ml Aliquots bis zur DNA-Isolation bei -20°C gelagert wurde. Informationen bezüglich des Alters und Geschlechts wurden neben einer anonymisierten Probandennummer dokumentiert. Die Patientenproben, gefrorenes EDTA-Plasma, wurden vor einer systemischen Therapie sowie vor einer operativen Tumorentfernung abgenommen und in Aliquots zu je 500 μ l bei -40°C gelagert. Metadaten über Geschlecht, Alter, Ethnologie, Raucher- und Alkoholgenuß sowie über das Tumorstadium bezüglich der Mammakarzinompatienten wurden ebenfalls von der Biobank mitgeteilt. Das Patientenkollektiv wurde so zusammengestellt, dass alle Tumorstadien untersucht werden konnten.

2.3 Oligonukleotide

Für diese wissenschaftliche Arbeit zur Detektion tumorassoziierter Hypermethylierungen unter Verwendung einer *Real-Time*-PCR wurden nach einer Literaturrecherche die epigenetischen Tumormarker *APC*, *ESR1*, *DKK3*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* für die experimentelle Analyse ausgewählt. Mithilfe der Gen-Datenbank Ensembl (Project of EMBL-European Bioinformatics Institute and Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK) konnten die einzelnen Gen-Sequenzen der oben genannten Gene entnommen und so die CG-reichen Promotor-Regionen der einzelnen Gene visuell dargestellt werden. Auf diese Weise wurden die hypermethylierten Promotorregionen, die in der Literatur mit einem Mammakarzinom assoziiert wurden, als Grundlage für das eigene Primerdesign identifiziert. Die Arbeit von Radpour et al. (2011) diente als Quelle zur Erstellung der Primer für das *APC*-Gen sowie Chimonidou et al. (2013) für *SOX17*. Für das *ESR1*-Gen wurden die Schriften von Matuschek et al. (2010) sowie und Martinez-Galan et al. (2014) zur Primererstellung genutzt. Die Untersuchung von Kloten et al. (2013) war die Grundlage für das *DKK3*-Primerdesign und für *RAR β 2* Rykova et al. (2008). Die *Forward*- und *Reverseprimer* des *HOXB4*-Gens wurden basierend auf der Untersuchung von Fackler et al. (2014) konzipiert sowie von *MAL* nach Guerrero-Preston et al. (2014) und Agostini et al. (2012). Die Erstellung eigener Primer- sowie fluoreszenzmakierter SONDENSEQUENZEN erfolgte, indem das Programm OLIGO Primer Analysis Software 6.7.1 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, USA) angewendet wurde. Eine Vorbehandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit erfolgte nicht, was in der hier vorliegenden Arbeit zur Einführung des Begriffs der Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR führte. Die Herstellung unmodifizierter Primer (Oligonukleotide) erfolgte durch die Firma Purimex (Grebenstein, Deutschland). Fluoreszierende Sonden wurden von Life Technologies (Life Technologies GmbH, Darmstadt) synthetisiert (vgl. Tabelle 3). Die Primer und Sonden wurden in Aliquots zu je 20 μ l nach Zugabe von 1 mM TRIS-HCL (Bestell-Nr.: AM9855G, Ambion® Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) und in Amplifikationsprimer-Konzentrationen von 50 pmol/ μ l und für die Sonden mit einer Konzentration von 20 pmol/ μ l bei -20°C aufbewahrt. Damit es zu einer Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase kommen kann, muss die Sonde zuvor stabil an die Zielsequenz hybridisiert haben.

Tabelle 3: Primer und Sondensequenzen der Promotorregionen sowie der internen Referenzgene

Gene	<i>Forward-Primersequenz (5'-3')</i>	<i>Reverse-Primersequenz (3'-5')</i>	Sondensequenz
<i>APC</i>	<i>TTACTATGCGTGTCAACTGCCA</i>	<i>GCCTGCCTAGCCCTAGCC</i>	FAM* <i>-CAGTCCCCAGCAAGCAAGGAA-MGB**</i>
<i>DKK3</i>	<i>TTGCGGGCTCCCTCGG</i>	<i>GGGCTGCGGGTGCAGAT</i>	FAM- <i>ACCGGCGCTGCCGCACC-MGB</i>
<i>ESR1</i>	<i>TGCGGGGACACGGTCTG</i>	<i>GCTCGTTCCCTTGGATCTGA</i>	FAM- <i>ACCCTCCACACCAAAGCATCTG-MGB</i>
<i>HOXB4</i>	<i>CACTCGCCCGGGTACTACG</i>	<i>AGCGCTGCACGGTGCAC</i>	FAM- <i>CTTCCAGCCGGAGGCGG-MGB</i>
<i>MAL</i>	<i>CGAAGAGGTTTCAGGGCGG</i>	<i>CCGGGGCAGAAGAGGGA</i>	FAM- <i>TCGGGCCGGGTCTCCC-MGB</i>
<i>RARB2</i>	<i>TGAGGACTGGGATGCCGAG</i>	<i>AAAAGCCTTCCGAATGCGT</i>	FAM- <i>ATCCGAGCAGGGTTTGTCTGG-MGB</i>
<i>RASSF1A</i>	<i>AGCCTGAGCTCATTGAGCTG</i>	<i>GACCAGCTGCCGTGTGG</i>	FAM- <i>CCAACGGCTGCCCAT-MGB</i>
<i>SOX17</i>	<i>GTGTCACTAGGCCGGCTGG</i>	<i>TGAGATGCCCGAGGGC</i>	FAM- <i>CGACAGGCCAGAACACGGG-MGB</i>
<i>β-Actin</i>	<i>GCGCCGTTCCGAAAGTT</i>	<i>CGGCGGATCGGCAA</i>	NED***- <i>ACCGCCGAGACCGCGTC-BHQ****</i>
<i>β-Globin</i>	<i>GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA</i>	<i>CCTTGATACCAACCTGCCAG</i>	VIC*****- <i>AGGTGAACGTGGATGAAGTTGGT-BHQ</i>

*FAM = 6-Carboxy-Fluorescein, **MGB = Minor Groove Binder, ***NED = gelber Fluoreszenzfarbstoff, ****BHQ = Black Hole Quencher, *****VIC = 2'-Chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein

Die Tabelle 3 zeigt die Primer und Sondensequenzen der Promotorregionen *APC*, *ESR1*, *DKK3*, *HOXB4*, *MAL*, *RARβ2*, *RASSF1A*, *SOX17* sowie der internen Referenzgene *β-Globin* und *β-Actin*

2.4 DNA-Proben und -Kontrollen

Anhand von erworbener unmethylierter DNA (Human Genomic DNA, Bestell-Nr.: 11691112001, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim), welche als Negativkontrolle verwendet wurde und einer Positivkontrolle, welche eine komplett methylierte kommerziell erstandene Kontroll-DNA (CP Genome™ Human Methylated DNA, Bestell-Nr.: S8001M, Merck Millipore, Darmstadt) darstellt, sowie an der Tumor-DNA der Mammakarzinom-Zelllinien *MDA-MB-231*, *MCF7* und *T47D* wurden die erstellten Primer und Sonden auf ihre Funktionalität überprüft. Zunächst erfolgte die Testung der Bindungsfähigkeit von Primer und Sonden an methylierter und nicht methylierter DNA-Kontrollen ohne Zusatz des methylierungsabhängigen Restriktionsenzym *BstUI*, ohne β -Actin und ohne β -Globin. Danach führte ich die Untersuchungen mit dem Enzym *BstUI* und mit Oligonukleotiden zum Nachweis von β -Actin und β -Globin durch. Daraufhin folgte die Konzentrationstitration der eingesetzten Primer und Sonden. Anschließend wurde die Testung der Bindungsfähigkeit von Primer und Sonden an methylierter DNA der Tumorzelllinien *MDA-MB-231*, *MCF7* und *T47D* jeweils mit und ohne Enzym *BstUI*, in Gegenwart der Kontrollen β -Actin und β -Globin zur Methodenoptimierung angesetzt. Es folgte ebenfalls die Testung der Bindungsfähigkeit der Primer und Sonden sowie des Methylierungsstatus an zirkulierender DNA im Plasma gesunder Probanden (n = 40) sowie der Mammakarzinom-Plasmaproben (n = 28) nach DNA-Isolation.

Die Sensitivitätsbestimmung erfolgte, indem unmethylierte DNA- mit methylierten DNA-Kontrollen verglichen wurden, die Titration zur Ermittlung der Nachweisgrenzen für Mammakarzinom-DNA (Ct-Werte in Abhängigkeit der Konzentration methylierter DNA) angeschlossen wurde und die Testung der Bindungsfähigkeit von Primer und Sonden an Mammakarzinom-DNA ausgewertet wurde. Die Spezifitätsermittlung gelang durch die Untersuchung der Kontroll-DNA aus Plasmaproben gesunder Blutspender (n = 40) nach DNA-Isolation.

2.5 Lagerung der Materialien

Die Aufbewahrung der DNA-Testmaterialien fand bis zu ihrem Gebrauch für die Kontroll- und Zelllinien-DNA bei -20°C und für die der Blutspender- und Patientenplasmen bei -40°C statt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden stets getrennt von den *Real-Time*-PCR-Materialien gelagert. Die erwähnten Kontroll-Materialien wurden in jedem PCR-Lauf sowohl bei der Testung der gesunden Blutspender- also auch bei der Testung der Patienten-DNA

mitgeführt. Die Ausgangskonzentration der unmethylierten Negativkontrolle von 200 ng/ μ l sowie die der methylierte Positivkontrolle von 250 ng/ μ l wurde mit Wasser (Ambion®-*No-cleave-Free-Water*, Bestell-Nr.: 4387936, Ambion® by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) auf eine Konzentration von 87 pg/ μ l für die Negativkontrolle und auf 200 pg/ μ l für die Positivkontrolle verdünnt.

2.6 Mammakarzinom-Zelllinien

Die analysierte Zelllinie *MDA-MB-231* und deren Zellen entstammen von einer 51-jährigen Mammakarzinom-Patientin. Die isolierten Zellen exprimieren *EGF* (Epidermalen Wachstumsfaktor) sowie *TGF- α* , einem transformierenden Wachstumsfaktor. Zudem sind die Zellen numerisch aberrant und die Chromosomen N8 und N15 sind nicht vorhanden. Diese Zelllinie hat ein fibroblastoid-gestrecktes Wachstum und ist somit stark invasiv wachsend (Satya-Prakash et al. 1981).

Die Brustkrebs-Zelllinie *MCF7*, welche Abkürzung für Michigan Cancer Foundation-7 steht, wurde einer kaukasischen, weißen 69-jährigen Frau aus ihrer 1970 amputierten Mamma entnommen und diese Zellen anschließend kultiviert. Einige Mammaepithel Eigenschaften sind noch immer vorhanden, beispielweise reagieren die Zellen auf eine Östrogenbehandlung mit einer Zellproliferation, da sie noch immer den zytoplasmatischen Östrogenrezeptor haben und daher östrogensensibel sind (Soule et al. 1973).

Die Zellen der Brustkrebszelllinie *T47D* wurde aus dem Pleuraerguss einer 54-jährigen Mammakarzinompatientin isoliert. Das Brustkrebsgewebe verfügt über intrazelluläres Casein sowie spezifische Rezeptoren für Steroide, Östradiol, Progesteron, Glucocorticoide und Androgene. Zudem weisen die kultivierten Zellen einen aneuploiden Karyotyp mit 66 Chromosomen, darunter ein sehr langes subtelozentrisches Chromosom, auf (Huguet et al. 1994; Keydar et al. 1979).

Die Zelllinien-DNA *MDA-MB-231*, *T47D* und *MCF7* wurden mir mit Ausgangskonzentrationen von 55 ng/ μ l (*MDA-MB-231*), 55 ng/ μ l (*T47D*) und 45 ng/ μ l (*MCF7*) aus der Universitätsklinik Göttingen für Gynäkologie und Geburtshilfe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese wurden unter Nutzung von 1mM TRIS-HCL-Pufferlösung (pH = 8,1) (Bestell-Nr.: AM9855G, Ambion® by Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) auf Konzentrationen von jeweils 200 pg/ μ l verdünnt.

2.7 Isolation der DNA aus Blutspender- und Patientenplasmaproben

Vor der Analyse der 40 Blutspender- und 28 Patientenplasmaproben mittels der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR, musste aus den zuvor tiefgefroren gelagerten EDTA-Plasmen die DNA isoliert werden. Die DNA-Isolation aus Plasma wurde mittels des Nukleinsäure-Extraktionsautomat *Chemagic Magnetic Separation Module 1* (MSM1, PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Baesweiler) mit Hilfe des *Chemagic Viral DNA/RNA Kit Special* (PerkinElmer Chemagen Technologie GmbH, Baesweiler) nach dem Chemagic 1K Protokoll (Version 050601) durchgeführt. Zunächst wurde von jeder Probe 1 ml gefrorenes Plasma bei Raumtemperatur aufgetaut und zu diesem in ein Reaktionsgefäß 1,2 ml *lysis buffer*, 7 µl Poly(A)RNA sowie 10 µl Protease hinzugefügt. Nach einer Inkubation des Gemisches in einem Wasserbad von 55°C für 5 Minuten, erfolgten weitere zwei Pipettierschritte, indem 50 µl *Magnetic Beads* Suspension sowie 4 ml *binding buffer 2* in den Reaktionsansatz hineingegeben wurde. Nach dieser Vorbehandlung der Plasmaproben, konnte nun mit dem Extraktionsautomaten die DNA-Isolation durch eine magnetische Separation erfolgen. Das oben genannte Programm verfuhr in drei Schritten, die insgesamt 68 Minuten dauerten. Die finalen Schritte der DNA-Aufreinigung beinhaltete zwei Waschschriffe mit jeweils einem Waschpuffer (*wash buffer 3* und 4) und den letzten Schritt der Elution von ungefähr 80 bis 100 µl DNA in *elution buffer* (10 mM Tris HCl, pH 8). Mit dem Chemagen-Automaten kann man bis zu zwölf Plasma-Proben gleichzeitig aufreinigen.

2.8 Restriktionsenzym

Für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR wurde die Restriktionsendonuklease *BstUI* (Bestellnummer: R0518L, New England Biolabs Inc., Ipswich, USA), welches ein Enzym aus dem *Bacillus stearothermophilus U458* (*BstUI*), (Nishigaki et al. 1985; Polisson und Morgan 1990; Wei et al. 2008) stammt, benutzt. In der Dissertation von Tobias Thormann zeigte sich, dass das Enzym *BstUI* für das hier angewandte quantitative, methylierungsspezifische real-time PCR-Verfahren gegenüber des identischen Testverfahrens mit anderen Enzymen überlegen war (Thormann 2015). Die optimale Reaktionstemperatur liegt für *BstUI* bei 60°C, weshalb die Inkubation auch bei dieser Temperatur stattfand. Die Lagerung des Enzyms erfolgte ebenfalls bei -20°C.

2.9 Methylierungsspezifische *Real-Time*-PCR

2.9.1 Quantitative *Real-Time*-PCR

Die für diese wissenschaftliche Arbeit eingesetzte *Real-Time*-TaqMan™-PCR (Applied Biosystems® by Life Technologies, Foster City, USA) ist eine Sonderform des allgemeinbekannten Standard-PCR-Verfahrens zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Diese spezielle Echtzeit-PCR (*real-time*) ermöglicht zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA bzw. der amplifizierten Genfragmente. Das Einsatzgebiet der *real-time*-PCR ist sehr vielfältig und umfangreich. So kann man zur Erkennung von Erbkrankheiten, zur Bestimmung der Viruslast nach Infektionen oder zur Quantifizierung von Genexpressionen diese Methode bestens einsetzen. Zur Quantifizierung der gewünschten PCR-Produkte wurde eine sogenannte TaqMan-Sonde, die in Form von sequenzspezifischen, fluoreszenzfarbstoffmarkierten Oligonukleotide eingesetzt wurde, verwendet. Diese TaqMan-Sonde verfügt über Komponenten, wie einen *minor groove binder* (MGB) sowie einen nicht fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende. Der MGB verfügt über die Eigenschaft an der kleinen Furche der DNA zu binden, was zur Erhöhung der Schmelztemperatur (T_m) der Sonde führt. Daher ist es möglich kürzere Sonden einzusetzen, die aufgrund der größeren Schmelztemperaturen eine höhere Affinität zur doppelsträngigen DNA aufweisen (Kumar und Rajagopal 2008). Die eingesetzten fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden, auch sogenannte Hydrolyse-Sonden, verfügen zusätzlich über einen Reporter, der am 5'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein), einem Fluorophor-Donor, gebunden hat. Der Quencher, der sich am 3'-Ende befindet, fungiert als Akzeptor und wird auch als MGB bezeichnet. Da dieser nicht fluoresziert, können die SDS-Geräte die Beiträge der Reporter-Farbstoffe genauer messen, da der Quencher die spektrale Auflösung bei Verwendung mehrerer Farbstoffe in einer Reaktion erhöht, indem das Signal des Fluoreszenzfarbstoffs am 5'-Ende der TaqMan-Sonde durch den nicht fluoreszierenden Quencher am 3'-Ende unterdrückt wird. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe verfügen zusätzlich über unterschiedliche Emmissionsmaxima, wodurch eine Multiplex-*Real-Time*-PCR ermöglicht wird. Die Sonden der internen Referenzgene β -Globin und β -Actin sind am 5'-Ende mit den Farbstoffen NED bzw. VIC versehen und verfügen am 3'-Ende über einen BHQ. Zu Beginn der etablierten *Real-Time* PCR kommt es zur Temperaturerhöhung, sodass die doppelsträngige cDNA denaturiert. Es folgt die Annealingphase, in der die Reaktionstemperatur gesenkt wird, damit die jeweiligen Primer und Sonde an ihren spezifischen Zielsequenzen binden und hybridisieren können. Die verwendete Taq-Polymerase (AmpliTaqGold™), die neben der Polymeraseaktivität über eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität verfügt, baut die Sonde während der Synthese des Gegenstranges

am 5'-Ende ab und hydrolysiert diese. Es kommt dadurch zu einer Unterdrückung einer strahlungsfreien Energieübertragung, des sogenannten Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Der FRET besteht darin, dass der Reporter, das Donor-Fluorochrom, durch eine Lichtquelle angeregt wird und so einen Teil seiner Energie an ein in ausreichender Nähe befindliches Akzeptor-Fluorochrom, dem Quencher abgibt (Förster 1948). Der Abstand zwischen Quencher und Fluorophor vergrößert sich nach Spaltung durch die Polymerase und diese entfernen sich entsprechend voneinander, sodass nun nicht mehr durch den Quencher die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt wird. In der Folge kann eine steigende Reporter-Fluoreszenz detektiert werden. In einem PCR-Zyklus bindet die TaqMan-Sonde an die Zielsequenz, sodass diese mit dem komplementären DNA-Strang hybridisiert. Mit jedem PCR-Zyklus wird mehr Fluoreszenz generiert und freigesetzt, sodass deren Messung am Ende der Elongation stattfindet. Diese Methode trägt so entscheidend zur hohen Spezifität des Verfahrens sowie zu einer gesteigerten Detektionspräzision bei, da der Anstieg der Fluoreszenz der Zunahme an Amplifikaten direkt proportional ist (Bustin und Wittwer 2017; Higuchi et al. 1992; Holland et al. 1991; Kubista et al. 2006, Lee et al. 1993). Unter der Verwendung des 7300 Real-Time-PCR-System (Applied Biosystems® by Life Technologies, Foster City, USA) wurde die Detektion des Fluoreszenzsignals durchgeführt und mit Hilfe der entsprechenden Software (7300 System SDS RQ Study Software, Applied Biosystems®) konnte eine Amplifikationskurve generiert werden. Damit man die ermittelten Messergebnisse miteinander vergleichen kann, korrigiert man die Zunahme des Fluoreszenzsignals des Reporterfarbstoffs R um den Fluoreszenzwert der Basislinie. Die Basislinie entsteht durch die Anfangszyklen der PCR, bei denen nur geringe Veränderung des Fluoreszenzsignals auftreten. So erhält man das Delta R. Außerdem wurden allen Reaktionsansätzen ein fluoreszierender Referenzfarbstoff ROX (ein komplexes Farbstoffgemisch mit dem Hauptbestandteil 6-carboxy-X-Rhodamine) in gleicher Menge hinzugefügt, um eine Abgleichung möglicher sondenspezifischer Fluoreszenzunterschiede sichtbar zu machen, die aufgrund von unterschiedlichen Volumina, wie beispielsweise durch Pipettierfehler, oder durch verunreinigte Reaktionsgefäße entstehen können. Man erhält den Wert dR_n , indem man das gemessene Fluoreszenzsignal mit der Basislinie und dem Referenzfarbstoff ROX korrigiert. Der Wert der dR_n wurde im Diagramm gegen die PCR-Zyklus-Anzahl, den *cycle(s)*, aufgetragen. Für jede Detektion wurde ein sogenannter *cycle threshold* (Ct), ein Schwellenwert festgelegt. Die Standardabweichung der Hintergrundfluoreszenz der Zyklen drei bis 15 wird mit dem Faktor 10 multipliziert und ergibt den Schwellenwert. Dieser *cycle threshold* beschreibt den PCR-Lauf, in dem erstmals eine deutlich messbare Zunahme des Fluoreszenzsignals von dem Hintergrundsignal der Negativkontrollen abzugrenzen. Jeder seiner Überschreitung wurde

festgehalten. Der Ct-Wert verhält sich somit umgekehrt proportional zum Logarithmus der Ausgangsmenge an DNA der Probe. Da man die exakte Vermehrungsrate der PCR aufgrund von diversen Einflussfaktoren auf die Amplifikation nicht kennt, führt man interne Kontrollen sowie Standards bekannter DNA-Mengen mit um die ermittelten Ct-Werte miteinander vergleichen zu können (Bustin et al. 2009; Heid et al. 1996; Higuchi et al. 1992; Kozera und Rapacz 2013).

Der Threshold wurde für alle methylierungsspezifischen PCR-Protokolle (*APC*, *ESR1*, *DKK3*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17*) dieser Studie auf 0,2 festgelegt. Der Schwellenwert für *β -Globin* lag bei 0,1 und für *β -Actin* bei 0,03.

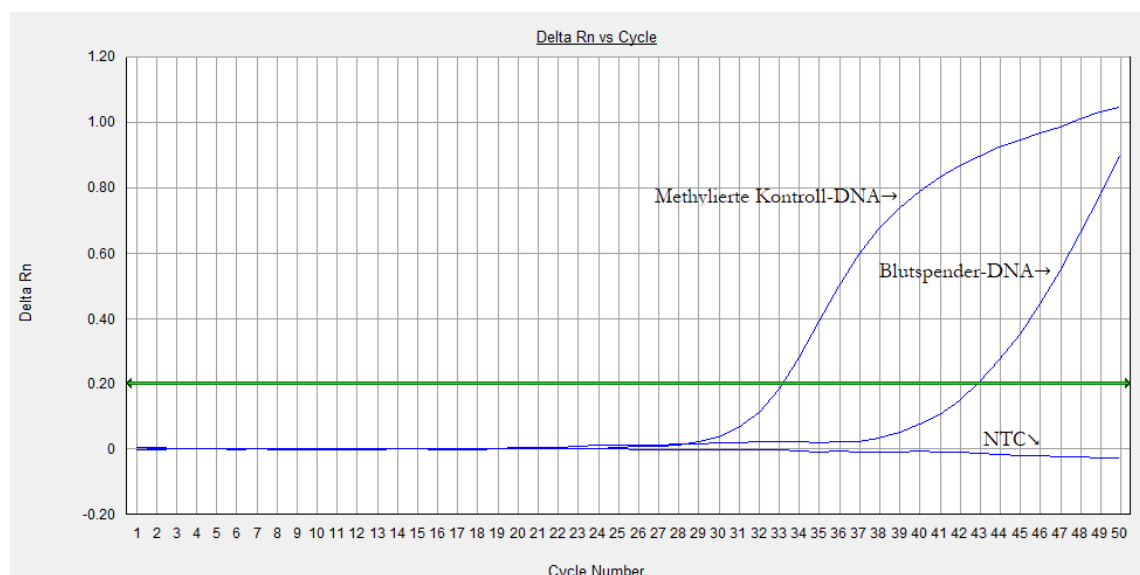


Abbildung 1: Beispiel einer Amplifikationskurve einer methylierungsspezifischen Multiplex-PCR für das Gen *RASSF1A*

Die Abb. 1 zeigt eine Amplifikationskurve einer methylierungsspezifischen Multiplex-PCR beispielhaft für das Gen *RASSF1A* eines Blutspenders, einer methylierten Kontroll-DNA (CP Genome™ *Human Methylated DNA*) und einer *Non Template Control* (NTC).

2.9.2 Quantifizierungsstrategien

Die PCR ist eine exponentiell verlaufende Reaktion, bei der unter Annahme einer 100 %-igen Effizienz der Reaktion eine Verdopplung der Reaktionsprodukte aus dem vorangegangenen Zyklus erfolgt. Dabei ist die Menge an hergestelltem Amplifikaten gleich der Startkopienzahl zu Beginn der PCR in Bezug zur Effizienz der Reaktion und der Anzahl der PCR Zyklen. Zur Erstellung einer Standardkurve wird die DNA-Konzentration logarithmisch transformiert. Die graphische Darstellung erfolgt anschließend, indem die Ct-Werte

gegenüber log der Startkopienzahl aufgetragen werden. Daraus lässt sich die Gleichung der Gerade einschließlich der Steigung berechnen.

2.9.3 Reagenzien und Reaktionsbedingungen

Das Reaktionsvolumen der eingesetzten methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR betrug stets 34 μl . Die Reagenzien wurden zu einem Mastermix erstellt und nach dem folgenden Protokoll in 0,2 ml-PCR-Mikrogefäße (MicroAmp® Optical 8-Tube Strip, Bestell-Nr.:4316567, Life Technologies GmbH, Darmstadt) pipettiert. Zuerst wurden 19 μl des TaqMan® Universal PCR Master Mix Kit (Bestell-Nr.:4304437, Applied Biosystems® by Life Technologies, Foster City, USA), welches aus AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, Uracil-DNA Glycosylase, dTNPs mit dUTP, ROX™ *Passive Reference* sowie einer Pufferlösung besteht, vorgelegt. Danach folgten 0,20 μl *Forward*- und 0,20 μl *Reverse*-Primer für die zu analysierende Promotorsequenz in einer Konzentration von jeweils 50 pmol/ μl . Dem folgten 0,30 μl *Forward*- und 0,30 μl *Reverse*-Primer zur Amplifikation einer β -*Actin*-Kontroll-Sequenz in einer Konzentration von jeweils 50 pmol/ μl . Hinzu kam außerdem 0,5 μl *Forward*- und 0,5 μl *Reverse*-Primer zur Amplifikation einer β -*Globin*-Kontroll-Sequenz in einer Konzentration von jeweils 20 pmol/ μl . Danach wurden 0,17 μl der jeweiligen TaqMan-Sonde (5'-FAM/3'-MGB) in einer Konzentration von 20 pmol/ μl und 0,24 μl der TaqMan-Sonde (5'-NED/3'-BHQ) zum Nachweis von β -*Actin* in einer Konzentration von 20 pmol/ μl hinzugefügt. Des Weiteren wurde jedem Probenansatz 0,17 μl der TaqMan-Sonde zum Nachweis von β -*Globin* (5'-VIC/3'-BHQ) in einer Konzentration von 20 pmol/ μl sowie 1,40 μl des Restriktionsenzym *Bst*UI dazu gegeben. Ambion®-*Nuclease-Free-Water* von 1,02 μl bei 10 μl eingesetzter Blutspenderplasma-, Patientenplasma-, Zelllinien- und verdünnter Kontroll-DNA-Probe wurde zum Erreichen eines Reaktionsvolumens von 34 μl ebenfalls hinzu pipettiert. Der verwendete TaqMan® Universal PCR Master Mix wurde bis zum Gebrauch bei +2 bis +8°C gelagert. Nach der anschließenden Zentrifugation (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterrode, Zentrifuge 1- 15) des Multiplex-PCR-Reaktionssatzes bei 12000 g für etwa 30 Sekunden schloss sich die *Real-Time*-PCR-Amplifikation im Thermocycler 7300 *Real-Time*-PCR-System (Applied Biosystems® by Life Technologies, Foster City, USA) an. Zu Beginn wurde der Cycler auf 50°C für 2 Minuten erwärmt, für den anschließenden methylierungsspezifischen Restriktionsenzymverdau durch *Bst*UI wurde der Thermocycler für 60 Minuten auf 60°C eingestellt. Für den folgenden Arbeitsschritt der Denaturierung der Ursprungs-DNA wurde die Temperatur auf 95°C für 10 Minuten erhöht. Die darauffolgenden Denaturierungs- und Annealing-Schritte ereigneten sich abwechselnd, jeweils für 15 Sekunden bei 95°C und für 1 Minute bei 60°C in insgesamt 50 aufeinanderfolgenden Zyklen.

2.9.4 Etablierung des Testverfahrens

Zur Etablierung der Methodik des Verfahrens wurden in allen Reaktionsansätzen die Kombination der erstellten und genspezifischen Primer und Sonden an Kontrollproben in Triplikaten untersucht. Mit Hilfe der eingesetzten Kontrollgene β -Globin und β -Actin, welche dem zu analysierenden Mastermix-Testansatz als interne Kontrollen hinzugefügt wurden, konnten die Testsequenzen nachgewiesen werden. Im Rahmen einer Multiplex-PCR mit internen Kontrollen wurden den Mastermixansätzen der zu untersuchenden Testsequenzen wiederum Reagenzien zum Nachweis der Kontrollgene β -Globin sowie β -Actin zugefügt. Die eingesetzten Kontrollgene sind auch als *Housekeeping*-Gene bekannt, die während der zellulären Transkription bestenfalls keiner Regulation unterliegen und in allen untersuchten Proben konstant exprimiert vorliegen. Diese Unabhängigkeit von genregulatorischen Mechanismen ermöglicht es *Housekeeping*-Gene zur Normierung der Expression eines Zielgens einzusetzen, wie es in allen Testansätzen dieser Arbeit erfolgt ist. Daher spricht man auch von einer relativen Quantifizierung durch den Einsatz von internen Kontrollgenen. Darüber hinaus führt die relative Quantifizierung über das Mitführen von *Housekeeping*-Genen zu einem quantitativen Ergebnis wie auch zur Korrektur von globalen methodischen Fehlern. Denn die Einflussfaktoren der Probenaufarbeitung betreffen das *Housekeeping*-Gen genauso wie das Zielgen (Thompson und Schild 1999; Vinayagamoorthy et al. 2015).

Das eingesetzte β -Globin, die β -Kette des Hämoglobinmoleküls, besitzt keine Schnittstelle für das verwendete Restriktionsenzym *Bst*UI, sodass stets bei Anwesenheit einer ausreichenden DNA-Menge in der Probe ein positives Signal erwartet wird. Damit stellt β -Globin ein gutes Maß für die Konzentration sämtlicher DNA-Moleküle, methyliert oder unmethyliert, dar. Das verwendete *Housekeeping*-Gen β -Actin, welches modifiziert nach Chan et al. (2006) Anwendung fand, wurde zur Kontrolle eines suffizienten Restriktionsenzymverdau eingesetzt, indem bei voller Funktionalität des verwendeten Restriktionsenzym eine Amplifikation des β -Actins ausbleibt, da dieses enzymatisch zersetzt wurde. Um mögliche Kontaminationen der verwendeten Testreagenzien auszuschließen, wurde in den gesamten PCR-Testläufen ein Kontrollansatz mit Wasser, der als Negativkontrolle (*Non Template Control*, NTC) fungierte, mitbestimmt.

2.9.5 Auswahl geeigneter Promotorregionen für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR

Um die ideale Kombination aus Primer- und Sondenkonzentration zu ermitteln, wurde mit Hilfe der kommerziell erworbenen methylierten und nicht methylierten Kontroll-DNA die

methylierungsspezifische Diskriminationsfähigkeit untersucht. Dadurch konnte für jedes Testgen ein Signal-Rausch-Verhältnis ermittelt werden und zwischen methylierter und unmethylierter DNA unterschieden werden. Dabei ergab sich, dass mit den *Real-Time-PCR*-Protokollen für die Gene *APC*, *DKK3*, *ESR1* und *HOXB4* ein unzureichender Signal-Rausch-Abstand beobachtet wurde (vgl. Kapitel 3.3).

2.9.6 Validierung der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time-PCR*

Zur Festlegung eines linearen Messbereichs wurde nach Bustin et al. (2009) sowie Thormann (2015) die konzipierte methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time-PCR* anhand einer Verdünnungstestung von Triplikaten an drei unterschiedlichen Tagen ($n = 9$) durchgeführt. Die Verdünnungsreihe, welche aus sechs Stufen bestand, sah vor, dass ein DNA-Gemisch aus methylierter und nicht methylierter Kontroll-DNA angesetzt und getestet wurde. Die methylierte DNA wurde im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 sowie 1:3125 aus einer Ausgangskonzentration von 10.000 pg/ μ l verdünnt. Die Negativkontrolle wurde dabei in einer gleichbleibenden Konzentration von 2000 pg/PCR der jeweiligen Verdünnungsstufe als Simulation der im Blutplasma vorhandener DNA aus gesunden Zellen (überwiegend aus Leukozyten) zur Bestimmung des Hintergrundsignals hinzugefügt. So wurden pro Ansatz 10 μ l Gesamt-DNA eingesetzt, die sich aus 8 μ l methylierter und 2 μ l unmethylierter Kontroll-DNA zusammensetzte (vgl. Tabelle 4). Durch eine weitere Titrationsserie nach dem oben genannten Vorgehen konnte aus methylierter DNA ebenfalls ein linearer Messbereich für *β -Globin* festgelegt werden. Dieser Ansatz erfolgte ohne die Zugabe einer Negativkontrolle (Bustin et al. 2009; Kozera und Rapacz 2013; Thormann 2015).

Tabelle 4: Verdünnungsreihe

Verdünnungsstufe	methylierte Kontroll-DNA [pg/ μ l]	nicht methylierte Kontroll-DNA [pg/ μ l]	methylierte Kontroll-DNA gesamt [pg/PCR]
1	10.000	2.000	80.000
2	2.000	2.000	16.000
3	400	2.000	3.200
4	80	2.000	640
5	16	2.000	128
6	3,2	2.000	26
*NTC	**	2.000	0

*NTC = *Non Template Control*

**Einsatz von 8 μ l H₂O anstelle von methylierter DNA

Tabelle 4 zeigt die Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Nachweisgrenze einer *Real-Time*-PCR für hypermethylierte Promotorsequenzen von *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17*

Aus den Ergebnissen der Verdünnungstestung ergaben sich so für jede Promotorregion Ct-Mittelwerte und es konnten ebenfalls die Standardabweichung (SD) und der Variationskoeffizient (VK) bestimmt werden. Es wurden Standardkurven einer jeden Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR erstellt und unter Anwendung einer Regressionsanalyse gelang die Ableitung des linearen Messbereichs. Daher ist es möglich innerhalb des linearen Messbereichs und mittels der Formel $f(x) = mx + n$ einem Ct-Wert die eingesetzte DNA-Konzentration zuzuordnen. Auch die ermittelten R^2 -Werte der Promotorregionen beschreiben als Gütekriterium eine vorliegende Linearität in den untersuchten Messbereichen (Thormann 2015).

2.9.7 Festlegung eines Ct-Grenzwertes (*Cut-Off*) für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR aus Blutspender- und Patienten-DNA

Die Ermittlung der genspezifischen *Cut-Off*-Ct-Werte basierte auf der Bestimmung der Ct-Werte der isolierten DNA-Proben aus EDTA-Plasma von 40 gesunden Blutspendern ($n = 40$) nach dem etablierten Multiplex-PCR-Protokoll mit Einsatz beider interner Referenzgene (*β -Globin* und *β -Actin*). Nach Bustin et al. (2009) wurde aus jeder Doppelbestimmung einer Blutspenderplasmaprobe ein Mittelwert errechnet, sodass sich aus 80 Einzelmessungen 40 Mittelwerte für jede Promotorregion ergaben. Ct-Messwerte, die höher lagen als der testgenspezifische Grenzwert wurden als negativ betrachtet und die, die niedriger lagen als positiv angesehen. Die Festlegung der numerischen *Cut-Off*-Ct-Werte erfolgte mittels der 95 %-Perzentilen-Methode (Chudy et al. 2003; Thormann 2015). Die *Cut-Off*-Werte wurden bezüglich der Ct-Werte aus der Tumorzellinientestung (*MDA-MB-231*, *T47D* und *MCF7*) sowie, zur Überprüfung der Plausibilität, auf die in jedem PCR-Ansatz mitgeführten methylierten und nicht methylierten Kontroll-DNA-Werte ausgewertet und dementsprechend als positiv oder negativ interpretiert. Anschließend erfolgte eine ROC-Analyse der ermittelten Ct-Mittelwerte aus Blutspender- und Mammakarzinomplasmaproben ($n = 28$).

2.9.8 Diagnostische Spezifität und Sensitivität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR

Die diagnostische Spezifität der hier angewendeten Methodik wurde auf 95 % mit der Festlegung des genspezifischen Grenzwertes gesetzt, der auf der Ermittlung der Ct-Messwerte der Blutspender-DNA-Testung basierte (vgl. Kapitel 3.5). Ct-Messwerte, die höher lagen als

der testgenspezifische Grenzwert wurden als negativ betrachtet. Mit dieser Vorgehensweise wurde sichergestellt, dass in jeder Testgenuntersuchung möglichst wenige Ct-Werte existierten, die als falsch-positiv interpretiert werden mussten und sich dadurch eine zufriedenstellende Spezifität der angewandten Methode ergab. Die diagnostische Sensitivität wurde aus der in Doppelbestimmung der durchgeführten Multiplex-PCR der Mammakarzinomplasma-proben ($n = 28$) und den daraus resultieren Ct-Mittelwerten ermittelt. Die Bewertung erfolgte analog der diagnostischen Spezifität anhand der promotorspezifischen *Cut-Off-Ct*-Werte in positiv (methyliert) und negativ (nicht methyliert) (Thomas 2012; Thormann 2015). Die ermittelten Ct-Werte des untersuchten Kollektivs aus den PCR-Testungen der Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* wurden zudem nach Festlegung des *Cut-Offs* durch eine ROC-Analyse bewertet.

2.9.9 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung sowie die graphische und tabellarische Darstellung der erhobenen Blutspender- und Mammakarzinompatientendaten wurden mit den statistisch-analytischen Softwareprogrammen IBM SPSS Statistics 25 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen) und Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) erstellt. Für die Verfahrensetablierung wurden die ermittelten Daten auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft und entsprechende statistischen Methoden auf die erhobenen Daten angewandt. Für die Bewertung der Messbereiche und Prüfung auf Linearität der untersuchten Promotorregionen sowie des internen Kontrollgens *β -Globin* wurde mit Hilfe eines linearen Regressionsmodells (Microsoft Excel 2010) durchgeführt. Für die Festlegung der *Cut-Off-Ct*-Werte der jeweiligen Promotorregionen wurde die 95 %-Perzentil-Methode angewendet. Auf dieser Grundlage wurden sowohl die diagnostische Spezifität sowie Sensitivität der ermittelten Messdaten erhoben. Anschließend erfolgte die Bewertung der der Ct-Mittelwerte des Blutspender- und Mammakarzinompatienten-Kollektivs bezüglich der ermittelten *Cut-Off*-Werte sowie mittels einer ROC-Analyse durch die Software IBM SPSS Statistics 22.0 und der Software R 3.1.2 (Thormann 2015).

3 Ergebnisse

3.1 Alters- und Geschlechtszusammensetzung von Mammakarzinom-Patienten und Blutspendern

Die Kohorte der insgesamt 28 Mammakarzinompatienten ($n = 28$) setzte sich aus 27 weiblichen (96,4 %) und einem männlichen (3,6 %) Individuum zusammen (vgl. Tabelle 5). Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der Probengewinnung dieses Kollektivs lag bei 59,6 Jahren (Min.-Max.: 39 bis 82), wobei das der Frauen im Mittel 59,7 Jahre betrug und das des Mannes 57 Jahre

Tabelle 5: Altersverteilung und Geschlecht des Patientenkollektivs

Alter bei Blutentnahme	Frauen [n (%)]	Männer [n (%)]	Gesamt [n (%)]
< 40 Jahre	1 [3,7 %]	0	1 [3,6 %]
41-50 Jahre	6 [22,2 %]	0	6 [21,4 %]
51-60 Jahre	8 [29,7 %]	1 [100 %]	9 [32,1 %]
61-70 Jahre	6 [22,2 %]	0	6 [21,4 %]
71-80 Jahre	5 [18,5 %]	0	5 [17,9 %]
81-90 Jahre	1 [3,7 %]	0	1 [3,6 %]
Gesamt [n(%)]	27 [100 %]	1 [100 %]	28 [100 %]

Das Kollektiv der gesunden Probanden bestand aus 23 weiblichen Blutspenderinnen und 17 männlichen Blutspendern, was einem Stichprobenumfang von 40 ($n = 40$) ausmacht. Der Anteil der Frauen in diesem Kollektiv belief sich auf 57,5 % sowie das der Männer auf 42,5 %. Das mittlere Alter bei der Blutentnahme im Rahmen des freiwilligen Blutspendetermins der untersuchten Kontrollkohorte betrug 38,8 Jahre (Min.-Max.: 18 bis 66) gesamt, wobei das der Frauen bei 39,5 Jahre (Min.-Max.: 22 bis 66) lag. Die Männer wiesen mit 38,1 Jahren (Min.-Max.: 18 bis 65) ein 1,4 Jahre jüngeres Durchschnittsalter auf (vgl. Tabelle 6). Damit lag das gemittelte Alter der Mammakarzinompatienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme 20,8 Jahre über dem der Blutspenderkohorte.

Tabelle 6: Altersverteilung und Geschlecht des Blutspenderkollektivs

Alter bei Spende	Frauen [n (%)]	Männer [n (%)]	Gesamt [n (%)]
< 20 Jahre	2 [8,6 %]	1 [5,9 %]	3 [7,5 %]
21-30 Jahre	7 [30,4 %]	3 [17,6 %]	10 [25 %]
31-40 Jahre	3 [13,1 %]	3 [17,6 %]	6 [15 %]
41-50 Jahre	6 [26,2 %]	8 [47,1 %]	14 [35 %]
51-60 Jahre	4 [17,4 %]	1 [5,9 %]	5 [12,5 %]
61-70 Jahre	1 [4,3 %]	1 [5,9 %]	2 [5 %]
Gesamt [n (%)]	23 [100 %]	17 [100 %]	40 [100 %]

3.2 Tumorstadien, Tumorarten und Rezeptorstatus des Patientenkollektivs

Die analysierten Plasmaproben von Patienten mit Mammakarzinom wurden bei der Biobank gezielt ausgesucht, sodass das erkrankte Patientenkollektiv sich in diversen Parametern, wie dem Alter, den Tumorarten, Stadien, Tumormarkern und diversen weiteren Metadaten, unterschiedlich zusammensetzte. Das Patientenkollektiv weist klinische Stadien von 0 bis IV auf, wobei zwölf Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme das Stadium 0-II aufwiesen, was einen Anteil von 42,9 % ausmacht, und sich 14 im Stadium III-IV befanden, was einen Anteil von 50 % entspricht. Bei zwei erkrankten Personen war das klinische Stadium nicht bekannt, die einen Anteil von 7,1 % an dem Gesamtkollektiv der Erkrankten hatten. Des Weiteren wurden histologische Analysen der Gewebeproben der an Mammakarzinom leidenden Kohorte durchgeführt. Das Gewebe wurde auf das Vorhandensein des Östrogen-, Progesteron- und *Her2/neu*-Rezeptors untersucht. Ist diese Analyse der genannten drei Rezeptoren negativ, spricht man von einem triple-negativen Mammakarzinom. Ist die Analyse hingegen für einen Rezeptor positiv, so spricht man von einem rezeptorpositiven Mammakarzinom. Diese histologische Analyse ist therapiewegweisend, da triple-negative Mammakarzinome einer Hormontherapie nicht zugänglich sind. Das ausgewählte Patientenkollektiv bestand aus 18 rezeptorpositiven (64,3 %), sechs triple-negativen (21,4 %) und vier (14,3 %) Patienten mit unbekanntem Rezeptorstatus.

Tabelle 7: Tumorarten aufgeschlüsselt nach der histologischen Analyse

Triple negativ	DCIS	Invasiv Duktal	Invasiv Lobulär	NST	Keine Angaben
Ja (21,4 %)	0	4	0	2	0
Keine Angaben (14,3 %)	1	0	0	2	1
Nein (64,3 %)	1	9	1	7	0
Gesamt	2	13	1	11	1

NST = *no special type*

Die Tabelle 7 zeigt die Tumorarten aufgeschlüsselt nach der histologischen Analyse des Östrogen-, Progesteron- und *Her2/neu*-Rezeptors (Triple-Analyse).

Tabelle 4: Tumorarten aufgeschlüsselt nach dem klinischen Stadium

Klinisches Stadium	DCIS	Invasiv Duktal	Invasiv Lobulär	NST	keine Angaben
0	1	0	0	0	0
I	0	3	0	0	0
II	1	4	0	3	0
III	0	4	0	3	0
IV	0	2	1	4	0
keine Angaben	0	0	0	1	1
Gesamt	2	13	1	11	1

3.3 Etablierung der quantitativen, methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR und Auswahl der Promotorregionen durch methylierungsspezifische Diskrimination zwischen nicht methylierten und methylierten DNA-Kontrollen

Die Verfahrensetablierung für die acht Testgene *APC*, *DKK3*, *ESR1*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* zur Erprobung der Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR mit dem Enzym *BstUI* erfolgte nach Erarbeitung der jeweiligen Arbeitsprotokolle. Eine Vortestung geschah mittels einer Positivkontrolle, einer käuflich erworbenen methylierten Kontroll-

DNA sowie einer unmethylierten Negativkontroll-DNA. Um geeignete Gensequenzen bestimmen zu können wurden die Ct-Werte nicht methylierter und methylierter Kontroll-DNA miteinander verglichen. Nach Etablierung der quantitativen, methylierungsspezifischen Einzschritt-*Real-Time*-PCR erfolgte die Untersuchung der DNA aus Zelllinien unterschiedlicher Mammakarzinome. Dabei zeigte sich, dass mit den *Real-Time*-PCR-Protokollen für die Gene *APC*, *DKK3*, *ESR1* und *HOXB4* ein unzureichender Signal-Rausch-Abstand beobachtet wurde, indem kein ausreichender methylierungsspezifischer Diskriminationsunterschied zwischen der eingesetzten nicht methylierten Negativkontroll-DNA und der methylierten Positivkontroll-DNA im Reaktionsansatz mit dem Restriktionsenzym *BstUI* beobachtet wurde (vgl. Tabelle 9). Die Tumorzelllinientestung von den Mammakarzinomzelllinien *MDA-MB-231*, *T47D* und *MCF7* zeigte, dass das etablierte Verfahren und Protokoll zur Untersuchung der Promotorhypermethylierung von *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* in dieser Dissertation angewendet werden kann. Die Betrachtung der Höhe der Differenz der Ct-Werte, dem Betrag, aus der Testung der methylierter Kontroll-DNA zu nicht methylierter Kontroll-DNA mit und ohne der Verwendung des Restriktionsenzym *BstUI* in dem Ansatz der Mammakarzinomzelllinientestung ergab, dass der Methylierungsstatus der getesteten Promotorregionen *APC*, *DKK3*, *ESR1* und *HOXB4* für jede Mammakarzinomzelllinie nicht auswertbar ist. Grund hierfür ist der in Kapitel 3.5 beschriebene zu geringe Signal-Rauschabstand. Die Zelllinie *MDA-MB-231* zeigte ein Genexpressionsmuster mit einer Hypermethylierung der Gene *MAL*, *RASSF1A* sowie *SOX17*. In der Untersuchung der Zelllinie *T47D* konnte eine Hypermethylierung des Gens *RASSF1A* nachgewiesen werden und bei der *MCF7*-Analyse bestand eine Hypermethylierung aller getesteten Promotorregionen (vgl. Tabelle 9). Zusätzlich fielen bei der *APC*-Testung hohe Ct-Mittelwerte, also keine positiven Testergebnisse, in allen drei Mammakarzinomzelllinien auf, sodass dies ein weiterer Grund darstellte auf eine weitere Untersuchung der Blutspender- sowie Mammakarzinomplasma-proben zu verzichten. Daher konnten keine Ct-Werte für das Testgen *APC* ermittelt werden und fehlen demzufolge in der Tabelle 10. Aufgrund der Ergebnisse dieser Validierungsuntersuchungen wurden die Plasmaproben der Karzinompatienten hinsichtlich der Gensequenzen *DKK3*, *ESR1* und *HOXB4* nicht getestet.

Tabelle 9: Darstellung der Ct-Mittelwerte der Positiv- und Negativkontrolle sowie der Tumorzelllinien testing im Vergleich mit und ohne Restriktionsenzym *BstUI*

Enzym	mit <i>BstUI</i>		ohne <i>BstUI</i>		<i>Cut-off</i> Ct-Wert (KI 95 %)	Mammakarzinomzelllinien mit <i>BstUI</i>			Mammakarzinomzelllinien ohne <i>BstUI</i>		
	nicht me- thylierte DNA Ct-MW*	methylierte DNA Ct-MW*	nicht me- thylierte DNA Ct-MW*	methylierte DNA Ct-MW*		Ct-MW* <i>MCF7</i> / Methy- lierungsstatus	Ct-MW* <i>MDA-MB-231</i> / Methy- lierungsstatus	Ct-MW* <i>T47D</i> / Methy- lierungsstatus	Ct- MW* <i>MCF7</i>	Ct-MW* <i>MDA- MB-231</i>	Ct- MW* <i>T47D</i>
<i>APC</i>	50,00	40,01	32,88	31,80	/	50,00/n.t.**	50,00/n.t.**	46,70/n.t.**	33,57	33,81	33,93
<i>DKK3</i>	43,81	38,92	35,33	40,32	40,60	40,02/n.t.**	40,40/n.t.**	36,69/n.t.**	47,80	46,72	46,91
<i>ESR1</i>	36,35	31,63	31,17	30,25	34,32	39,96/n.t.**	35,11/n.t.**	46,16/n.t.**	31,52	32,25	32,61
<i>HOXB4</i>	39,97	33,15	32,89	34,19	37,97	36,62/n.t.**	37,22/n.t.**	35,91/n.t.**	37,35	38,52	37,42
<i>MAL</i>	41,64	32,82	31,74	31,05	38,16	37,20/+	35,54/+	39,46/-	32,75	33,04	33,62
<i>RARB2</i>	42,77	33,33	30,34	29,24	38,10	36,69/+	43,15/-	42,04/-	30,95	31,63	31,60
<i>RASSF1A</i>	45,56	31,96	33,02	31,63	41,10	34,72/+	34,45/+	34,67/+	34,62	33,96	34,81
<i>SOX17</i>	45,21	32,13	31,08	29,66	42,70	36,49/+	36,33/+	44,65/-	32,80	33,06	32,18

*Ct-Mittelwert einer Doppelbestimmung, **nt = *not tested*, KI = Konfidenzintervall

In Tabelle 9 sind ebenfalls die *Cut-Off*-Ct-Werte für die Promotor-Regionen *APC*, *DKK3*, *ESR1*, *HOXB4*, *MAL*, *RARB2*, *RASSF1A* und *SOX17*, die aus Plasma der Kontrollkohorte ermittelt wurden, dargestellt (siehe Kapitel 3.5).

Die Tabelle 10 veranschaulicht die statistische Auswertung die Ct-Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) von nicht methylierter und methylierter Kontroll-DNA der Promotor-Regionen *DKK3*, *ESR1*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* sowie das Ergebnis des zweiseitig-ungepaarten T-Tests. Der T-Test zeigte für die sieben Promotorregionen statistisch signifikante Unterschiede der Ct-Werte in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus.

Tabelle 10: Ct-Mittelwerte, Standardabweichung (SD) und T-Test der Promotor-Regionen *DKK3*, *ESR1*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17*

Enzym	Promotor-Region	nicht methylierte DNA Ct-Mittelwerte \pm SD	methylierte DNA Ct-Mittelwerte \pm SD	T-Test (p-Wert)
<i>BstUI</i>	<i>DKK3</i>	46,78 \pm 3,04	39,20 \pm 1,09	1,75E-06
	<i>ESR1</i>	35,31 \pm 1,12	31,23 \pm 0,94	1,35E-09
	<i>HOXB4</i>	39,43 \pm 0,72	33,68 \pm 0,47	2,23E-14
	<i>MAL</i>	39,13 \pm 1,53	32,22 \pm 0,54	3,10E-09
	<i>RARβ2</i>	39,51 \pm 3,24	32,74 \pm 1,80	7,56E-06
	<i>RASSF1A</i>	46,30 \pm 1,67	33,24 \pm 0,91	1,91E-13
	<i>SOX17</i>	42,77 \pm 1,82	31,21 \pm 0,58	3,84E-10

3.4 Ermittlung des Messbereichs für die Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* sowie für die internen Referenzgene *β -Globin* und *β -Actin*

Die Ermittlung eines Messbereichs für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR zum Nachweis einer Hypermethylierung von *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* sowie für die internen Kontrollen *β -Globin* und *β -Actin* erfolgte mit Hilfe von Verdünnungsreihen unter Verwendung von methylierter DNA. Die graphischen Darstellungen (vgl. Abbildungen 1, 2, 3, 4) zeigen, dass für die durchgeführten Verdünnungsstufen eine Linearität für die Testgene *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* vorliegt. Die ermittelten R^2 -Werte für die Promotorregionen *MAL* ($R^2 = 0,8203$), *RASSF1A* ($R^2 = 0,9623$) und *SOX17* ($R^2 = 0,8903$) bestätigen eine Linearität der untersuchten Messbereiche. Dahingegen zeigte diese Untersuchung für *RAR β 2* keinen eindeutigen linearen Zusammenhang zwischen DNA-Konzentration und Ct-Werten ($R^2 = 0,1974$). Weiterhin konnte eine akzeptable Messabweichung mit VK < 10 % für die internen Kontrollen (*β -Globin* und *β -Actin*) des Verfahrens ermittelt werden. Das *Housekeeping*-Gen *β -Actin*, welches stets unmethyliert vorlag,

diente zur Überprüfung des eingesetzten Restriktionsenzym *Bst*UI. Es wurde in jedem PCR-Ansatz analysiert und, wie erwartet, nicht amplifiziert (Ct = 50).

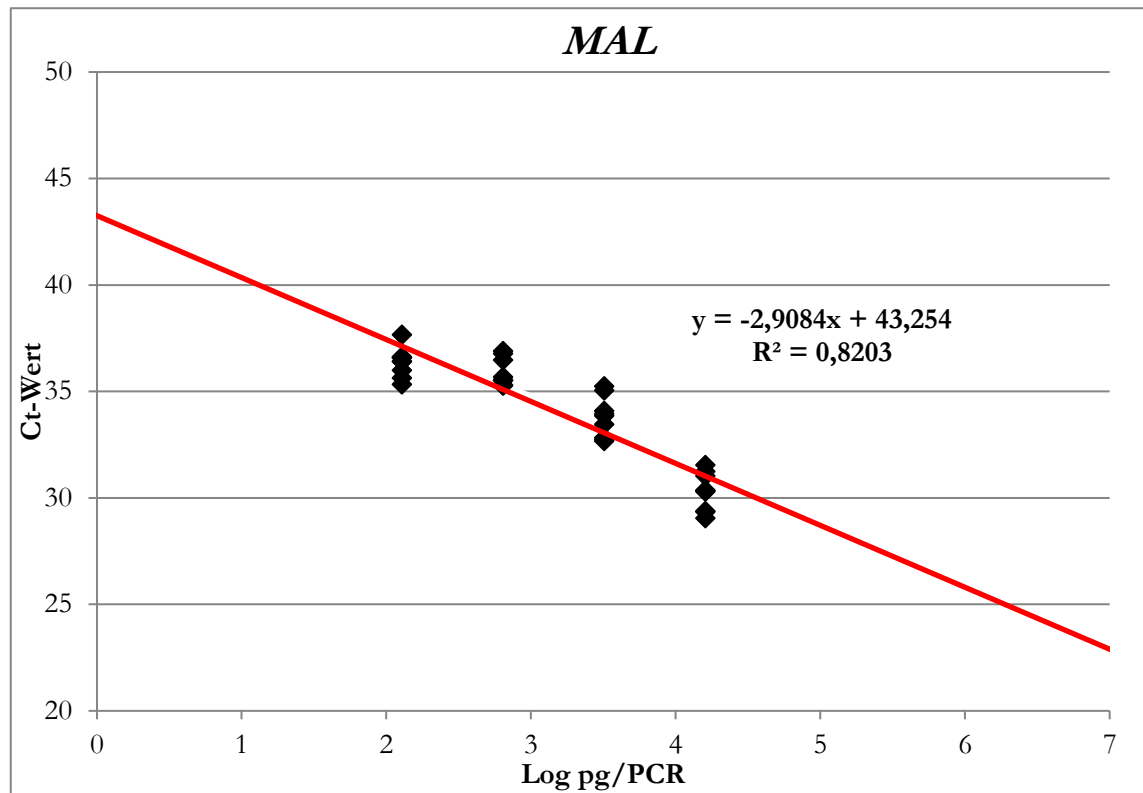


Abbildung 2: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR für die *MAL*-Promotorregion

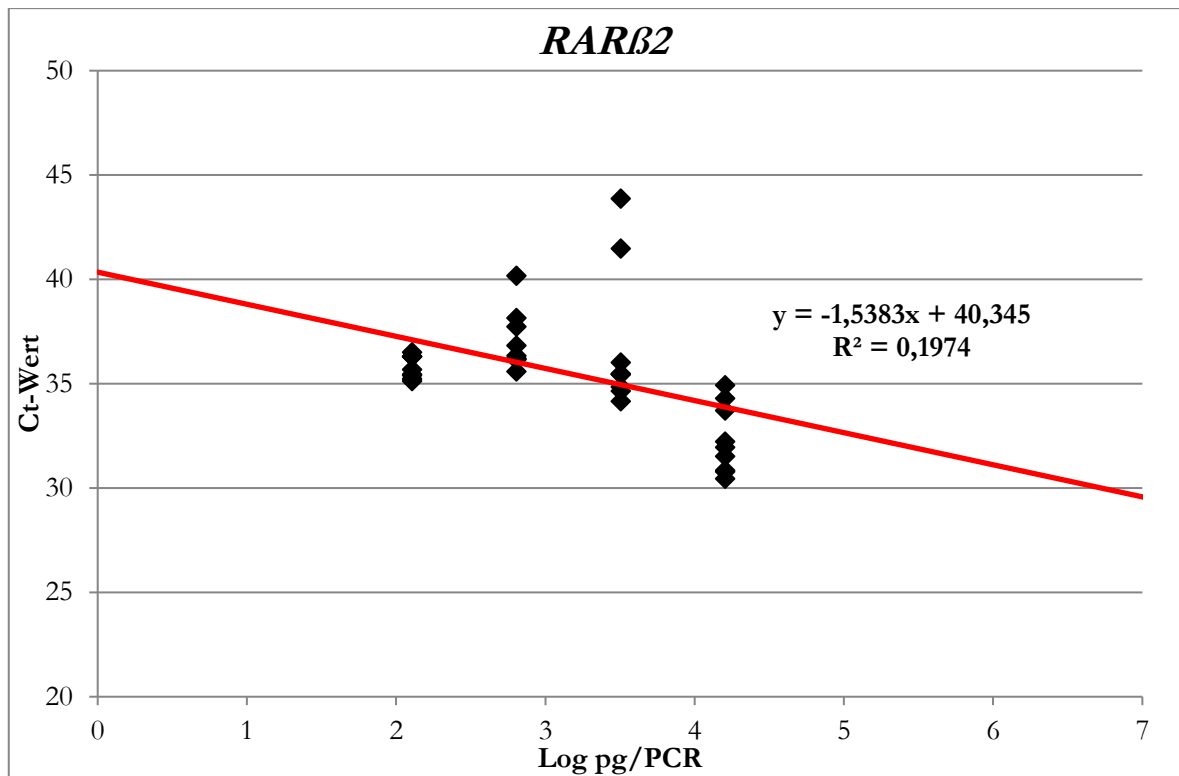


Abbildung 3: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR für die *RARB2*-Promotorregion

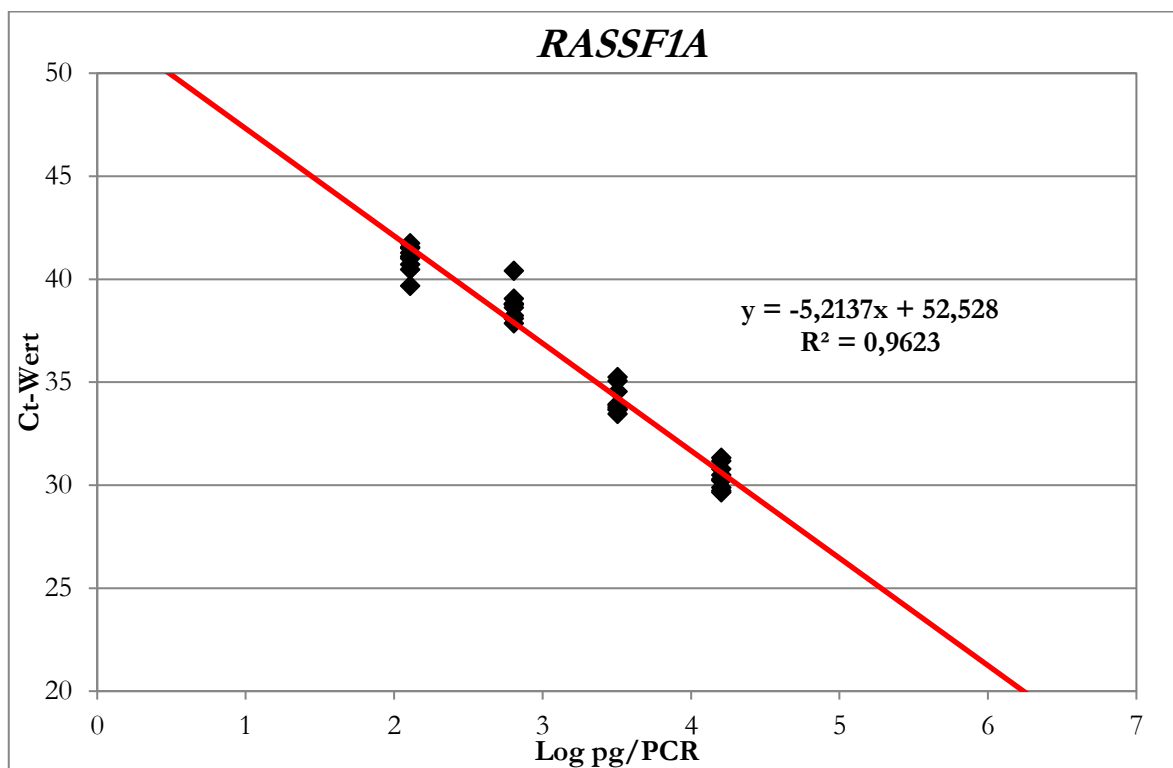


Abbildung 4: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR für die *RASSF1A*-Promotorregion

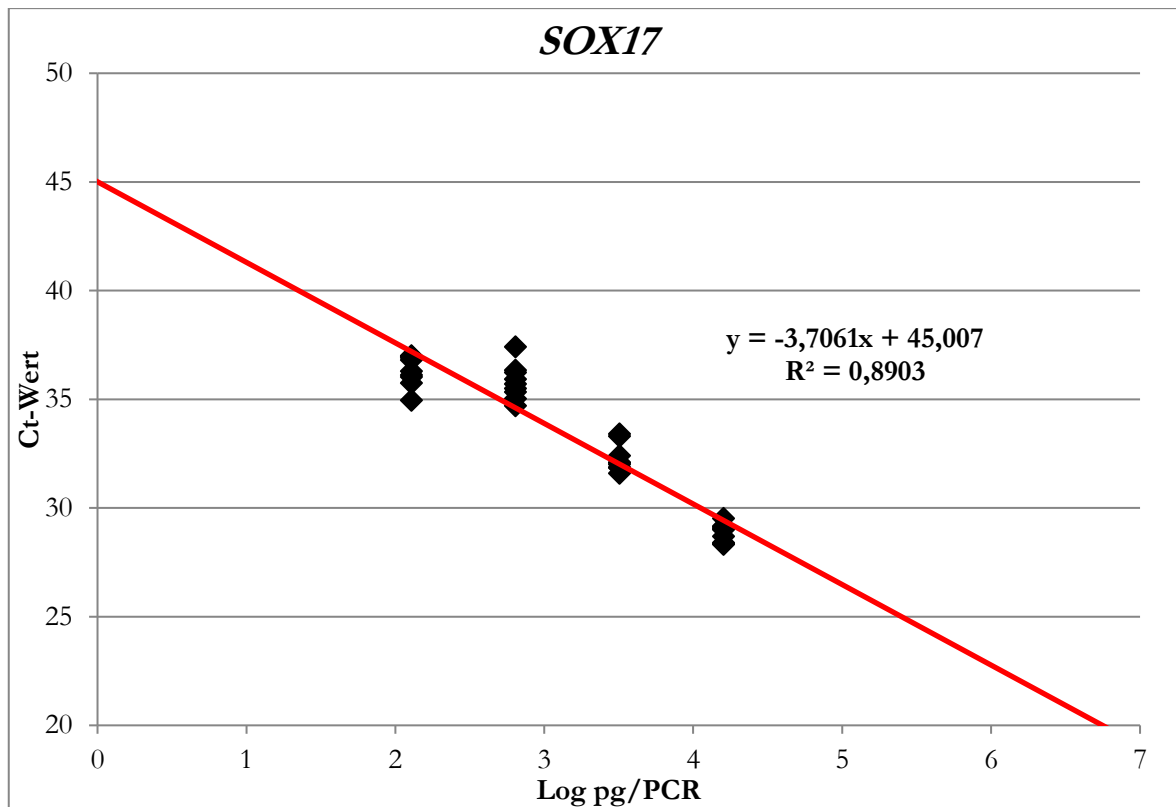


Abbildung 5: Darstellung des Messbereichs der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR für die *SOX17*-Promotorregion

3.5 Festlegung von *Cut-Off*-Ct-Werten für die methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR mittels Plasmaproben von Blutspendern

Die Ermittlung der genspezifischen *Cut-Off*-Ct-Werte basierte auf der Bestimmung der Ct-Werte der isolierten DNA-Proben der Blutspenderkohorte ($n = 40$) in der angewandten PCR-Methodik. Aus jeder Doppelbestimmung einer Blutspenderplasmaprobe wurde ein Mittelwert errechnet, sodass sich aus 80 Einzelmessungen 40 Mittelwerte für jede Promotorregion ergaben. Für die numerische Festlegung der methylierungsspezifischen *Cut-Off*-Werte ergaben sich folgende *Cut-Off*-Ct-Werte für *MAL* 38,16, für *RAR β 2* 38,10, für *RASSF1A* 41,10 und für *SOX17* 42,70 (vgl. Tabelle 11). Ct-Messwerte, die höher lagen als der testgenspezifische Grenzwert wurden als negativ betrachtet. Mit dieser Vorgehensweise wurde sichergestellt, dass es in jeder Testgenuntersuchung möglichst wenige Ct-Werte gab, die als falsch-positiv interpretiert werden mussten und sich dadurch eine zufriedenstellende Spezifität der angewandten Methode ergab. Die *Cut-Off*-Werte wurden auf die Ct-Werte aus der Tumorzellinientestung sowie, zur Überprüfung der Plausibilität, auf die in jedem PCR-Ansatz mitgeführten methylierten und nicht methylierten Kontroll-DNA-Werte angewendet. Der T-Test zeigte für die vier

Promotorregionen keine statistisch signifikanten ($p > 0,05$) Unterschiede der Ct-Mittelwerte bezüglich der Blutspender- und Mammakarzinomplasmaproben.

Tabelle 11: Darstellung der Ct-Mittelwerte der Blutspender, die Standardabweichung (SD), der T-Test und die ermittelten *Cut-Off*-Ct-Werte der Promotor-Regionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17*

Enzym	Promotor-Region	Blut-spender-DNA Ct-MW (n = 40)	Blut-spender-DNA Ct-MW SD	MCa-DNA Ct-MW (n = 28)	MCa-DNA Ct-MW SD	T-Test (p-Wert)	<i>Cut-Off</i> -Ct-Wert (KI 95 %)
<i>BstUI</i>	<i>MAL</i>	40,17	2,16	40,46	2,16	0,58	38,16
	<i>RARβ2</i>	40,35	2,32	41,05	2,84	0,28	38,10
	<i>RASSF1A</i>	46,57	3,24	47,34	3,16	0,32	41,10
	<i>SOX 17</i>	48,26	2,63	48,88	2,09	0,29	42,70

MCa = Mammakarzinom

3.6 Diagnostische Spezifität und Sensitivität der quantitativen, methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR für *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17*

Die diagnostische Spezifität wurde auf 95 % mit der Festlegung des *Cut-Off* gesetzt (vgl. Kapitel 3.5). Die falsch-positiven Ergebnisse beliefen sich somit auf 2 von 40 Blutspendern für jedes Testgen. Die diagnostische Sensitivität wurde aus der in Doppelbestimmung durchgeführten Multiplex-PCR der Mammakarzinomplasmaproben (n = 28) und den daraus resultieren Ct- Mittelwerten ermittelt. Die Bewertung erfolgte analog der diagnostischen Spezifität anhand der promotorspezifischen *Cut-Off*-Ct-Werte in positiv (methyliert) und negativ (nicht methyliert). Die Sensitivität war bei den untersuchten Testverfahren für *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* mit < 11 % gering (vgl. Tabelle 12).

Tabelle 5: Diagnostische Sensitivität und Spezifität der methylierungsspezifischen *Real-Time-PCR* für *MAL*, *RARβ2*, *RASSF1A* und *SOX17*

Gen	Sensitivität	Spezifität	<i>Cut-Off</i> - Ct-Wert	Npositiv/NPatient Sensitivität	Nnegativ/NSpender Spezifität
<i>MAL</i>	0 %	95 %	38,16	0/28	38/40
<i>RARβ2</i>	3,6 %	95 %	38,10	1/28	38/40
<i>RASSF1A</i>	10,7 %	95 %	41,10	3/28	38/40
<i>SOX17</i>	3,6 %	95 %	42,70	1/28	38/40

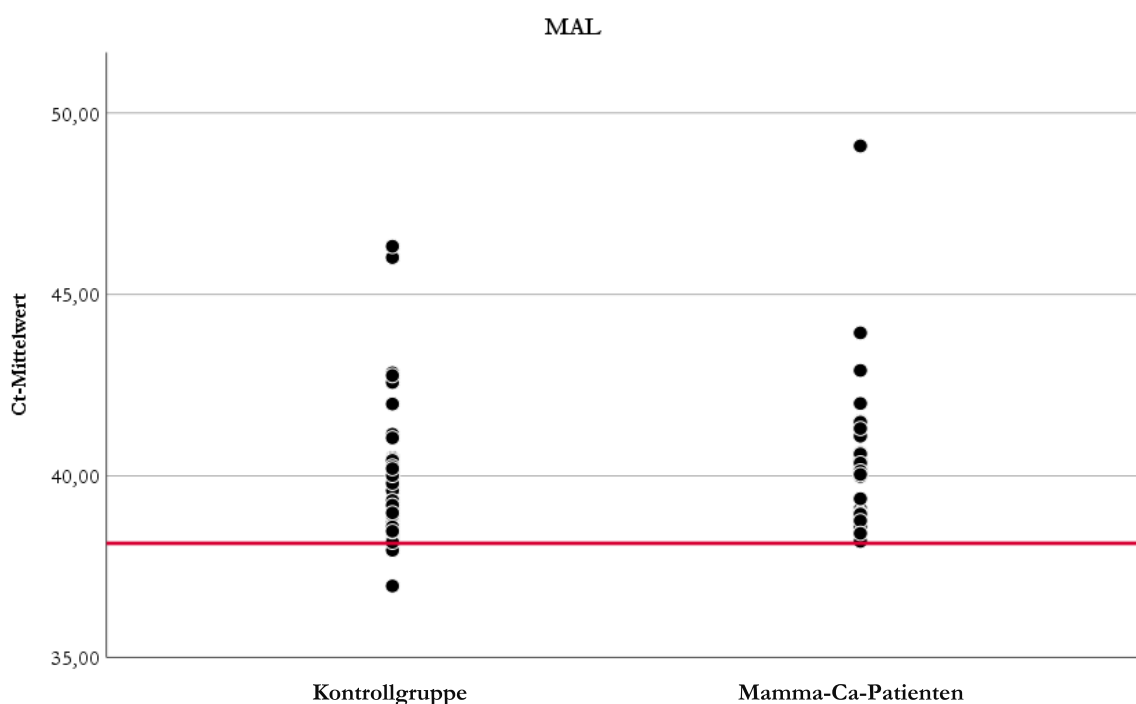


Abbildung 6: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens *MAL*

Die Abb. 6 zeigt die graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte (Doppelbestimmung) der Kontrollpersonen ($n = 28$) sowie Patienten mit Mammakarzinom ($n = 40$) des Testgens *MAL* im Vergleich und in Bezug zum ermittelten *Cut-Off*-Ct-Wert.

Die Untersuchung der *MAL*-Promotorregion ergab, dass keine Plasma-DNA-Probe von Mammakarzinompatienten positiv getestet wurde, bei jedoch zwei falsch-positiven Testergebnissen innerhalb der Blutspenderkohorte. Diese gesunden Probanden waren jeweils Männer im Alter von 34 und 39 Jahren zum Zeitpunkt der Blutentnahme und nicht-farbig.

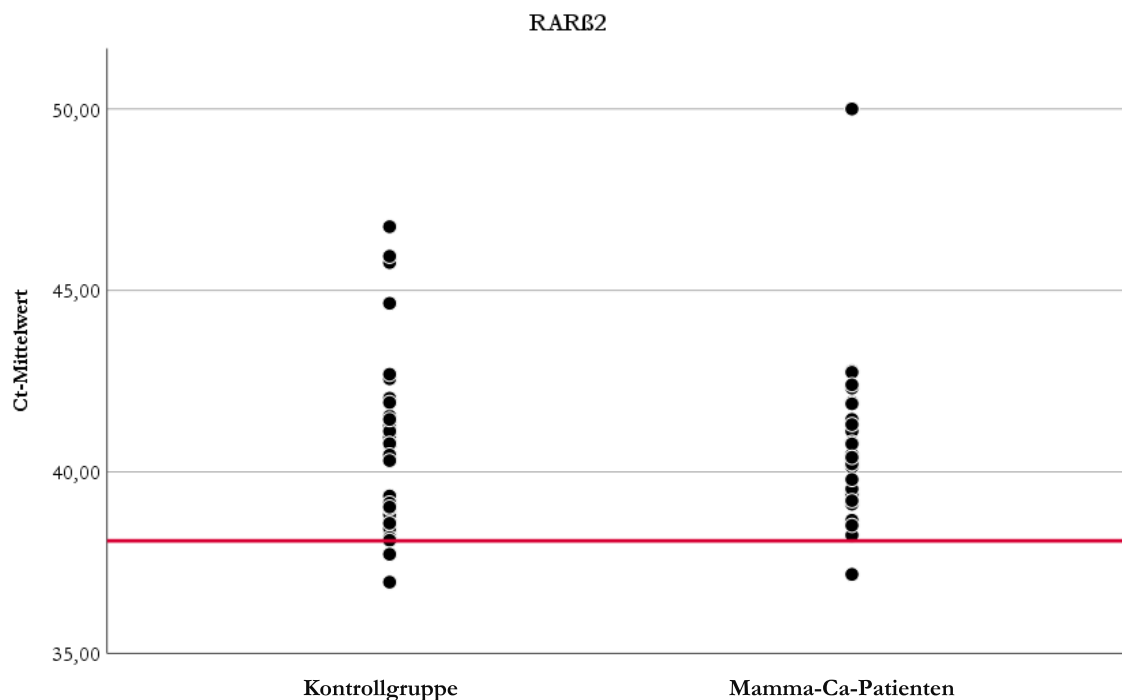


Abbildung 7: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens $RAR\beta 2$

Die Abb. 7 zeigt die graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte (Doppelbestimmung) der Kontrollpersonen ($n = 28$) sowie Patienten mit Mammakarzinom ($n = 40$) des Testgens $RAR\beta 2$ im Vergleich und in Bezug zum ermittelten *Cut-Off*-Ct-Wert.

Die Analyse des $RAR\beta 2$ -Testgens der positiv getesteten DNA-Probe war von einer farbigen 47-jährigen Frau, die ein NST-Mammakarzinom hatte, welches nicht triple-negativ war, und sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme im UICC Stadium III befand. Die Patientin gab an nie geraucht zu haben. Zu ihrem Alkoholgebrauch machte sie jedoch keine Angaben. Die zwei falsch-positiven Testergebnisse innerhalb der Blutspenderkohorte stammten jeweils von einer Frau im Alter von 50 Jahren und einem männlichen Probanden im Alter von 43 Jahren. Beide waren nicht-farbig.

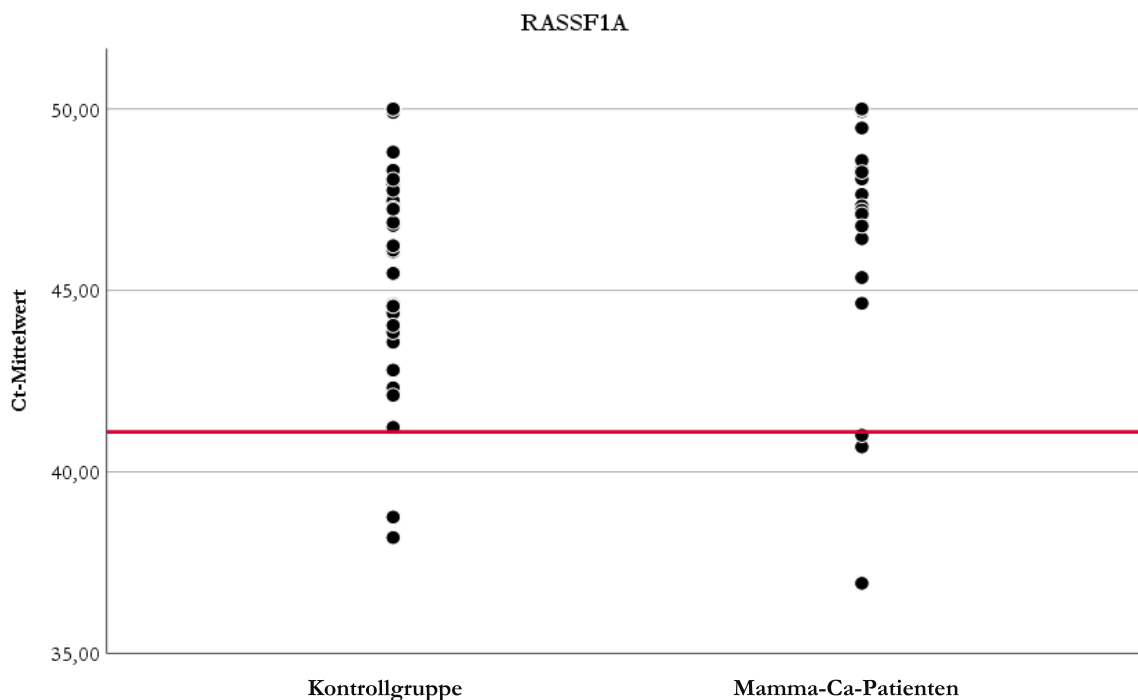


Abbildung 8: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens *RASSF1A*

Die Abb. 8 zeigt die graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte (Doppelbestimmung) der Kontrollpersonen ($n = 28$) sowie Patienten mit Mammakarzinom ($n = 40$) des Testgens *RASSF1A* im Vergleich und in Bezug zum ermittelten *Cut-Off*-Ct-Wert.

Für die Promotorregion *RASSF1A* wurde bei drei untersuchten Erkrankten positiv getestet. Gemein hatten alle drei Probanden, dass sie nicht-farbig, weiblich, 46 Jahre alt waren und ein NST-Mammakarzinom hatten. Die Tumorstadien nach der UICC wurden in III und IV angegeben. Eine Plasmaprobe wies einen besonders niedrigen Ct-Wert auf. Diese Patientin hatte ein triple-negatives NST-Mammakarzinom im UICC-Stadium IV. Die anderen zwei Mammakarzinompatientinnen waren nicht triple-negative. Der Alkoholgebrauch wurde von zwei Frauen bejaht, die andere machte diesbezüglich keine Angaben. Der Raucherstatus war bei jeder Probandin unterschiedlich und reichte von niemals über früher bis hin zu aktuell. Die zwei falsch-positiven Testergebnissen innerhalb der Blutspenderkohorte waren von zwei nicht-farbigem Frauen unterschiedlichen Alters, 24 und 52 Jahre alt.

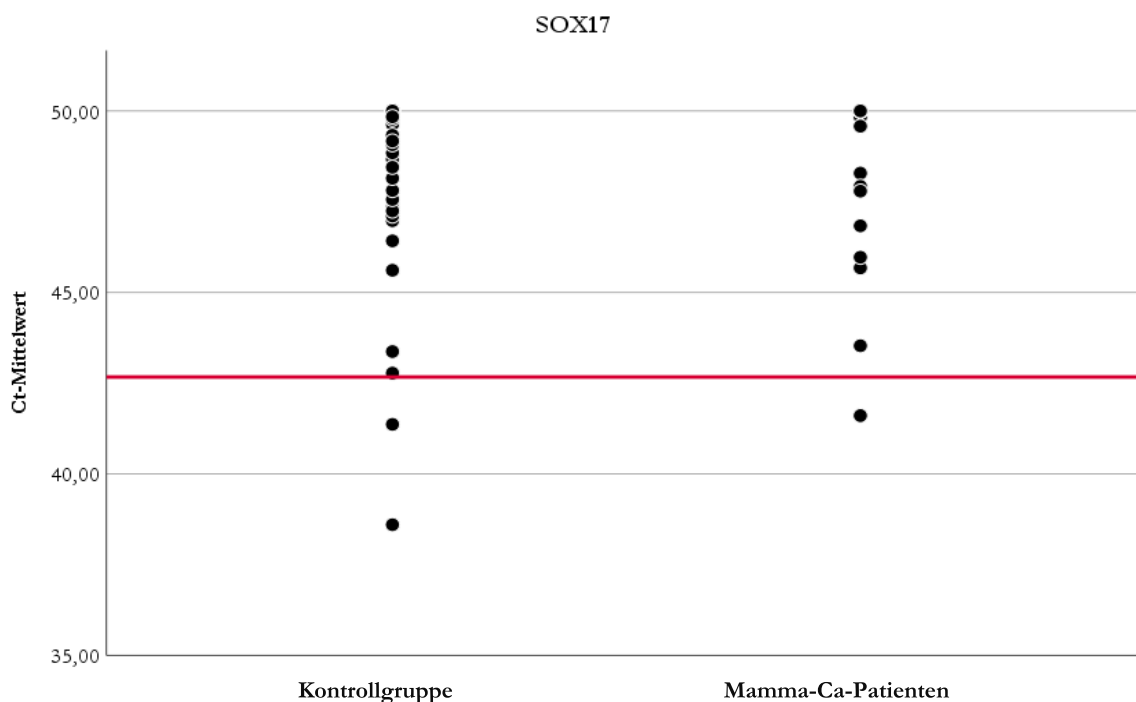


Abbildung 9: Graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte des Testgens *SOX17*

Die Abb. 9 zeigt die graphische Darstellung der einzelnen Ct-Mittelwerte (Doppelbestimmung) der Kontrollpersonen ($n = 28$) sowie Patienten mit Mammakarzinom ($n = 40$) des Testgens *SOX17* im Vergleich und in Bezug zum ermittelten *Cut-Off-Ct-Wert*.

Für das Testgen *SOX17* zeigte ebenfalls eine Testung ein positives Ergebnis. Die Mammakarzinompatientin war eine hellhäutige 66-jährige Frau, die ebenfalls ein NST-Mammakarzinom hatte, welches nicht triple-negativ war. Ein UICC-Stadium wurde nicht angegeben. Die Patientin äußerte, dass sie zum Zeitpunkt der Blutabnahme Alkohol konsumiere und früher geraucht habe. Die zwei falsch-positiven Testergebnisse innerhalb der Blutspenderkohorte stammten von nicht-farbigem Männern im Alter von 25 und 50 Jahren zum Zeitpunkt der Blutentnahme.

3.7 ROC-Analysen der getesteten Promotorregionen *MAL*, *RARB2*, *RASSF1A* und *SOX17*

Darüber hinaus wurde die Sensitivität und Spezifität der methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time-PCR* für jedes Testgen an den Kontrollplasma- ($n = 40$) und Mammakarzinomplasma- ($n = 28$) anhand einer ROC-Analyse dargestellt und ermittelt. Die durchgeführte ROC-Analyse, wobei ROC für *receiver operating characteristic* steht, die auch als Grenzwertoptimierungskurve bekannt ist, ist ein statistisches Verfahren zur Veranschaulichung von ermittelten Daten. Diese ist hilfreich zur Bewertung und Optimierung von Laborparametern. Die visuell

dargestellten ROC-Kurven zeigt die Abhängigkeit der Effizienz in Bezug zur Fehlerrate für die ermittelten Analysedaten. Zur Qualitätsbewertung eines Tests oder einer Labormethode kann die Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve erfolgen. Die Fläche unter der Grenzwertoptimierungskurve kann zwischen 0 und 1 liegen, wobei die optimale Fläche eine Größe von mindestens 0,5 aufweist. Die Fläche unter der ROC-Analysenkurve für die Testgene *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* beträgt $< 0,5$, daher ist dieses Testverfahren nicht geeignet, um anhand von Plasmaproben zwischen Kontrollpersonen und Patienten mit Mammakarzinom zu diskriminieren.

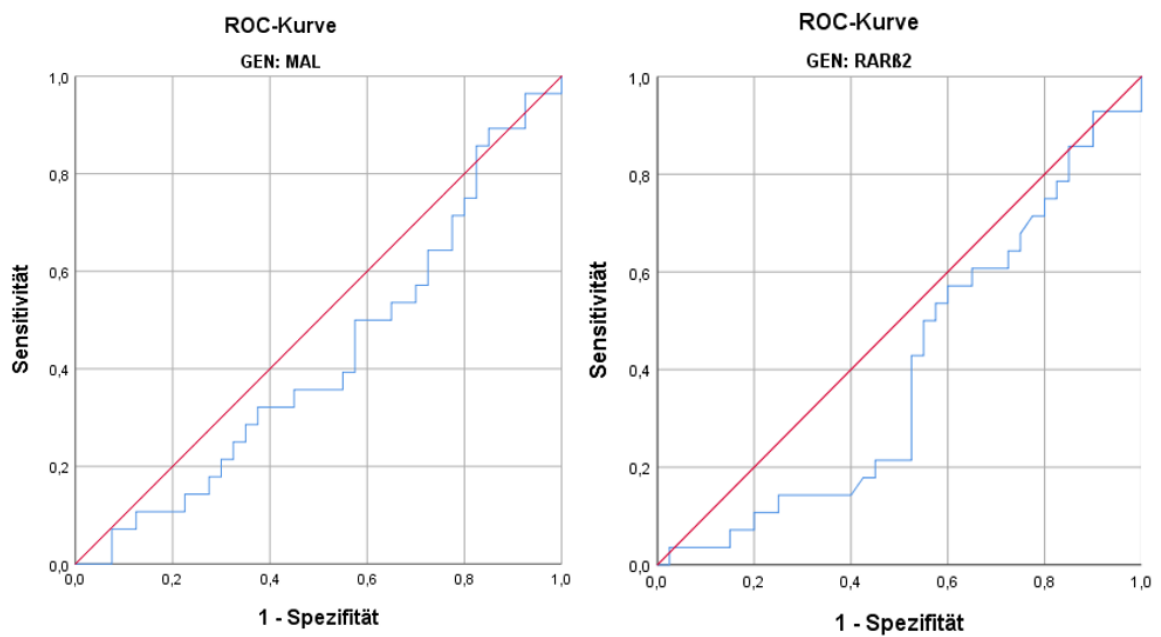


Abbildung 10: ROC-Kurven der Ct-Mittelwerte der getesteten Promotorregionen von *MAL* und *RAR β 2*

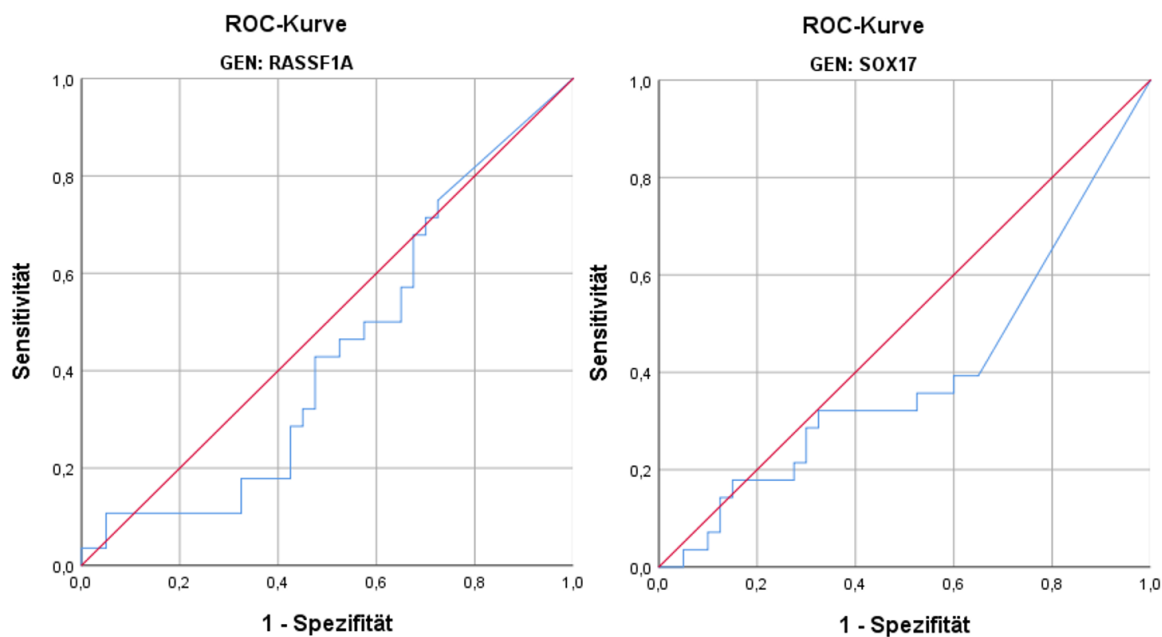


Abbildung 11: ROC-Kurven der Ct-Mittelwerte der getesteten Promotorregionen von *RASSF1A* und *SOX17*

3.8 Vergleich der Methylierungen von den Promotorregionen *MAL*, *RARB2*, *RASSF1A* und *SOX17* zwischen Mammakarzinompatienten und Blutspendern

Die deskriptive Analyse auf das Vorliegen einer Normalverteilung der untersuchten Proben wurde aufgeteilt nach den vier Testgenen bezogen auf die Blutspenderkohorte ($n = 40$) im Vergleich zu dem Mammakarzinomkollektiv ($n = 28$) durchgeführt. Die Prüfung auf Normalität der Ct-Werte für die Gene *MAL*, *RARB2*, *RASSF1A* und *SOX17* mittels eines Shapiro-Wilk-Normalitätstest ergab, dass jede der 8 getesteten Subgruppen signifikant unterschiedlich von einer Normalverteilung ($p < 0,05$) war. Mit dem Mann-Whitney-U Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Blutspendern und Mammakarzinompatienten hinsichtlich der analysierten Marker *MAL*, *RARB2*, *RASSF1A* und *SOX17* festgestellt werden, da der p-Wert stets $> 0,05$ war (*MAL* ($p = 0,284$), *RARB2* ($p = 0,147$), *RASSF1A* ($p = 0,368$), *SOX17* ($p = 0,129$)). Mit der durchgeführten Methode wurden niedrigere Ct-Werte bei Patienten mit einer Hypermethylierung bestimmter Gene erwartet. In dieser Analyse ist jedoch kein signifikanter Abfall der Ct-Werte im EDTA-Plasma bei einer vorliegenden Mammakarzinomkrankung sichtbar gewesen.

3.8.1 Korrelation der Methylierungen der Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* mit dem Alkoholkonsum

Der Test der vier Promotorregionen auf Normalverteilung zeigte bezogen auf den Alkoholgebrauch der Karzinompatienten, dass nur bei 6 von 16 Subgruppen eine Normalverteilung angenommen werden kann. Die Subgruppen wurden mittels der Kategorien aktuell ($n = 10$), früher ($n = 6$), niemals ($n = 1$) und keine Angaben ($n = 11$) bezüglich des Alkoholkonsum eingeteilt und für jede Promotorregion *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* dargestellt (vgl. Abbildung 12). Aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs, der kleinen Subgruppengrößen und der fehlenden Normalverteilung bei sechs Subgruppen, wurde mit nicht-parametrischen Analysen fortgefahren. Der Kruskal-Wallis Test der Ct-Mittelwerte der verschiedenen Testgene *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* ergab keine signifikanten, durch Alkoholkonsum bedingten Unterschiede ((*MAL* ($p = 0,169$), *RAR β 2* ($p = 0,074$), *RASSF1A* ($p = 0,446$), *SOX17* ($p = 0,732$)).

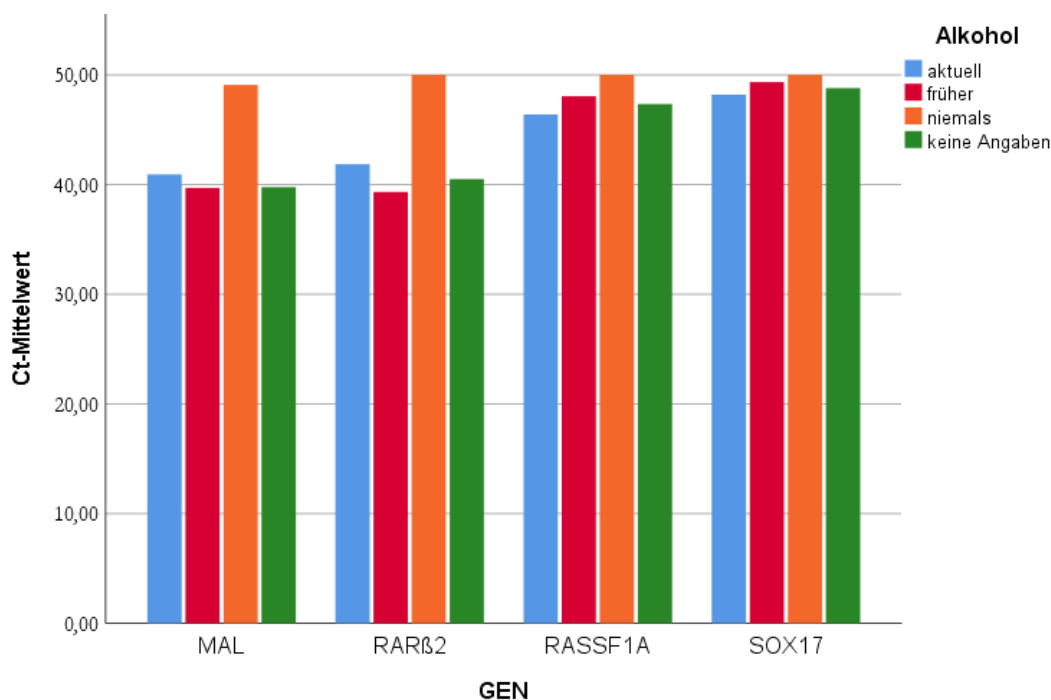


Abbildung 12: Alkoholkonsum

Die Abb. 12 zeigt die Ct-Mittelwerte der Mammakarzinompatientenkohorte aufgeteilt nach den Testgenen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* sowie in Subgruppen nach dem Alkoholkonsum

3.8.2 Korrelation der Methylierung der Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* mit dem Nikotinkonsum

Zur Untersuchung einer Korrelation zwischen Promotormethylierung und Nikotinkonsum wurden die Ct-Werte von Mammakarzinompatienten in die drei Subgruppen aktuell ($n = 4$), früher ($n = 8$) und niemals ($n = 16$) erfolgter Nikotingebrauch unterteilt. Der Shapiro-Wilk-Normalitätstest ergab, dass für die Ct-Werte der vier Testgene *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* nach dieser Aufteilung bei nur bei 6 von 12 Subgruppen eine Normalverteilung anzunehmen ist. Der auch hier vorliegende kleine Stichprobenumfang, die kleinen Gruppengrößen und die fehlende Normalverteilung bei sechs Subgruppen machte eine Untersuchung mit nicht-parametrischen Tests erforderlich. Der Kruskal-Wallis Test auf Nikotinkonsum-abhängige Ct-Unterschiede in der Analyse der verschiedenen Testgene *MAL* ($p = 0,246$), *RAR β 2* ($p = 0,195$), *RASSF1A* ($p = 0,096$) und *SOX17* ($p = 0,539$) zeigte in dieser Studie keinen signifikanten Einfluss von Zigarettenkonsum auf die Ct-Werte und damit auf den Methylierungsstatus der untersuchten Testgene.

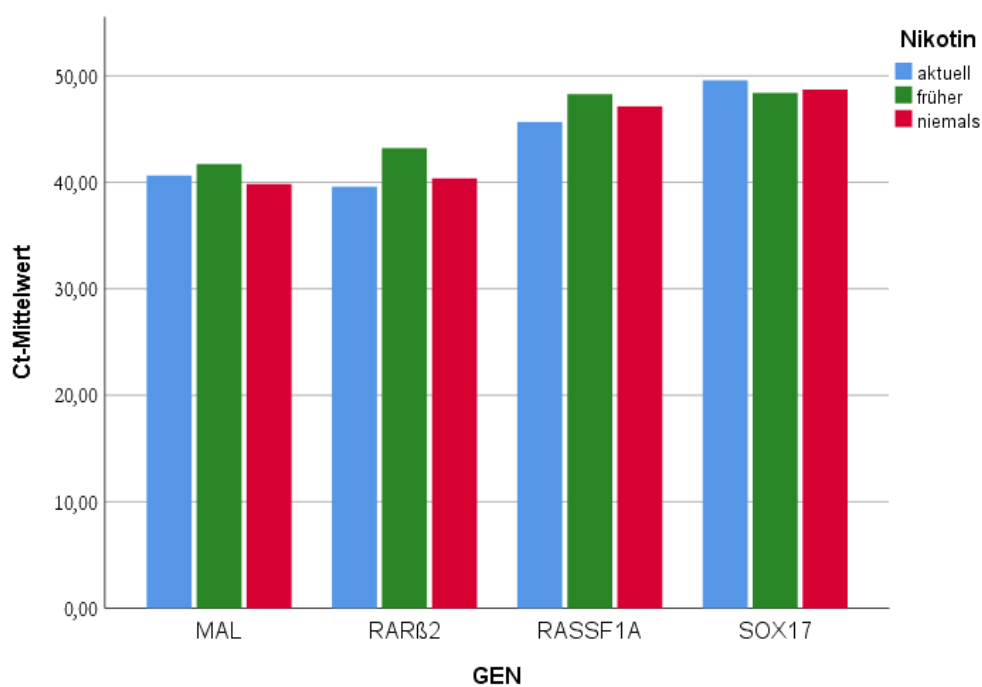


Abbildung 13: Nikotinkonsum

Die Abb. 13 zeigt die Ct-Mittelwerte der Mammakarzinompatientenkohorte aufgeteilt nach den Testgenen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* sowie in Subgruppen nach dem Nikotinkonsum

3.8.3 Korrelation der ethnischen Zugehörigkeit mit der Methylierungen von den Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* bei Blutspendern und Patienten mit Mammakarzinom

Die Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Normalitätstest wurde auf die vier Testgene *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* nach Einteilung des Patienten- sowie Blutspenderkollektivs in Subgruppen hinsichtlich der ethnischen Zugehörigkeit durchgeführt. Das Gesamtkollektiv wurde diesbezüglich in die Gruppen farbige und nicht-farbige unterteilt, was in Summe acht Subgruppen ausmacht. Die nicht-farbige Kohorte ($n = 64$) wies bezogen für alle vier Testgene *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* eine Normalverteilung auf ($p < 0,05$). Die farbige Kohorte ($n = 4$) zeigte keine Normalverteilung ($p > 0,05$) für die vier getesteten Gene. Aus diesem Grund kam eine nichtparametrische Analyse zur Anwendung. Die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests auf Ethnie-abhängige Unterschiede der ermittelten Ct- Werte der verschiedenen Testgene *MAL* ($p = 0,342$), *RAR β 2* ($p = 0,831$), *RASSF1A* ($p = 0,426$) und *SOX17* ($p = 0,930$) konnten keinen signifikanten Einfluss der Ethnie auf eine Hypermethylierung der untersuchten Testgene zeigen.

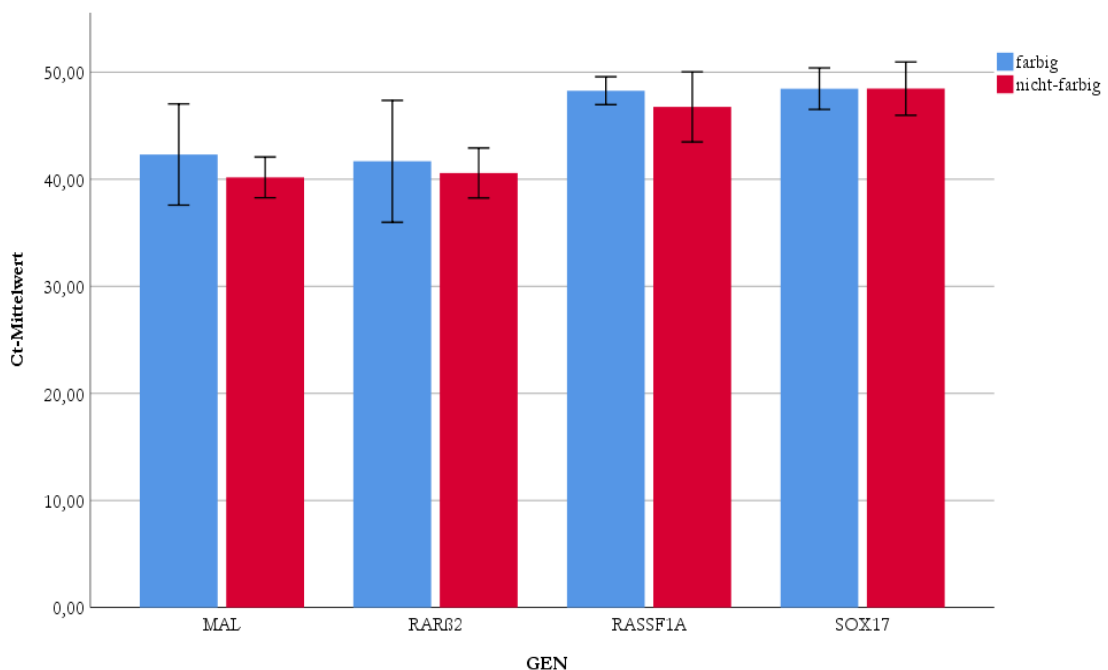


Abbildung 14: Ethnie

Die Abb. 14 zeigt die Ct-Mittelwerte von Patienten und Kontrollpersonen in einer Gruppe zusammengefasst und aufgeteilt nach den Testgenen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* und den Subgruppen farbige und nicht-farbige

4 Diskussion

Mit der Entdeckung der genetischen Veränderungen, die für die Entstehung und das Fortschreiten von Karzinomerkrankungen beim Menschen verantwortlich sind, wurde die Forschung auf eine neue Generation von Biomarkern aufmerksam. Da maligne Erkrankungen einen erheblichen Anteil der Erkrankungen in Deutschland ausmachen und somit eine häufige Todesursache darstellen, liegt der Fokus in diversen Studien darauf Mutationen oder Promotorhypermethylierungen in zirkulierenden zellfreien DNA-Strukturen zu detektieren um die Tumorphathogenese, das Metastasierungsverhalten und die Tumorregression besser verstehen zu können. Eine Stratifizierung der Tumorthherapie erfolgt vorwiegend nach Untersuchung der Tumorhistologie, der Tumorgröße, der Untersuchung von Lymphknoten sowie der Suche bzw. dem Ausschluss von Tumormetastasen. In den vergangenen Jahren sind zahlreiche Biomarker im Blutplasma beschrieben worden, die eine Personalisierung der Tumorthherapie theoretisch ermöglichen könnten. Jedoch werden nur wenige Biomarker heutzutage zur Stratifizierung der Tumorpatienten im klinischen Alltag eingesetzt (Schwarzenbach et al. 2011a).

Frei zirkulierende tumorassoziierte Nukleinsäuren, die im Rahmen einer Blutentnahme gewonnen werden können, sind auch bekannt als eine sogenannte *liquid biopsy*, englisch für flüssige Biopsie. Mit Hilfe von PCR-Verfahren wird versucht spezifische Mutationen, Hyper- oder Hypomethylierungen von tumorassoziierten Genen aus zirkulierender zellfreier DNA, die aus unterschiedlichen Probenmaterialien gewonnen werden kann, nachzuweisen. Die Identifizierung zellfreier DNA im Blut bei Karzinompatienten gelang erstmalig durch Leon et al. (1977). Später zeigten Stroun et al. (1987), dass kleine Tumor-DNA-Fragmente häufig in den Blutkreislauf freigesetzt werden und diese ctDNA eine Länge von 0,5 bis 21 kb mit einer Plasmakonzentration im Bereich von 0,15 bis 12 mg/ml aufweisen. Holmgren et al. (1995) fanden heraus, dass es bei Krebspatienten, die sich in Remission befinden, asymptomatisch sind, jedoch ruhende Mikrometastasen haben, zu einem Rezidiv kommt. Dieser wissenschaftlichen Veröffentlichung folgten Studien zur Identifizierung dieser Mikrometastasen in Form von CTCs (Nicola et al. 2003; Wikman et al. 2008). Bettegowda et al. (2014) zeigten, dass diese Mikrometastasierung auch durch Messung von ctDNA bestätigt werden kann. Seit 2007 empfiehlt die *American Society of Clinical Oncology* auch den Nachweis von detektierbaren Tumorzellen bei der Therapieentscheidung des Mammakarzinoms mitzubedenken. So wurde in der aktuellen Fassung der TNM-Klassifikation die Kategorie cM0 (i+) hinzugefügt, der den Nachweis von Tumorzellen im Blut, Knochenmark oder Ansammlung dieser (kleiner gleich 0,2 mm) in nicht-regionären Lymphknoten beschreiben (Lianidou et al. 2013). Man unterteilt diese Tumorzellen nach dem Ort des Auffindens, ob diese im Knochenmark oder im Blutkreislauf zirkulieren. Disseminierte

Tumorzellen (*disseminated tumor cells*, DTC) werden definitionsgemäß im Knochenmark und zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTC) im Blutkreislauf gefunden (Nelson et al. 2016; Pantel et al. 2009). Eine signifikante Assoziation zwischen dem Auffinden von CTCs und deren Anzahl bezogen auf das Gesamtüberleben konnte bei verschiedenen Karzinomarten (Mamma-, Prostata- und Kolorektales Karzinom) beschrieben werden (Cohen et al. 2008; DCristoe Bono et al. 2008; Joosse et al. 2012). Detektierbare Tumorzellen können sich zu Fernmetastasen vereinigen und gelten in dem Zusammenhang als Mikrometastasen. Sie sind teilungsaktive, migrationsfähige Abspaltungen eines Primärtumors, Rezidivs oder einer schon bestehenden Metastase (Iwatsuki et al. 2010). Mit dem Nachweis dieser Zellen kann ein weiterer prognostischer Biomarker beim primären Brustkrebs Anwendung finden (Bidard et al. 2008; Pantel et al. 2008). Außerdem kann mit Hilfe der zirkulierenden Tumorzellen eine Regressionsüberwachung, Rezidiverkennung oder auch ein Therapieversagen frühestmöglich erkannt werden (Cristofanilli und Mendelsohn 2006; Hayes et al. 2006).

Die Probenentnahme von disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark mittels einer Knochenmarksbiopsie oder auch -aspiration ist deutlich invasiver und mit mehr Risiken sowie Umständen für den Patienten verbunden als die zur Probengewinnung von zirkulierenden Tumorzellen aus Blutproben im Rahmen der *liquid biopsy* (de Bono et al. 2008). Jedoch stellt die Detektion aufgrund der geringen Anzahl im Blut zirkulierender Tumorzellen immer noch eine große Herausforderung dar, denn die Häufigkeit einer CTC bezogen auf andere Blutzellen ist mit 1:100.000-1.000.000 sehr gering (Balic et al. 2005).

Die Detektion von Mikrometastasen mit Hilfe hochauflösender Bildgebungen, wie der Mammographie oder des MRTs, ist zurzeit noch nicht möglich (Alsamarai et al. 2012). Daher ist in den Fokus der Wissenschaft die *liquid biopsy* getreten. Da CTCs häufig stoffwechselaktive Zellen sind, verfügen sie auch über die Fähigkeit in Apoptose zu gehen, sodass ein hoher CTC-Spiegel notwendig ist um diese im Blut zu detektieren bzw. auf Veränderung bezüglich ihres Methylierungsstatus, Mutationen oder Resistenzen gegenüber Therapiemaßnahmen zu testen (Nagrath et al. 2007). Das Vorhandensein von CTCs im peripheren Blut scheint daher ein Frühindikator für eine Metastasierung zu sein und kann auf eine Tumorausbreitung vor dem Auftreten von klinischen Symptomen oder dem Nachweis durch Bildgebung hindeuten (Pantel et al. 2009). Hohe CTC-Spiegel liegen oft nur bei metastasierenden Karzinomerkkrankungen vor (Aktas et al. 2011), sodass man nach einem anderen Biomarker gesucht hat. So zeigten Bettegowda et al. (2014), dass bei Karzinomerkkrankten in frühen als auch in metastasierten Stadien, bei denen CTCs im Blut gefunden wurden, auch zirkulierende zellfreie Tumor-DNA nachweisbar war. Daher kamen Bettegowda et al. (2014) zu der These, dass das Auffinden und die Analyse von ctDNA zur Identifizierung von Brustkrebs in früheren Stadien helfen kann.

Die Mammakarzinombiopsie unterliegt Einschränkungen, da sie lediglich eine Momentaufnahme des Tumorgewebes zu dem Entnahmezeitpunkt erfasst, die einer Selektionsverzerrung unterliegt und die Tumorveränderungen möglicherweise nicht darstellt. Außerdem kann die Detektion der ctDNA-Last nicht nur als Präventionsmarker hilfreich sein, sondern auch die Analyse der genetischen Merkmale des Tumors ermöglichen, was zu einer personalisierten Tumortherapie beim Mammakarzinom beitragen kann (Rohanizadegan 2018).

Die Freisetzung der zirkulierenden zellfreien Tumor-DNA erfolgt durch apoptotische, nekrotisierende Prozesse sowie durch eine aktive Zellsekretion des Karzinoms selbst, was bei Mammakarzinompatientinnen zu einem hohen Anteil an zirkulierender DNA, mRNA und microRNA im Blut führt. Da zirkulierende zellfreie Tumor-Nukleinsäuren die Eigenschaften des Primärtumors und sogar die der Mikrometastasenzellen widerspiegeln, können sie möglicherweise ausgezeichnete Blutbiomarker für das Mammakarzinom-Screening darstellen (Schwarzenbach 2013).

Zusätzlich könnte die Analyse von ctDNA und spezifischen Promotorhypermethylierungen die derzeitigen invasiven histologischen Biopsieuntersuchungen ergänzen, um spezifische Mutationen zu identifizieren, die beispielsweise mit einer erworbenen Arzneimittelresistenz (z. B. gegen Tamoxifen, Trastuzumab oder Lapatinib) beim metastasierten Mammakarzinom einhergehen (Murtaza et al. 2013; Page et al. 2011). Das Methylierungsmuster von ctDNA kann ebenfalls verwendet werden, um die Behandlung zu überwachen. Nach einer Operation, einer Tamoxifen-Behandlung oder einer kombinierten Behandlung von Mammakarzinompatientinnen kann sich das Methylierungsmuster von ctDNA ändern und dem von gesunden Kontrollpersonen ähneln (Liggett et al. 2011). Es wurde berichtet, dass eine Demethylierung der Promotorregion *RASSF1A* während der Behandlung eines Malignoms mit Tamoxifen ein Therapieansprechen anzeigt, jedoch die Persistenz oder das Auftreten einer neuen Promotorhypermethylierung eine Resistenz gegen die adjuvante Tamoxifen-Therapie bedeutet (Fiegl et al. 2005).

4.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität der getesteten Promotorregionen *MAL*, *RARB2*, *RASSF1A* und *SOX17* im Vergleich zu anderen wissenschaftlichen Studien beim Mammakarzinom

Neue wissenschaftliche Ansätze der vergangenen Jahre verfolgen das Ziel, freie zirkulierende Nukleinsäuren im Blut mit Hilfe von unterschiedlichen PCR-Verfahrenstechniken nachzuweisen um geeignete genetischen und epigenetische Tumormarker des Mammakarzinoms zu etablieren (Schwarzenbach et al. 2011a).

Die DNA-Methylierung ist ein häufiges, frühes Ereignis in der Karzinogenese und kann ein potenzieller Prädiktor für das Krebsrisiko sein. Eine epigenetische Veränderung kann zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Methylierung von CpG-reichen Regionen in der Nähe der Transkriptionsstartstelle führen (Kohler et al. 2009).

Nach ausführlicher Literaturrecherche rückten daher, die in der Einleitung ausführlich beschriebenen, epigenetischen Tumormarker des Mammakarzinoms in den Fokus. Epigenetische Veränderungen werden bei vielen Tumorentitäten beobachtet. Häufig sind Tumorsuppressorgene hypermethyliert und liegen damit herunter reguliert vor. Insbesondere wurde bei Patientinnen mit Brustkrebs die Methylierung von Tumorsuppressorgenen beschrieben, die im Serum oder Plasma gesunder Frauen nicht methyliert vorkommen (Agostini et al. 2012; Jing et al. 2007).

Die ermittelte diagnostische Testspezifität für die quantitative, methylierungsspezifische Einzschritt-*Real-Time*-PCR der hier vorliegenden experimentellen Studie der Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* beträgt jeweils 95 %, wobei 38 von 40 gesunden Blutspendern keine Hypermethylierung der untersuchten Testgene zeigten. Die Falsch-negativen Ergebnisse beliefen sich auf zwei von 40 Blutspendern für jedes Testgen. Die diagnostische Sensitivität basierte ebenfalls auf die in Doppelbestimmung durchgeführten Multiplex-PCR-Testung der Mammakarzinomplasmaproben (n = 28) und den daraus resultierenden Ct-Mittelwerten. Die Bewertung erfolgt analog der diagnostischen Spezifität anhand der promotorspezifischen *Cut-Off*-Ct-Werte in positiv (methyliert) und negativ (nicht methyliert). Die ermittelte Sensitivität für die Testgene liegt für *MAL* bei 0%, *RAR β 2* bei 3,6 %, *RASSF1A* bei 10,7 % und *SOX17* bei 3,6 %.

Vergleichend zu Agostini et al. (2012) untersuchte die Studiengruppe Patientinnen (n = 39), die an einem duktalem Mammakarzinom erkrankten auf Hypermethylierungen der Gene *RASSF1A*, *MAL* und *SFRP1*. Es konnte ctDNA aus EDTA-Plasmaproben isoliert werden. Die Isolierte Tumor-DNA wurde mit Natrium-Bisulfit vorbehandelt und dann mittels einer kombinierten quantitativen, methylierungsspezifischen, fluoreszenz-basierten *Real-Time*-PCR, analysiert. Die Spezifität betrug für *RASSF1A*, *MAL* und *SFRP1* 100 % bei einem Kontrollkohortenumfang von 49 Frauen (n = 49). Die Sensitivität belief sich für *RASSF1A* auf 23 %, *MAL* 13 % und für *SFRP1* 10 %, sodass zusammengenommen bei 41 % der analysierten cfDNA-Proben eine Hypermethylierung für mindestens eines der untersuchten Gene positiv war (Agostini et al. 2012). Die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* ist eine der häufigsten molekularen Veränderungen bei Karzinomerkrankungen. Die Methylierung von *RASSF1A* ist daher ein attraktiver Biomarker für die Krebsfrüherkennung, da die Promotorhypermethylierung bei Hochrisikopatienten häufig vorhanden ist. Schon Monate bis Jahre vor der Diagnose

eines Mammakarzinoms kann diese im peripheren Blut nachweisbar sein (Hesson et al. 2007; Klotten et al. 2013; Yazici et al. 2009).

Die Arbeit um Klotten et al. (2013) zeigte die Testung von Promotormethylierung an sieben Tumorsuppressorgenen (*SFRP1*, *SFRP2*, *SFRP5*, *ITIH5*, *WIF1*, *DKK3* und *RASSF1A*) aus Serum extrahierter ctDNA. Die Untersuchung fand an zwei unabhängigen Kohorten von insgesamt 602 Serum- und 112 Mammakarzinomgewebeproben statt. Zunächst wurde an einem Testset (n = 261 Seren und n = 112 Gewebeproben) die Bestimmung aller Gene durchgeführt und in einem unabhängigen Validierungsansatz (n = 343 Seren) die vielversprechendsten Gene aus der Vortestung auf die Verwendung als Biomarker für die Früherkennung eines Mammakarzinoms analysiert. Sowohl in der Testkohorte als auch in der Validierungsgruppe konnte eine *ITIH5*- und *DKK3*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 41 % bei einer Spezifität von 93 % bzw. 100 % gezeigt werden. Die Untersuchung fand an 112 Serumproben statt, wobei allein betrachtet eine *DKK3*-Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 33 % zeigten, demgegenüber lag bei 87 % (n = 112) eine *DKK3*-Hypermethylierung im Mammakarzinomgewebe der Testkohorte vor. Die Spezifität von 99 % (n = 102) sowie 100 % (n = 20) ergab sich aus der Testung von Frauen mit einer benignen Mammaerkrankung. Die Kombination dieser Gene mit einer *RASSF1A*-Methylierung erhöhte die Sensitivität auf 67 % bei einer Spezifität von 69 % und 82 % bei gesunden bzw. bei Probanden mit gutartigen Läsionen der Mamma. Außerdem wurden Seren von 59 Frauen mit gutartigen Brustläsionen und von 58 Kolonkarzinompatientinnen getestet, um eine Erhöhung der Spezifität zu erreichen. Die Methodik der quantitativen methylierungsspezifischen PCR in der *MethyLight*-Technik mit Bisulfit-Vorbehandlung der DNA-Gewebe sowie -serumproben wurde hier angewendet (Klotten et al. 2013).

Die Korrelation der hypermethylierten Promotorregionen *APC*, *RASSF1A* und *ESR1* mit dem Vorhandensein von CTCs konnte die Arbeitsgruppe um van der Auwera et al. (2009) bei metastasierten Mammakarzinompatientinnen aufzeigen. Außerdem wurden CTCs und karzinombedingte hypermethylierte DNA im Blut unabhängig voneinander auf die Eignung als Marker für eine Metastasierung beim Mammakarzinom untersucht. Die Probenmaterialien umfassten Vollblut-, Plasma- und Serumproben von 80 Mammakarzinompatienten (n = 80) und 20 gesunden Probanden (n = 20), die nach DNA-Extraktion ebenfalls eine Natrium-Bisulfit-Vorbehandlung erfahren haben. Das *CellSearch*-System wurde verwendet, um CTCs in den Blutproben aufzufinden. Die Gesamt-DNA-Plasmakonzentration wurde durch ein quantitatives PCR-Verfahren bestimmt. Die Seren wurden mittels einer methylierungsspezifischen, quantitativen PCR auf die drei genannten Promotorregionen untersucht. Die Gesamt-DNA von Mammakarzinompatienten war im Vergleich zu den gesunden Probanden signifikant erhöht ($p < 0,001$) und korrelierte mit der Anzahl der CTCs ($r = 0,418$, $p < 0,001$). Eine Hypermethylierung eines oder mehrerer

Gene wurde in 42/80 (53 %) Serumproben von Brustkrebspatientinnen und in 3/80 (16 %) Serumproben von Kontrollpersonen ($p = 0,003$) nachgewiesen. Eine Hypermethylierung des *APC*-Gens konnte mit einer Sensitivität von 29 %, des *RASSF1A*- von 35 % und des *ESR1*-Gens von 20 % bei Mammakarzinompatienten nachgewiesen werden. Die Spezifitäten beliefen sich für *APC* auf 95 %, bei *RASSF1A* auf 100 % und bei *ESR1* auf 89,5 %. Der Nachweis eines hypermethylierten Gens im Serum korrelierte mit dem Nachweis von CTCs im Blut ($p = 0,03$). Diese Ergebnisse können auf zwei Arten interpretiert werden, indem CTCs als potenzielle Quelle für zirkulierende tumorspezifische DNA angesehen werden oder hohe CTC-Konzentrationen und zirkulierende methylierte DNA Ausdruck einer aggressiveren Tumorentität sind (van der Auwera et al. 2009). Matuschek et al. (2010) zeigten in dieser Hinsicht ebenfalls eine korrelierende Assoziation von methylierten *APC*- und *GSTP1*-Promotorregionen mit dem Vorhandensein von CTCs bei fortgeschrittenem Stadium von Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt sind. Die Studie umfasste prospektiv Serumproben von 85 Mammakarzinompatientinnen ($n = 85$) und 22 gesunden Probanden ($n = 22$). Die Seren wurden mittels einer methylierungsspezifischen PCR nach dem *MethyLight*-Prinzip auf *APC*, *RASSF1A*, *ESR1*, *CDKN2A (p16)* und *GSTP1* untersucht. Zuvor erfolgte auch hier eine Natrium-Bisulfit-Behandlung der isolierten DNA. Es konnte eine Hypermethylierung des *APC*- bei 29 % (25/85), des *RASSF1A*- bei 26 % (22/85), des *GSTP1*- bei 18 % (14/76) und des *ESR1*-Gens bei 38 % (32/85) der getesteten Mammakarzinompatienten gezeigt werden. Die Spezifität für *APC* belief sich auf 91 % sowie für *RASSF1A* und *ESR1* auf jeweils 77 % (5/22). Bei hypermethylierter DNA bezüglich des *APC*-Gens wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Karzinompatienten und gesunden Probanden festgestellt. Darüber hinaus korrelierte das Vorhandensein von methyliertem *APC*, *RASSF1A* und CTCs signifikant mit dem T-Stadium (T1 und T2 gegenüber T3 und T4) und der AJCC-Einstufung ($p = 0,001$, $p = 0,031$ bzw. $0,002$). Methyliertes *GSTP1* wurde vorwiegend im Serum von Patienten mit großem Primärtumor gefunden ($p = 0,023$) und korrelierte stark mit dem positiven *Her2/neu*-Status ($p = 0,003$). Methyliertes *ESR1* zeigte keine signifikanten Korrelationen mit einem der oben genannten Parameter in dieser Studie (Matuschek et al. 2010). Müller et al. untersuchten bereits im Jahr 2003 das Vorliegen von DNA-Methylierungen in Mammakarzinomserumproben, die noch keine Therapie erhalten hatten, ob DNA-Methylierungen beim Mammakarzinom prognostisch von Bedeutung sind. Im Genevaluierungsansatz wurden fünf Gene *ESR1*, *APC*, *HSD17B4*, *HIC1* und *RASSF1A* identifiziert von insgesamt 39 analysierten Genen mit der angewandte Methode *MethyLight*. Das Genevaluierungsset bestand aus zehn Serumproben von metastasierten Patienten, 26 Patienten mit primärem Brustkrebs und zehn Kontrollproben. Um den prognostischen Wert der im Genevaluierungssatz identifizierten Gene zu bestimmen,

wurden 24 Serumproben von Patienten analysiert, die keine adjuvante Behandlung vor der Probenentnahme erhalten hatten. Im Trainingsset hatten Mammakarzinompatienten mit methylierter Serum-DNA für *RASSF1A* und/oder *APC* die schlechteste Prognose für das Gesamtüberleben ($p < 0,001$). Dieser Befund wurde durch die Analyse von Serumproben aus dem unabhängigen Testansatz ($p = 0,007$) bestätigt. Bei der Analyse aller 86 untersuchten Patientenproben zeigte sich, dass methylierte *RASSF1A*- und/oder *APC*-Serum-DNA unabhängig voneinander mit einem schlechten Therapieergebnis assoziiert ist und mit einer erhöhten Mortalität einhergeht (Müller et al. 2003).

Skvortsova et al. (2006) zeigten, dass die Karzinogenese durch die erhöhte Konzentration an ctDNA sowie durch tumorbedingte Veränderungen der Blutplasma-DNA gekennzeichnet ist. Die Konzentration der ctDNA und die Methylierung der Promotorregionen *RAR β 2*, *RASSF1A* und *HIC1* wurden von EDTA-Plasmaproben gesunder Probanden ($n = 10$), Patientinnen mit Brustkrebs ($n = 20$) und Patientinnen mit einem benignen Fibroadenom ($n = 15$) in einer methylierungsspezifischen PCR mit einer Vorbehandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit untersucht. Die Arbeitsgruppe um Skvortsova et al. (2006) stellte dar, dass es während der Tumorentstehung zu signifikanten Veränderungen in der Verteilung von zirkulierender DNA kommt, indem eine Unterscheidung zwischen zellfreien und zelloberflächengebundenen DNA-Fractionen besteht. Die Analyse der *RAR β 2*- und *RASSF1A*-Methylierung bezüglich der gesamten zirkulierenden DNA wies eine diagnostische Sensitivität von 95 % bei Brustkrebspatientinnen, 60 % bei Patientinnen mit einer gutartigen Läsion und zeigte bei gesunden Frauen keine falsch positiven Ergebnisse (Spezifität 100 %). Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die methylierungsspezifische PCR von *RAR β 2*- und *RASSF1A*-Genen auf der Basis der gesamten zirkulierenden DNA in Kombination mit der quantitativen Analyse der zirkulierenden DNA-Verteilung zwischen zellgebundenen und zellfreier DNA im Blutplasma zwischen malignen und benignen Mammaerkrankungen unterscheiden kann (Skvortsova et al. 2006).

Rykova et al. (2008) untersuchten EDTA-Plasmaproben von insgesamt 76 Probanden bestehend aus 25 gesunden, 24 Frauen mit einer Mastopathie, 24 Frauen mit einem Fibroadenom sowie eine Mammakarzinompatientin prä- und zwei postoperativ bezüglich des Methylierungsstatus der Gene Cyclin D2 und *RAR β 2* zur Etablierung eines Mammakarzinom-Screening-Assays. Die methylierungsspezifische PCR wurde unter Verwendung der gesamten zirkulierenden DNA aus dem Blutplasma durchgeführt, einschließlich der zellfreien und zelloberflächengebundenen DNA-Fractionen. Nur eine der 25 Frauen der klinisch gesunden Gruppe wies ein methyliertes Cyclin D2-Gen auf, was einer Spezifität von 96 % ausmacht. 42 % der Patienten, die an einem Fibroadenom der Mamma erkrankt sind, zeigten jedoch ebenfalls eine

Hypermethylierung von mindestens einem der getesteten Gene, 33 % der Frauen mit einer Mastopathie wiesen ebenfalls eine Hypermethylierung auf (Rykova et al. 2008).

Die Studie um Hoque et al. (2006) stellte zunächst fest, dass eine aberrante Methylierung der vier Genen *APC*, *GSTP1*, *RASSF1A* und *RAR β 2* bei westafrikanischen Frauen (n = 93) aus dem Senegal, die an einem primären Mammakarzinom erkrankt sind und sich in einem überwiegend fortgeschrittenen Stadium befinden, vorliegt. Die Methodik der quantitativen methylierungsspezifischen PCR wurde angewendet. Das Blutplasma der Mammakarzinompatientinnen und von 76 gesunden Kontrollpersonen (n = 76) wurde auf das Vorhandensein einer Hypermethylierung der genannten Gene untersucht, nachdem die isolierte DNA mit Bisulfit inkubiert wurde. Das mittlere Alter der erkrankten Frauen betrug 44,9 Jahre, das der gesunden Frauen 37,3 Jahre. Die Kohorte der Erkrankten setzte sich aus sechs (7 %) Stadium I-, 18 (20 %) Stadium II-, 43 (48 %) Stadium III- und 23 (26 %) Stadium IV-Mammakarzinompatientinnen zusammen. Darunter hatten 9 % ein invasives duktales, 6 % ein invasives lobuläres und 85 % ein schlecht differenziertes, invasives Mammakarzinom. Die Methylierung mindestens eines Gens der getesteten Validierungskohorte ergab eine Sensitivität von 62 % bei einer Spezifität von 87 %. Darüber hinaus konnte eine Hypermethylierung in 33 % (8/24) der Mammakarzinompatientinnen im Frühstadium (I und II, n = 24) und in 65 % (43/66) der Erkrankten im Stadium III-IV nachgewiesen werden. Die Testung des unabhängigen Validierungssets (n = 85) hinsichtlich einer Hypermethylierung der getesteten Promotorregionen ergab Sensitivitäten für *APC* von 17 %, *GSTP1* sowie *RAR β 2* von 26 % und *RASSF1A* von 32 % bei Spezifitäten von 92 bis 100 %. Die Testung des Methylierungsstatus von Mammakarzinomgewebeproben (n = 84) ergab, dass eine Methylierung von *RAR β 2*, *RASSF1A*, *APC* und *GSTP1* in 23 %, 44 %, 42 % bzw. 14 % der untersuchten Gewebeproben bestand. Das Vorhandensein einer Methylierung eines dieser vier Gene wurde in 57 % der Brustkrebsgewebeproben nachgewiesen, ähnlich der Ergebnisse aus den Blutplasmaproben (Hoque et al. 2006).

Die Arbeitsgruppe um Radpour et al. (2011) untersuchte ein Gen-Panel bestehend aus zehn möglichen Promotorregionen *APC*, *BIN1*, *BMP6*, *BRCA1*, *CST6*, *ESR1*, *GSTP1*, *p16*, *p21* und *TIMP3* zur Entwicklung eines Mammakarzinom-spezifischen Bluttests zur Unterscheidung zwischen Karzinompatientin und gesunden Probanden. Die Anzahl von 126 Proben, bestehend aus zwei verschiedenen Kohorten, wurde analysiert, wobei die erste Kohorte aus Plasmaproben von Mammakarzinompatientinnen (n = 36) und gesunden Kontrollpersonen (n = 30) bestand. Die zweite Kohorte bestand aus 20 Patientinnen mit Mammakarzinom, von denen jeweils Tumorgewebe, gesundes Mammagewebe und Serum untersucht wurde. In der ersten Kohorte war im Vergleich zu den gesunden Probandinnen signifikant mehr zirkulierende zellfreie

methylierte DNA bei acht Tumorsuppressorgenen nachweisbar ($p < 0,01$). In der zweiten Kohorte zeigte sich eine Hypermethylierung von sieben Genen in Tumorgewebe- und Serumproben im Vergleich zum gesunden Gewebe ($p < 0,05$). Unter der Verwendung eines acht Gen-Panels zur Entwicklung eines blutbasierten Tests zur Detektion eines Mammakarzinoms konnte eine Sensitivität und Spezifität von über 90 % erreicht werden. Die angewandte Methode in Form von MALDI-TOF-MS (EpiTYPER™-Assay, Sequenom, San Diego, CA, USA) beruht auf dem Prinzip der methylierungsspezifischen, quantitativen, matrixunterstützten Laserdesorptions-/Ionisierungs-Flugzeit-Massenspektrometrie. Eine Bisulfit-Vorbehandlung der extrahierten DNA hat ebenfalls stattgefunden. Außerdem zeigte die Untersuchung von Radpour et al. (2011), dass es Sensitivitätsunterschiede bezüglich der Testung von Plasma und Serum für die 10 analysierten Promotorregionen gibt. Beispielsweise wies *APC* eine Sensitivität von 50 % im Plasma gegenüber einer Sensitivität von 25 % im Serum bei gleicher Spezifität von 90 % auf (Radpour et al. 2011). Ziel der Studie um Martinez-Galan et al. (2008) war es, den Zusammenhang zwischen Hypermethylierungen von Genen und den wichtigsten klinisch-pathologischen Merkmalen des Mammakarzinoms aufzuzeigen. Eine quantitative methylierungsspezifische PCR-Technik (*SYBR Green*) wurde zur Etablierung von Mammakarzinom-Biomarkern in Form von zirkulierender DNA mit *CpG-Islands*-Hypermethylierung von *ESR1*-, *APC*-, *RAR β* -, *14-3-3- σ* - und *E-cad*-Genpromotorregionen verwendet. Es wurden präoperative Serumproben von 106 Mammakarzinompatientinnen ($n = 106$), 34 mit gutartiger Mammaläsionen ($n = 34$) und 74 gesunden Kontrollprobanden ($n = 74$) sowie Serumproben nach Therapie von 60 Brustkrebspatientinnen ($n = 60$) analysiert. Es zeigten sich hypermethylierte *ESR1*- und *14-3-3- σ* -Genpromotorregionen mit einem signifikanten Unterschied zwischen Mammakarzinompatientinnen und gesunden Kontrollpersonen ($p = 0,0112$ für *ESR1* und $p = 0,0047$ für *14-3-3- σ*). Eine Untersuchung der Hypermethylierung beider Gene zeigte einen signifikanten ($p < 0,0001$) Unterschied zwischen Brustkrebspatientinnen und gesunden Kontrollpersonen, die Sensitivität lag bei 81 % und die Spezifität bei 88 %. Das Vorhandensein von methyliertem *ESR1* im Serum von Brustkrebspatientinnen korrelierte mit dem negativen Östrogenrezeptorstatus des Mammakarzinoms ($p = 0,0179$). Eine Hypermethylierung der ctDNA aus Serumproben an *ESR1*- und *14-3-3- σ* -Loci wurde bei Mammakarzinompatientinnen, in-situ-Karzinomen sowie benignen Mammaläsionen beobachtet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei Betrachtung der methylierten *ESR1*- oder *14-3-3- σ* -Werte zwischen Messungen vor und nach der Behandlung beobachtet, sodass die Ergebnisse einige Zweifel aufwerfen, ob mittels dieser sensitiver Technik die Identifizierung der Hypermethylierung spezifischer Promotorregionen aus Serum extrahierter DNA für die Krebsfrüherkennung geeignet sind (Martinez-Galan et al. 2008). Die angeschlossene Forschungsarbeit von Martinez-Galan et al. (2014) zeigte die Beziehung

zwischen dem Östrogenrezeptorexpressionsstatus in Tumorgewebeproben und der Methylierung der 5'-CpG-Promotorregion des *ESR1*-Gens aus frei zirkulierender DNA auf, welche aus Plasmaproben von nicht metastasierten Brustkrebspatientinnen ($n = 110$) isoliert wurden. Die angewandte Methode war dieselbe wie in der Studie 2008. Die Ergebnisse zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von methyliertem *ESR1* bei Patientinnen mit Brustkrebs und einem negativen Östrogenrezeptor-Status im Tumorgewebe ($p = 0,0179$). Es konnte außerdem ein Trend gesehen werden, indem es mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer *ESR1*-Methylierung bei Mammakarzinom-Phänotypen mit einer schlechteren Prognose kommt, so bei 80 % der triple-negativen Mammakarzinompatienten, 60 % der *Her2/neu*-positiven-Patienten gegenüber Mammakarzinompatientinnen, die ein histopathologisch gesichertes Luminal A- (28 %) oder ein Luminal B-Mammakarzinom (5,9 %) aufwiesen. Die Expression des Östrogenrezeptors ist ein wichtiger Marker für die Prognose und sagt das Ansprechen auf eine endokrine Therapie bei Brustkrebs voraus (Martinez-Galan et al. 2014).

Die Arbeit von Fackler et al. (2014) veranschaulichte, dass mit einem Marker-Panel von zehn ausgewählten Genen (*AKR1B1*, *COL6A2*, *GPX7*, *HIST1H3C*, *HOXB4*, *RASGRF2*, *RHGEF7*, *TM6SF1*, *TMEFF2* und *RASSF1A*) malignomspezifische, hypermethylierte zirkulierende ctDNA in Serumproben mittels einer quantitativen, methylierungsspezifischen Multiplex-PCR in einer Trainingskohorte ($n = 28$ Gesunde, $n = 24$ metastasiertes Mammakarzinom, Stadium 4) und einer Testkohorte ($n = 27$ Gesunde, $n = 33$ metastasiertes Mammakarzinom, Stadium 4) mit einer Sensitivität von 91 % und einer Spezifität von 96 % der Testkohorte nachweisbar sind. Eine Bisulfit-DNA-Vorbehandlung fand statt. Eine *HOXB4*-Hypermethylierung zeigte sich allein betrachtet in der Trainingskohorte mit einer Sensitivität von 46 % bei einer Spezifität von 100 % sowie in der Testkohorte mit einer Sensitivität von 36 % bei einer Spezifität von ebenfalls 100 %. Eine alleinige Betrachtung des *RASSF1A*-Gens in der Trainingskohorte wies eine Hypermethylierung mit einer Sensitivität von 75 % bei einer Spezifität von 96 % sowie in der Testkohorte eine Sensitivität von 67 % bei einer Spezifität von ebenfalls 100 % auf. Die angewandte Methode *cMethDNA* wurde in Form von zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Multiplex-PCR mit Bisulfit-vorbehandelter isolierter DNA aus den Serumproben. Die entstandenen Amplifikate wurde dann 1:500-1:50.000 verdünnt um diese in der zweiten PCR-Reaktion mittels einer quantitativen, methylierungsspezifischen *Real-Time*-PCR zu untersuchen. Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass der *cMethDNA*-Test metastasierte Mammakarzinomerkrankungen detektiert und die Tumormasse sowie das Ansprechen auf eine Tumorthherapie bei Frauen in fortgeschrittenen Stadien anzeigen kann (Fackler et al. 2014).

Die Studiengruppe um Chimonidou et al. (2011) konnte zeigen, dass Tumorsuppressor- und Metastasensuppressorgene in CTCs, die aus peripherem EDTA-Blutplasma von Mammakarzinompatientinnen isoliert wurden, durch epigenetische Veränderung herunterreguliert sind. Der Stichprobenumfang belief sich auf 56 operable Mammakarzinompatientinnen, 27 metastasierte Mammakarzinomerkrankte und 23 gesunde Kontrollprobandinnen. Die untersuchte DNA, die aus der *EpCAM*-positiven immunomagnetisch selektierten CTC-Fraktion extrahiert wurde, wurde auf die Methylierung bzw. fehlende Methylierung der *CST6*-, *BRMS1*- und *SOX17*-Promotorsequenzen überprüft. Die durchgeführte Methode war eine methylierungsspezifische PCR mit einer vorherigen Natrium-Bisulfit-Reaktion. Alle Proben wurden zusätzlich mittels einer quantitativen RT-PCR auf die Expression von *KRT19* (Keratin 19) überprüft. In CTCs von Patienten mit verifizierter Metastasierung wurde eine Promotorhypermethylierung von *CST6* in 37,0 %, *BRMS1* in 44,4 % und *SOX17* in 74,1 % der Fälle beobachtet gegenüber Patientinnen mit operablem Mammakarzinom, bei denen eine Promotorhypermethylierung von *CST6* in 17,9 %, *BRMS1* in 32,1 % und *SOX17* in 53,6 % nachgewiesen wurde. Die Spezifität von *CST6* und *SOX17* belief sich jeweils auf 95,7 % sowie für *BRMS1* auf 91,3 %. Die DNA-Hypermethylierung dieser Gene bei operablem und metastasiertem Mammakarzinom unterschied sich signifikant von derjenigen der Kontrollpopulation, sodass eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein von CTCs und hypermethylierter DNA des *SOX17*-Promotors bei Mammakarzinompatienten nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors festgestellt wurde (Chimonidou et al. 2011). 2013 veröffentlichte die Studiengruppe um Chimonidou et al. die Untersuchung des Methylierungszustandes der *SOX17*-Promotorregion in CTCs und von ctDNA. Die Untersuchung fand an 114 gepaarten DNA-Proben statt, die aus CTCs und ctDNA von Mammakarzinompatientinnen isoliert wurden sowie an 60 gesunden Individuen. Der *SOX17*-Promotor wurde in 86 % (68/79) der primären Mammakarzinomproben hypermethylierter ctDNA vorgefunden. In CTCs war *SOX17* mit 34,5 % (19/55) bei Patientinnen mit Brustkrebs im Frühstadium, mit 45,8 % (27/59) bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und mit 4,3 % (1/23) bei gesunden Personen methyliert vorgefunden worden während in korrespondierenden ctDNA-Proben *SOX17* bei 34,5 % (19/55), 40,7 % (24/59) und 2,0 % (1/49) in diesen Gruppen hypermethyliert vorlag. Es gab eine signifikante Korrelation zwischen *SOX17*-Hypermethylierung bezüglich ctDNA und CTCs bei Patienten mit Brustkrebs im Frühstadium ($p = 0,008$), jedoch nicht bei Patienten mit verifizierter Metastasierung ($p = 0,283$) (Chimonidou et al. 2013).

Die Studie von Guerrero-Preston et al. (2014) untersuchte isolierte Plasma-DNA von 174 Mammakarzinompatientinnen, die in Puerto Rico wohnhaft waren, auf Promotormethylierungen von fünf potenziellen Genen *MAL*, *KIF1A*, *FKBP4*, *VGF* und *OGDHL*. Die Analyse

der mit Bisulfit vorbehandelten isolierten DNA wurde mittels eines methylierungsspezifischen, fluoreszenz-basierten *Real-Time*-PCR-Verfahrens untersucht. Zuvor wurde eine Testkohorte bestehend aus 20 Mammakarzinomproben und 20 Kontrollprobandinnen untersucht. Dann schloss sich eine Validierungskohorten-Testung aus 154 Mammakarzinompatientinnen und 86 Proben von gesunden Frauen an. Die eingeschlossenen Patientinnen waren zwischen 39 und 89 Jahre alt. Die fünf Gene zeigten sich hypermethyliert vorliegend in einer Vortestung an gefrorenem Mammakarzinomgewebeprobe ($n = 502$) sowie in einer Zelllinien-DNA-Testung. Die Methylierung von mindestens einem der fünf untersuchten Gene wurde bei 49 % der Mammakarzinomplasmaproben im Vergleich zu 20 % der gesunden Kontrollprobandinnen ($n = 86$) gefunden. Zudem lag eine signifikante Assoziation zwischen der *MAL*-Hypermethylierung bei Mammakarzinompatientinnen bezüglich des Alters, der positiven Familienanamnese und der DNA-Reparatur-Kapazität vor ($p = 0,01$). Außerdem lag eine Methylierung der *MAL*-Promotorregion mit einer Sensitivität von 94,1 % bei einer Spezifität von 86,7 % vor (Guerrero-Preston et al. 2014).

4.2 Tumorzellinientestung

Die Untersuchung der DNA-Methylierung bei Tumorzelllinien hat den großen Vorteil, dass es sich um immortalisierte Zellen von sich *in vitro* unbegrenzt kultivierbaren Zelllinien handelt, die in der Regel einen reinen Tumorzellgehalt aufweisen sowie wünschenswerterweise nur einen Tumorzelltyp repräsentieren und nicht durch umgebendes Gewebe beeinflusst werden. So stellen Tumorzelllinien ein geeignetes Untersuchungsmaterial für molekulargenetische Methoden dar. Im Bereich von epigenetischen Veränderungen zeigten Karzinomzelllinien ein ähnliches Methylierungsmuster unterschiedlicher Gene, wie das des zu analysierenden Primärtumors. Allerdings können auch Probleme der Testung von Tumorzelllinien durch Kontamination, Kultivierungsfehler und Selektionsprozesse der Tumorzellen selbst entstehen, welches zu verfälschten Ergebnissen führt. Daher sollten die Untersuchungsergebnisse kritisch hinterfragt und objektiv bewertet werden, inwiefern eine Tumorzelllinie den zu untersuchenden Primärtumor zuverlässig repräsentiert, da zwischen Zellkultivierungseffekten und der eigentlichen Karzinomzelltransformationsprozessen unterschieden werden muss (Paz et al. 2003). Paz et al. (2003) zeigten außerdem, dass Karzinomzelllinien insgesamt eine stärkere DNA-Methylierung der *CpG-Islands* sowie eine genomweite Hypomethylierung aufwiesen als das zu untersuchende Primärkarzinom. So zeigten andere Forschungsgruppen ebenfalls, dass eine verstärkte DNA-Hypermethylierung der *CpG-Islands* in Zelllinien vorherrscht (Antequera et al. 1990; Dammann et al. 2001; Smiraglia et al. 2001).

Die Tumorzellinientestung von den Mammakarzinomzelllinien *MDA-MB-231*, *T47D* und *MCF7* zeigte, dass das in dieser experimentellen Arbeit etablierte Protokoll angewendet werden kann. Die Zelllinie *MDA-MB-231* wies ein Genexpressionsmuster mit einer Hypermethylierung der Gene *MAL*, *RASSF1A* sowie *SOX17* auf. Bei der Mammakarzinomzelllinie *T47D* konnte eine Hypermethylierung des Gens *RASSF1A* nachgewiesen werden und bei der *MCF7*-Analyse bestand eine Hypermethylierung aller getesteten Gene (vgl. Tabelle 10). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass aufgrund der Heterogenität der Mammakarzinomarten eine Untersuchung mittels eines Genpanels erforderlich ist.

4.3 Klinische Bedeutung zirkulierender Tumor-DNA und Hypermethylierung von Promotorregionen bei anderen Karzinomerkrankungen

Die Übersichtsarbeit von Cree et al. (2017) fasst die Ergebnisse von insgesamt 94 ctDNA-Studien zusammen. Bis auf fünf Arbeitsgruppen untersuchten alle anderen Studien nur eine Karzinomart, wobei in 60 % der Studien Mamma-, Kolon- und Bronchialkarzinome analysiert wurden. In den Studien wurden entweder die Gesamt-ctDNA ohne weitere Differenzierung analysiert, wie beispielsweise in Form von Hypermethylierungen oder krankheitsassoziierte Mutationen, jedoch wurden in der Mehrheit der Studien PCR-basierte Methoden angewandt. Die meisten Veröffentlichungen konzentrierten sich eher auf ctDNA im Plasma (67 Studien) als auf Serum (25 Studien), wobei zwei Studiengruppen die Ausgangsmaterialien miteinander verglichen. Plasma- wurde für 38 verschiedene und Serumproben für 28 unterschiedliche Marker verwendet, vergleichend für 18 Marker. Es wurde nur ein Gen, *APC*, bezüglich der Promotor-assoziierten Methylierung und Mutation gleichzeitig untersucht. Wenige Marker wurden analysiert um bestimmte Tumortypen zu identifizieren. Einige treten jedoch mit erhöhter Wahrscheinlichkeit bei bestimmten Tumorarten auf. Beispielsweise wurden *GNAQ*- und *GNA11*-Mutationen im Plasma von Patienten mit uvealem Melanom identifiziert. Diese Mutationen treten bei anderen Tumorarten selten oder gar nicht auf. Andere Mutationen wiederum sind nicht tumorartspezifisch, jedoch gibt es auch Gen-Mutationen, die bei mehreren unterschiedlichen Karzinomarten vorkommen (Cree et al. 2017; Metz et al. 2013).

Die Untersuchung und Messung der Gesamt-DNA sowie deren multiplen Mutationen aus Plasmaproben ist bei verschiedenen Tumorentitäten hilfreich (Newman et al. 2014). Es ist jedoch auch bekannt, dass nicht alle Karzinomarten (z. B. Gliome) erhöhte ctDNA-Spiegel im Plasma aufweisen (de Mattos-Arruda et al. 2015).

4.4 **Klinische Bedeutung zirkulierender Tumor-DNA im Vergleich zu anderen Biomarkern beim Mammakarzinom**

Mehrere Autoren haben den Nutzen von ctDNA beim Mammakarzinom mit anderen verfügbaren Biomarkern verglichen, um ihren diagnostischen und prognostischen Wert zu rechtfertigen oder in Frage zu stellen. Biomarker zur Früherkennung des Mammakarzinoms umfassen die zirkulierende Caspase- und Proteaseaktivität (Roth et al. 2011), mRNA (Joosse et al. 2014), Nukleosomen (Roth et al. 2011), das Vorhandensein von Exosomen (Wang und Ji 2018) und die CTCs (Heidary et al. 2014).

Die Studiengruppe um Roth et al. (2011) entdeckte, dass die Tumor-DNA überwiegend in Form von Nukleosomen zirkuliert und dass die Nukleosomenkonzentrationen und der ctDNA-Spiegel zwar stark miteinander assoziiert sind, die Nukleosomenkonzentration jedoch einen besseren diagnostischen Wert für die Unterscheidung gesunder Frauen von Mammakarzinompatientinnen aufweist. Die Arbeitsgruppe um Roth et al. (2011) verglich außerdem den diagnostischen Wert von ctDNA mit dem der zirkulierenden Caspase- und Proteaseaktivität und kamen zu dem Schluss, dass die zirkulierende Caspase- und Proteaseaktivität einen überlegenen diagnostischen Wert insbesondere für den Nachweis von malignen Brustkrankungen hat, während die ctDNA bei der Identifizierung von Brustkrebs in früheren Stadien helfen kann.

Exosomen, die DNA, miRNA, mRNA, Proteine und Enzyme enthalten, dienen der interzellulären Kommunikation, welche ebenfalls von Karzinomzellen gebildet werden (Kucharzewska und Belting 2013). Es wird angenommen, dass es zu einer Dysregulation dieser Exosomen kommt und dadurch zur Beeinflussung der Invasion, dem Metastasierungsverhalten von Karzinomzellen sowie der Stimulierung von Stammzellen, der Angiogenese, der Apoptose und der Zellinteraktion mit dem Immunsystem. So kann es zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Arzneimitteln und Therapeutika kommen. Damit begünstigen Exosomen die Entstehung von Karzinomkrankungen. Jia et al. (2017) zeigten, dass erhöhte CEA- und CA 15-3-Konzentrationen in den Exosomen bei Mammakarzinompatientinnen vorherrschen (Jia et al. 2017; Lowry et al. 2015).

Hannafon et al. (2016) berichtete über eine Anreicherung bestimmter microRNAs in Exosomen, die im Blutkreislauf von Mammakarzinompatientinnen freigesetzt werden. Ein direkter Vergleich von ctDNA und Exosomen als diagnostische oder prognostische Biomarker bei Brustkrebs wurde jedoch bisher nicht durchgeführt.

Ein weiterer, häufig für Brustkrebs verwendeter Biomarker ist das Tumorentigen 15-3 (CA 15-3). Obwohl dieser Biomarker eine hohe Sensitivität für die Diagnosestellung aufweist, ändern sich seine Spiegel nicht im Zusammenhang mit dem Krankheitsprogress oder einer

Remission (Duffy et al. 2010). Dawson et al. (2013) haben die ctDNA-, CA 15-3- und CTC-Spiegel bei Patienten mit Brustkrebs im Stadium I und II verglichen und gezeigt, dass alle diese Biomarker positiv miteinander und mit dem Krankheitsverlauf korrelieren. Die ctDNA-Spiegel zeigten dabei eine überlegene Sensitivität und einen größeren dynamischen Bereich, der mit Veränderungen der Tumorlast korreliert. In ähnlicher Weise haben Shaw et al. (2014) ebenfalls bestätigen können, dass ctDNA- im Vergleich zu CA 15-3- und CTC-Spiegeln eine größere Korrelation mit Veränderungen der Tumorlast aufweisen.

Yamamoto et al. (2012) konnten nachweisen, dass die Kombination eines MSP-Assays aus *GSTP1*, *RASSF1A* und *RAR β 2* und der Quantifizierung von CEA oder CA 15-3 (oder beiden) die Sensitivität zur Detektion für das Vorliegen einer Metastasierung beim Mammakarzinom verbessert.

Auch der Nachweis von einer *p53*-Mutationen in ctDNA aus Plasma eignet sich als frühzeitiger Prognosefaktor, um auf ein Rezidiv oder eine Fernmetastasierung von Patientinnen mit Brustkrebs hinzuweisen (Shao et al. 2001).

Matuschek et al. (2010) beschrieben, dass methyliertes *GSTP1* bei Patienten mit großem Primarius gefunden wurde ($p = 0,023$) und eine hoch signifikante Korrelation zum positiven *Her2/neu*-Status ($p = 0,003$) besteht. Der erhöhte Tumormarker CA 15-3, analysiert ebenfalls im Serum, korrelierte stark mit dem Nachweis von methyliertem *APC* und dem Vorhandensein von CTCs (beide $p = 0,000$).

Biomarker spielen eine wesentliche Rolle zur Festlegung der optimalen Behandlung des Mammakarzinoms. Die Analyse der Östrogen- und Progesteronrezeptoren sowie des *Her2/neu*-Status ist für eine mögliche endokrine Therapie entscheidend. Speziell für eine anti-*Her2/neu*-Therapie mit Trastuzumab, Pertuzumab, Lapatinib oder Ado-Trastuzumab-Emtansin ist die Bestimmung der *Her2/neu*-Expression obligatorisch. Auch die Bestimmung von Ki-67, trotz methodischer Probleme, kann aufgrund seines eindeutig festgelegten klinischen Wertes und der geringen Analysekosten zur Prognosebewertung hinzugezogen werden, insbesondere wenn die Werte niedrig oder hoch sind. Des Weiteren können auch Multianalysentests, wie beispielsweise Urokinase-Plasminogenaktivator und/oder der Brustkrebsindex zur Prognoseabschätzung und zur Therapieentscheidung beitragen (Duffy et al. 2017).

Zirkulierende mikroRNAs, wie *miR-155*, aktivieren *TGF- β* und induzierten so die epitheliale mesenchymale Transition der Tumorzelle und damit eine Zellinvasion (Kong et al. 2008). *MiR-155* wurde im Serum von Frauen mit Hormonstatus-positivem Mammakarzinom im Vergleich zu Frauen mit Hormonrezeptor-negativen Brustkrebs unterschiedlich exprimiert (Zhu et al. 2009) und korreliert mit dem klinischen Stadium, dem *p53*-Status und dem Proliferationsmarker Ki-67 (Liu et al. 2013).

Da die Analyse von Tumorgewebe oftmals erst nach invasiver Probenentnahme gelingen kann, verfolgt man das Vorhaben, stattdessen zirkulierende tumorassoziierte Nukleinsäuren im Blut nachweisen zu können. Für eine Bewertung des klinischen Einsatzes bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen und einer Standardisierung der Methodik (Elshimali et al. 2013).

4.5 Stärken und Schwächen der angewandten Methode

Diese Dissertationsschrift hatte zum Ziel eine quantitative, methylierungsspezifische, enzymatische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR zur Diagnostik, Früherkennung und Therapieoptimierung sowie Rezidiverkennung des Mammakarzinoms zu evaluieren. Das durchgeführte PCR-Verfahren weist Vorteile, wie beispielsweise eine Zeitersparnis durch schnelle Durchführbarkeit auf, da die quantitative Auswertung der DNA-Amplifikationsmenge in Echtzeit möglich ist. Da es sich um eine Multiplex-PCR handelt, konnte die Methylierungsbestimmung mehrerer Gensequenzen in einer DNA-Probe erfolgen. Aufgrund dieser Zeitersparnis kommt es außerdem zu einer Kosteneffizienz des Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR-Verfahrens, was ebenfalls als ein wirtschaftlicher Nutzen anzusehen ist. Ein weiterer Vorteil des angewandten Verfahrens ist die verminderte Kontaminationsgefahr, denn wie schon bereits erwähnt, erfolgt die Messung sowie die Auswertung zeitgleich, ohne die PCR-Gefäße nochmals zu öffnen oder zu versetzen. Auch das automatisierten Prä-PCR-Verfahren der DNA-Isolation minimiert das Kontaminationsrisiko (Heid et al. 1996).

Ein methodischer Unterschied zu anderen Forschungsarbeiten liegt darin, dass keine DNA-Vorbehandlung mit Natrium-Bisulfit stattgefunden hat. Diese Vorbehandlung soll dazu führen, dass unmethylierte Cytosine zu Uracilen chemisch umgewandelt werden. Diese angestrebte Konvertierung kann unvollständig verlaufen. Es entsteht bei diesem Vorgang 5-Methylcytosin, welches nicht von Hydroxymethylcytosin unterschieden werden kann. Außerdem kommt es zu einer unvollständigen Bisulfitreaktion bei doppelsträngiger DNA sowie zu einer verstärkten Fragmentierung der DNA. Diese wird besonders durch die notwendigen hohen Konzentrationen von Bisulfit-Salzen, einem niedrigen pH-Wert und einer hohen Temperatur während einer Natrium-Bisulfit-Vorbehandlung hervorgerufen, was zu einer erschwerten DNA-Analyse bis hin zum DNA-Verlust mit falschen Ergebnissen führen kann. Die Aufreinigung der Natrium-Bisulfit-behandelten DNA muss dann zwangsläufig folgen um störende Reagenzien, die während der Konvertierung eingesetzt wurden, zu entfernen (Grunau et al. 2001; Warnecke et al. 2002).

Im Vergleich zu anderen Studien wurde in der hier angewandten Methodik bewusst auf eine Natrium-Bisulfit-Vorbehandlung der Plasmaproben verzichtet um eine mögliche Fehlerquelle, die bereits erläuterte Modifikation der zu amplifizierenden ctDNA, zu umgehen. Der

Versuchsaufbau und das etablierte Protokoll zeigten in der Tumorzellinientestung zufriedenstellende Ergebnisse und ist somit zur Untersuchung histologischer Proben anwendbar. Der relativ geringe Stichprobenumfang von 40 gesunden Blutspender-, 28 Mammakarzinomplasma- und drei Zelllinien-DNA-Proben birgt zwar das Risiko einer statistischen Verzerrung und Fehlinterpretationen der ermittelten Ergebnisse, dennoch eignet sich die Methodik jedoch nicht bezüglich der Detektion von zirkulierender Tumor-DNA aus Plasmaproben in Anbetracht der niedrigen diagnostischen Sensitivitäten der untersuchten Testgene (*MAL* 0 %, *RAR β 2* 3,6 %, *RASSF1A* 10,7 % und *SOX17* 3,6 %).

4.6 **EDTA-Plasma als geeignetes Ausgangsmaterial und die Präanalytik für die quantitative, methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR**

Der Anteil der zirkulierenden Tumor-DNA an der gesamten zirkulierenden zellfreien DNA ist im Plasma höher als im Serum, da die höheren zirkulierenden DNA-Spiegel im Serum auf die DNA-Freisetzung aus den von hämatopoetischen Zellen, besonders den Leukozyten, während des Gerinnungsvorganges in der Serummonovette zurückzuführen sind (Aung et al. 2014). Diese Annahme bestätigte die Studiengruppe um Schwarzenbach (2013) ebenfalls (Schwarzenbach 2013; Schwarzenbach et al. 2011b). Der so entstandene Verdünnungseffekt für ctDNA im Serum führt zu einer verminderten Nachweisbarkeit von Mutationen insbesondere mit Methoden geringer analytischer Sensitivität (Page et al. 2013). Die meisten Veröffentlichungen befassten sich daher in den vergangenen Jahren eher mit Plasma als mit Serum (Bettegowda et al. 2014). Thormann (2015) aus unserer Arbeitsgruppe verwendete die auch hier angewendete quantitative methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR zur Untersuchung von Patienten mit Kolorektalkarzinom. Er führte eine Voruntersuchung durch, in der er Patientenplasma- und Patientenserumproben ($n = 3$) miteinander verglichen hat. Hier ergab sich für die Promotorregion *NEUROG1* eine signifikante Überlegenheit des Hypermethylierungsnachweises aus EDTA-Plasma gegenüber der Serumtestung ($p = 0,0381$). Bei der Analyse von *RUNX3*, *SEPTIN9*, *TMEFF2* und *SDC2* war kein Unterschied zwischen Plasma und Serum zu beobachten (Thormann 2015). Basierend auf den genannten Ergebnissen erfolgte in dieser Arbeit sowohl die Untersuchung der gesunden Blutspendekohorte als auch der Mammakarzinompatienten an aus EDTA-Plasma isolierter DNA.

Die Übersichtsarbeit von Schwarzenbach (2013) zeigt, dass es bei Mammakarzinompatienten zu diskrepanten Daten der ctDNA-Konzentrationen aus Serum- im Vergleich zu Plasmaproben kommt. Die Analyse der ctDNA aus Serumproben ergab, dass zwischen gesunden und an einem

invasiv wachsenden Mammakarzinom erkrankten Frauen unterschieden werden konnte, jedoch nicht zwischen anderen malignen und gutartigen Mammatumoren (Schwarzenbach 2013).

Im Gegensatz dazu waren die Plasmakonzentrationen von tumorspezifischer DNA bei Patientinnen mit Brustkrebs signifikant höher als bei Patientinnen mit gutartigen Tumoren der Mamma (Huang et al. 2006; Kohler et al. 2009).

Antikoagulantien, wie das hier verwendete EDTA, zur Gewinnung von Plasmaproben und Verhinderung der Spontangerinnung der Blutproben vor der weiteren Verarbeitung und Kryokonservierung, können die Qualität und Messergebnisse der PCR beeinflussen. EDTA ist zudem ein Chelatbildner, der mit Ionen, wie Magnesium oder Eisen, komplexieren kann. Da die Magnesiumionenkonzentration die Schmelztemperatur der *Annealing*-Phase beeinflussen und die Enzymaktivität der verwendeten Restriktionsendonuklease beeinträchtigen kann, ist eine Destabilisierung des PCR-Ablaufs möglich. Eine DNA-Fragmentierung oder auch eine Veränderung der Amplifikation kann durch den Probenzusatz EDTA zur Abnahme der Produktspezifität führen (Beutler et al. 1990; Ding et al. 2011; Holodniy et al. 1991; Khosravinia und Ramesha 2007).

Weitere Fehlerquellen bezüglich möglicher DNA-Veränderungen im angewandten Experiment liegen in der Probengewinnung, -lagerung und -aufbereitung. Beispielsweise wurden die entnommenen EDTA-Plasmaproben der Blutspender innerhalb von zwei Stunden nach der Entnahme zentrifugiert, um möglichst wenig zirkulierende DNA im Plasmaüberstand der Probe vorzufinden, die während der Lagerung aus Blutleukozyten freigesetzt werden. Auch die Zentrifugationsbedingungen, wie die Probenzentrifugation mit und ohne Bremswirkung hat Einfluss darauf, wo sich die zirkulierende DNA in der Blutmonovette befindet. Wie das präanalytische Vorgehen bei den käuflich erworbenen Mammakarzinomplasmaproben durchgeführt wurde, konnte nicht in Erfahrung gebracht werden. Die Proben wurden gefroren bei -20°C versendet. Ob jedoch die Kryokonservierung konstant bei -20°C aufrechterhalten wurde und somit die Kühlkette während des Transports nicht unterbrochen wurde, bleibt ungeklärt. Auch ob die Probenvorbereitung innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme erfolgte, wie empfohlen, ist in Frage zu stellen.

Bei der Lagerung gefrorener Plasmaproben, kann es außerdem zu einer partiellen Denaturierung der Tumor-DNA kommen. Auch beim vorsichtigen Auftauen, kann die enthaltene DNA Schaden nehmen (Kader et al. 2009).

Die DNA-Konzentration hängt, wie bereits in Kapitel 4.1 und 4.2 erörtert, sehr stark vom Tumorstadium und der Karzinomart ab, sodass es während der Tumorfortschreitung zu einer unbeständigen DNA-Freisetzung kommen kann. Außerdem erfolgte die DNA-Isolation der Plasmaproben lediglich aus einer Blutprobe zu einem bestimmten Zeitpunkt, wodurch die

Möglichkeit erhöht ist, falsch negative Messergebnisse zu erzielen. Jedoch erfolgte sowohl aus Mammakarzinom-, Blutspender- und Zelllinien-DNA-Proben die PCR-Testung in Doppelbestimmung, was zum Ziel hatte die Messabweichungen zu minimieren.

4.7 **Vor- und Nachteile der Prävention durch die Mammographie und die Gesamtsterblichkeit des Mammakarzinoms**

An einem Mammakarzinom, was die häufigste Tumorentität und tumorbedingte Todesursache der Frau weltweit darstellt, erkrankt aktuell jede achte Frau in ihrem Leben, wobei das mittlere Erkrankungsalter in Deutschland 64 Jahre beträgt. Auch national betrachtet war das Mammakarzinom die häufigste, malignombedingte Todesursache mit 17853 Todesfällen im Jahr 2013. Demgegenüber steht das mittlere Erkrankungsalter der Männer von 71 Jahren, die an Brustkrebs seltener erkranken (1:100). Die Todesfallzahl beim männlichen Geschlecht beläuft sich 2013 auf 156 Fälle (Barnes et al. 2016). Diese Erkrankung stellt somit eine große weltweite und nationale Herausforderung für die Gesundheitspolitik dar. Im Jahr 2005 wurde in Deutschland das zweijährliche Mammographiescreening für Frauen zwischen 50 und 69 Jahren eingeführt, dessen Kosten durch die gesetzliche Krankenversicherungen übernommen werden. Die Frauen im besagten Alter erhalten hierzu eine schriftliche Einladung in eine der 94 Mammographie-Screening-Einrichtungen mit Hilfe der Einwohnermeldeamtsdaten in Deutschland. Zurzeit ist die Mammographie die einzige evidenzbasierte, bildgebende Methode zur Erkennung von Präkanzerosen und Karzinomen der Mamma. Seit der Einführung des Mammographie-Screening-Programms 2005, stieg die Inzidenz des Mammakarzinoms, die seit 2009 wieder rückläufig ist. Einer der Vorteile des Mammographiescreenings ist es, dass in der Patientenpopulation der 50- bis 69-jährigen Frauen die Mammakarzinome in einem früheren Stadium entdeckt werden, deren Prognose dadurch besser ist. Denn die Intention von Früherkennungsmaßnahmen zielt darauf ab, Karzinome möglichst in Frühstadien zu erkennen, um sanftere Behandlungsmöglichkeiten anwenden zu können, die Lebensqualität sowie Heilungschancen zu erhöhen. Diese Tatsache kann als Vorteil und Erfolg des eingeführten Screenings angesehen werden. Ein zentrales Ziel des Mammographie-Screening-Programms ist außerdem die Senkung der Brustkrebssterblichkeit, die auch in Deutschland bis zum Jahr 2010 um 9 % gesenkt werden konnte (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. 2017; Robert Koch-Institut 2017). Jedoch ist diese Tatsache nicht auf die Einführung der Präventionsmaßnahme Mammographie zurückzuführen, da der prozentuale Anteil der Krebstodesfälle an der Gesamttodesfallzahl zu gering ist. Dies liegt unter anderem daran, dass die Gesamtmortalität nicht wesentlich durch die Senkung der karzinombedingten Mortalität des gescreenten

Karzinoms beeinflusst wird, sondern von anderen Todesursachen bestimmt wird, die nicht karzinombedingt sind. So zeigt die Studie von Møller et al. (2019), dass die Senkung der Mammakarzinommortalität bis zum Jahr 2010 um 20 % mit einer maximalen Reduktion um 1,7- bis 1,8 %-igen der Gesamtmortalität in England, Wales und Deutschland einhergeht. Diese Tatsache ist jedoch klinisch, besonders in jedem individuellen Einzelfall und für das öffentliche Gesundheitssystem bedeutsam (Møller et al. 2019; Stang und Jockel 2018).

Die zu verzeichnende Senkung der Mammakarzinommortalität basiert am ehesten auf den Fortschritten in der Therapie des Mammakarzinoms. Besonders aufgrund der Verfügbarkeit von neuen Medikamenten, diversen klinischen Studien zur Verbesserung und Effektivitätssteigerung der Therapiekonzepte sowie der stetig weiterentwickelten Methoden zur histologischen und molekulargenetischen Klassifizierung der Karzinome wird dies erreicht. Die Effektivität des Mammographiescreenings und somit die Beeinflussung der Brustkrebsmortalität ist nach der Cochrane-Analyse im Jahr 2013 für die jeweiligen Alterskohorten unterschiedlich. Die Betrachtung der letzten 13 Jahre in dieser Übersichtsarbeit wies eine statistisch nicht signifikante Reduktion der Brustkrebsmortalität von 10 % auf (Götzsche und Jørgensen 2013). Andere, zahlreiche Metaanalysen kamen zu anderen Mortalitätsreduktionsdaten. Die Studie der *EUROSCREEN*-Gruppe betrachtete das Zeitintervall von sechs bis elf Jahren und verzeichnete eine Senkung der Mammakarzinomsterblichkeit von 26 % (Njor et al. 2012).

Eine weitere Studiengruppe, das *UK Panel on Breast Cancer Screening* konnte eine Mortalitätsreduktion von 20 % aufzeigen (Marmot et al 2012). Bezüglich der unterschiedlichen Alterskohorten ist für Frauen ab dem 70. Lebensjahr die Teilnahme an der Präventionmaßnahme in Anbetracht des individuellen Risikoprofils, des allgemeinen Gesundheitszustands und einer Lebenserwartung von mindestens zehn Jahren zu empfehlen. Die Senkung der Brustkrebssterblichkeit konnte auch für die Alterskohorte von Frauen im Alter von 40 bis 49 Jahren gezeigt werden, welche jedoch niedriger ausfällt als für Frauen im Alter von 50 bis 69 Jahren. Dennoch kann ein Mammographiescreening in dieser Altersgruppe befürwortet werden, obwohl sich gesamtheitlich mehr falsch-positive und falsch-negative Befunde zeigten, weil die sich aus der Strahlenbelastung ergebenden Risiken vernachlässigbar sind. Die Identifizierung von Frauen mit einem gesteigerten Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, kann mit Hilfe von genetischen Analysen und Berechnungen von Risiko-Scores gelingen. Diese sollten dann an intensiveren, engmaschigeren und spezielleren Monitoringmaßnahmen teilnehmen (Wöckel et al. 2018a; Wöckel et al. 2018b).

Im Jahr 2014 haben in Deutschland 54,2 % der zur Präventionsuntersuchung eingeladenen Frauen eine Mammographie durchführen lassen, wobei das EU-Leitliniengremium mindestens eine 70 %-ige Teilnehmerrate als Zielsetzung verfolgt. So nehmen 45,8 % der Zielgruppe nicht

das Screeningangebot in Anspruch (Malek und Kaab-Sanyal 2016; Perry et al. 2008; Starker und Kuhnert 2017). Aufgrund der kurzen Laufzeit des eingeführten Mammakarzinomscreenings von 15 Jahren kann man noch nicht abschätzen, ob und inwieweit es zu einer weiteren Senkung der brustkrebspezifischen Mortalität kommt (Barnes et al. 2016; Starker und Kuhnert 2017). Präventionsuntersuchungen können die Entstehung von Karzinomen nicht verhindern, jedoch liegt die Spezifität des Mammographiescreenings bei ca. 96 % und die Sensitivität bei ca. 80 % (Turnbull et al. 2010).

Der Nachteil der Überdiagnosen bei falsch-positiven Mammographiebefunden ist, dass diese eine Übertherapie zur Folge haben können. Diese kann in Form von zusätzlichen diagnostischen Maßnahmen, wie weitere Bildgebung, mit erhöhter Strahlenbelastung einhergehen, oder auch zu einer Probebiopsie führen, die mit Schmerzen verbunden sein kann. Eine enorme psychische Belastung sowie eine Beeinträchtigung der Lebensqualität können aus falsch-positive Ergebnisse erfolgen, da gutartige Tumore das Überleben des Betroffenen nicht negativ beeinflusst hätten (Fehm et al. 2015). Als ein Vorteil der Untersuchungsmethode der Mammographie kann angesehen werden, dass diese auch zur Diagnoseerhärtung und Lokalisationsfeststellung bei einem auffälligen Tastbefund hilfreich ist. Für den Mann steht bis heute kein Präventionsprogramm dieses Karzinoms zur Verfügung. Trotz des medizinischen Fortschritts in der Prävention, Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms erhält eine Vielzahl von Patienten erst in einem fortgeschrittenen Stadium die Diagnose oder erleidet gar ein Rezidiv der Erkrankung. Die derzeit verfügbaren Bildgebungsverfahren ermöglichen es nicht Mikrometastasen zu erfassen. Zudem ist die Tumorbiopsie immer eine invasive Methode zur Feststellung eines Malignoms oder Rezidivs im Frühstadium, was auf die Notwendigkeit einer kostengünstigen, nicht-invasiven diagnostischen Verfahrensetablierung verdeutlicht. So gibt es aktuell große Bemühungen in der Forschung die Etablierung der *liquid biopsy* voranzutreiben und diese für die Behandlung von Tumorerkrankungen heranzuziehen (Rack et al. 2014).

4.8 Zusammenhang des Mammakarzinoms mit endogenen und exogenen Faktoren

Die epigenetischen Modifikationen in Form einer DNA-Methylierung kann man bei malignen Neubildungen während des Alterungsprozesses beobachten. Die genauen Mechanismen sind jedoch, nach wie vor, unzureichend erforscht. Zudem zeigten Wang et al. (2016), dass altersassoziierte DNA-Methylierungsänderungen in engem Zusammenhang mit dem Auftreten von Karzinomen stehen. Außerdem zeigte diese Forschungsgruppe, dass es sowohl ein Methylierungsniveau gibt, das mit zunehmendem Alter ansteigt und bei Krebspatienten höher ausfällt

als bei gesunden Kontrollpersonen als auch ein Methylierungsniveau existiert, das mit zunehmendem Altern sinkt und im Vergleich zu gesunden Probanden bei Krebspatienten geringer ausfällt. Zudem wurden 25 Gene als potenzielle Karzinomrisikomarker identifiziert, die durch die DNA-Methylierung und in der Entstehung von Malignomen vom Alter der Patienten beeinflusst werden (Wang et al. 2016).

Heyn et al. (2012) führten eine Bisulfit-Sequenzierung des kompletten Genoms bei Neugeborenen sowie bei Hundertjährigen durch und analysierten das DNA-Methylierungsprofil dieser zwei Gruppen. Sie konnten zeigen, dass Hundertjährige einen niedrigeren DNA-Methylierungsgrad aufweisen als Neugeborene sowie das Auftreten von benachbarten CpG-Dinukleotiden im gesamten Genom von Hundertjährigen im Vergleich zu Neugeborenen vermindert ist. Diese altersassoziierten epigenetischen Veränderungen werden auch als epigenetischer Drift bezeichnet.

Das Ereignis der genomweiten Abnahme der DNA-Methylierung sowie auch spezifische Hypermethylierungsvorkommnisse sind mit dem Altern assoziiert und können diverse unterschiedliche Erkrankungen auslösen (Fraga et al. 2005; Heyn et al. 2012).

Altersassoziierte *de novo* Methylierungen betreffen häufig Promotoreregionen von Tumorsuppressorgenen, was wiederum zum Gen-*Silencing* führt und damit an der Krebsentstehung beteiligt sein kann. Es kommt außerdem zu gewebespezifischen epigenetischen Veränderungen im Laufe des Lebens. So findet beim Mammakarzinom eine altersbedingte Methylierungszunahme vor allem in Mammaepithelzell-*Enhancer*-Regionen sowie an Bindungsstellen des *MYC*- und *CTCF*-Gens statt. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Brustdrüsengewebe schneller altert als andere Gewebearten (Horvath 2013). Daher stellt das Alter eine Einflussgröße dar, indem es das Brustkrebsrisiko teilweise durch seinen Beitrag zur epigenetischen Dysregulation im normalen Brustgewebe erhöht (Johnson et al. 2017).

4.8.1 Alter und Geschlechtsverteilung in Kontroll- und Patientenkohorte

Das Kollektiv der gesunden Probanden bestand aus 23 weiblichen Blutspenderinnen und 17 männlichen Blutspendern, was einem Stichprobenumfang von $n = 40$ ausmacht. Der Anteil der Frauen in diesem Kollektiv beläuft sich auf 57,5 % sowie das der Männer auf 42,5 % (vgl. Tabelle 2). Diese Zusammenstellung der Kohorte ist nicht optimal als Referenzgruppe geeignet, da Frauen viel häufiger an Brustkrebs erkranken als Männer. Das adäquate Verhältnis der Kontrollkohorte bestünde dann aus einem Mann auf 100 Frauen, um eine repräsentative Kontrollgruppe abbilden zu können. Die Voraussetzung, dass niemand aus der Kontrollgruppe an Mammakarzinom leidet war anamnestisch gegeben. Außerdem überzeugte sich vor der Blutspende ein Arzt aus der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universität Göttingen davon,

dass die Blutspender in einem guten Gesundheitszustand waren. Hierfür wurden vor der Blutspende das Anamnesegespräch zu Vorerkrankungen, regelmäßigen Medikamenteneinnahmen und Reisen ins Ausland in der jüngsten Vergangenheit erörtert sowie das Blutbild und die Vitalparameter überprüft. Ein weiterer Punkt, der zur besseren Vergleichbarkeit von Kontroll- zu Patientenkohorte führen kann, ist die Anpassung des mittleren Alters dieser beider Gruppe. In dieser Dissertation betrug das Alter der untersuchten Kontrollkohorte 38,8 Jahre (Min.-Max.: 18-66) gesamt, wobei das der Frauen 39,5 Jahre (Min.-Max.: 22 bis 66) betrug. Die Männer wiesen mit 38,1 Jahren (Min.-Max.: 18 bis 65) ein 1,4 Jahre jüngeres Durchschnittsalter auf (vgl. Tabelle 6). Die Kohorte der insgesamt 28 Mammakarzinompatienten ($n = 28$) waren aus 27 weiblichen (96,4 %) und einem männlichen (3,6 %) Probanden zusammengesetzt (vgl. Tabelle 5). Das mittlere Erkrankungsalter des Kollektivs lag bei 59,6 Jahren (Min.-Max.: 39-82), wobei das der Frauen bei 59,7 Jahren lag und das des Mannes 57 Jahre war. Damit entsprach die Altersgruppe des Patientenkollektivs in etwa der Altersgruppe von Frauen, die im Alter von 50 bis 69 Jahren, die das größte Risiko haben an einem Mammakarzinom zu erkranken und vom Präventionsprogramm eingeladen werden. Vergleicht man das Alter des erkrankten Mannes von 57 Jahre mit dem Durchschnittserkrankungsalter in Deutschland des Mannes von 71 Jahren, ist ein 14 Jahre früheres Auftreten der Krankheit zu verzeichnen. Die in Kapitel 4.2 dargestellten Studien weisen ebenfalls Unterschiede von circa 20 Jahren in der Betrachtung des Durchschnittsalters zwischen dem Kollektiv der Gesunden im Vergleich zu den erkrankten Untersuchungsteilnehmern auf. Die statistische Auswertung (vgl. Kapitel 3.1) ergab, dass keine signifikanten Methylierungsunterschiede bezüglich des Alters in dieser Studie vorliegen.

4.8.2 Zusammenhang zwischen inhalativem Tabakkonsum und Mammakarzinom

Der inhalative Tabakgebrauch ist ein Risikofaktor für mehrere Karzinomarten, so auch für das Mammakarzinom. Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen keinen signifikanten Einfluss ($p > 0,05$) von Zigarettenkonsum auf die untersuchten Testgene und deren Methylierungsstatus. Die Inhaltsstoffe des inhalativen Tabakkonsums gelangen zum Zellkern und verändern dort die DNA, indem diese hypermethyliert wird. So konnte das CHARGE-Konsortium zeigen, dass es in 1405 Genen von insgesamt 15907 Personen DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Rauchern und Nichtrauchern gibt. Diese DNA-Methylierungsunterschiede sind in Genen zu finden, die die Lungenfunktion, Karzinogenese, Inflammation und kardiale Erkrankungen betreffen (Joehanes et al. 2016).

Nikotinkonsum-abhängige signifikante Ct-Unterschiede in der Analyse der vier verschiedenen Gene zeigten sich im hier angewendeten Versuchsprotokoll nicht ($p > 0,05$), sodass der Nikotinkonsum keinen Einfluss auf die Hyper- oder Hypomethylierungen der analysierten

Promotorregionen hat. Die zahlreichen Inhaltstoffe einer Zigarette führen zu intrazellulären Reaktionen, wie einer Veränderung von Genexpressionen, indem diese zu Hypo- und oder Hypermethylierungen der CpG-Regionen des Genoms führen. Eine veränderte DNA-Methylierung trägt zur Entstehung oder zum Fortschreiten von Brustkrebs bei und es konnte ein Zusammenhang zwischen Tabakexposition und einer Genexpressionsveränderung hergestellt werden. Denn hormonrezeptornegative Mammakarzinome von Patienten, die rauchen, im Vergleich zu Mammakarzinompatienten, die Nichtraucher sind, zeigten vermehrt eine DNA-Hypomethylierung. Bei Mammakarzinompatienten, die in der Vergangenheit Tabak konsumiert haben, konnte ermittelt werden, dass es seit dem Beenden der Tabakexposition zur Wiederherstellung des Methylierungsstatus kam, wie er bei Nichtrauchern üblich ist. Darüber hinaus fand man bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinompatienten eine tabakkonsumbedingte Hypermethylierung, die bei dunkelhäutigen Patienten stärker ausgeprägt war als bei hellhäutigen Mammakarzinompatienten (Conway et al. 2017).

4.8.3 Ethnie und das Mammakarzinom

Es wurde beschrieben, dass ethnische Unterschiede in Bezug zum Mammakarzinom bestehen. Es gibt eine Vielzahl klinischer und nicht-klinischer Risikofaktoren, die zu Unterschieden im Überleben von farbigen Brustkrebspatienten führen. Mangelnde medizinische Versorgung, verminderter Zugang zu Präventionsmaßnahmen, ein fortgeschritteneres Stadium des Mammakarzinoms bei Diagnosestellung sowie Verwehrung des Zugangs zu optimalen Therapiemöglichkeiten sind bei ethnischen Minderheiten, afroamerikanischen und hispanoamerikanischen Frauen in den USA zu verzeichnen. Des Weiteren haben viele afroamerikanische Frauen häufiger nicht-klassifizierbare Brustkrebsarten als weiße Frauen. In den Vereinigten Staaten weisen afroamerikanische und hispanische Frauen eine geringere Inzidenz von Brustkrebs, jedoch eine höhere Sterblichkeitsrate als weiße Frauen auf. Diese Risikofaktoren können die Unterschiede in der Brustkrebsbehandlung und der Überlebensrate zwischen afroamerikanischen Frauen und weißen Frauen erklären (Yedjou et al. 2017).

Für die Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss der Ethnie auf eine Hypermethylierung beobachtet werden. Die Ethnie ist demzufolge ($p > 0,05$) ebenfalls kein relevanter Faktor für den Ct-Wert bei Gesunden und Mammakarzinompatienten. Epigenomstudien haben jedoch Variationen in den Methylierungsmustern des Genoms von unterschiedlichen Menschengruppen ergeben, einschließlich Kaukasier, Nichtkaukasier (dunkelhäutig, farbig), Hispanics, Arabern und zahlreichen Populationsgruppen des afrikanischen Kontinents. Ethnisch bedingte Methylierungsunterschiede prägen die frühe Embryonalentwicklung, aber auch genetische Variationen wie Einzelnukleotid-

Polymorphismen und Umweltfaktoren wie das Alter, der sozioökonomischer Status und der inhalative Tabakkonsum wirken sich auf die DNA-Methylierung aus, die sich ebenfalls auf die Expression von Phänotypen auswirken. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, epigenetische Unterschiede in differenten Populationen zu verstehen und ihre Korrelation mit Malignomen. Speziell beim Mammakarzinom ist dies ein wichtiger Schritt zur Ermöglichung einer personalisierten Tumorbehandlung. Die Variation von Methylierungsmustern zwischen menschlichen Populationen bietet daher eine weitere aufregende Perspektive zur Erforschung und gründliche Evaluierung des Epigenoms um den Effekt der DNA-Methylierung auf den Phänotypen zu verstehen (Kader und Ghai 2017).

4.8.4 Zusammenhang zwischen Alkoholkonsum und Mammakarzinom

Laut WHO steht der Alkoholkonsum in ursächlichem Zusammenhang mit mehr als 60 verschiedenen Erkrankungen (Rehm et al. 2004). Die Karzinogenese ist eine der verheerendsten Folgen des Alkoholkonsums und betrifft weltweit etwa 3,6 % aller Krebsfälle (5,2 % bei Männern und 1,7 % bei Frauen). Es stehen außerdem 3,5 % aller malignombedingten Todesfälle im Zusammenhang mit chronischem Alkoholkonsum (Boffetta et al. 2006). So konnten Baan et al. (2007) zeigen, dass Alkohol in zahlreichen Organen, wie auch in der weiblichen Brust zur Krebsentstehung führen kann. In der vorliegenden Untersuchung wurde kein signifikanter Einfluss des Alkoholkonsums auf die untersuchten Testgene festgestellt, da der p-Wert für alle vier Subgruppen $p > 0,05$ ist. So stellt die Variable Alkoholkonsum vermutlich einen irrelevanten Faktor für die Höhe des Ct-Wertes bei Mammakarzinompatienten dar.

Die epigenetischen Veränderungen werden durch Abbauprodukte des Alkohols oder durch die Beeinflussung von Stoffwechselwegen durch chronischen Alkoholkonsum ausgelöst. Durch einen regelmäßigen Alkoholkonsum kann es zur Verringerung des Folat-, S-Adenosylmethionin-(SAM) und Glutathion-Spiegels sowie zum Anstieg von Homocystein und S-Adenosylhomocystein (SAH) kommen. Somit können die antioxidativen Stoffwechselvorgänge innerhalb einer Zelle zum Erliegen kommen. Weitere Folge dieser Beeinträchtigungen sind eine unphysiologische Hypermethylierung von Promotorregionen, Hemmung von DNA-Methyltransferasen und eine Hypomethylierung des restlichen Genoms. Diese Veränderungen können das Risiko einer alkoholassoziierten Karzinogenese erhöhen (Dumitrescu 2018; Varela-Rey et al. 2013).

4.9 Fazit und Ausblick

An einem Mammakarzinom, welches die häufigste Tumorentität und tumorbedingte Todesursache der Frau weltweit darstellt, erkrankt aktuell jede achte Frau in ihrem Leben. Auch in

Deutschland war im Jahr 2013 das Mammakarzinom die häufigste, malignombedingte Todesursache der Frau mit 17853 Todesfällen (Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. 2017). Ca. 10 % der Patientinnen leiden dabei an einem hereditären Mammakarzinom. Die Tumorsuppressorgene *BRCA1* und *-2* und deren Keimbahnmutation machen einen erheblichen Teil des genetisch bedingten Mammakarzinoms aus. Während die Prozesse der epigenetischen Regulation noch ungenügend verstanden sind, wurden in den letzten Jahren und Jahrzehnten Erkenntnisse über diverse Krankheitsbilder gewonnen, in denen epigenetische Mechanismen von entscheidender Bedeutung sind. Vor allem bei Karzinomerkrankungen findet man beispielsweise veränderte Methylierungsmuster. Bei der Karzinogenese können daher häufig Hyper- und Hypomethylierungen von DNA neben DNA- und Chromosomenmutationen auftreten. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse kommen deshalb heute der Epigenetik eine wichtige Bedeutung bei der Erforschung der ursächlichen Pathologie von Karzinomerkrankungen zu (Johnstone und Baylin 2010). Die karzinomassoziierte Hypermethylierung ist ein dynamischer Prozess, der sich mit der Zeit, dem Krankheitszustand oder der Behandlung ändern kann (Donninger et al. 2007). Neue wissenschaftliche Ansätze der vergangenen Jahre verfolgten das Ziel, freie zirkulierende Nukleinsäuren im Blut mit Hilfe von PCR-Verfahrenstechnik nachzuweisen um einen geeigneten genetischen und epigenetischen Tumormarker zu etablieren (Schwarzenbach et al. 2011a).

Trotz aller Fortschritte in der Prävention, Früherkennung, Diagnosestellung und optimierten Therapieoptionen des Mammakarzinoms leiden viele Patienten unter einer späten Diagnose oder einem erneuten Auftreten ihrer Krankheit. Bis heute liegt daher der Fokus der Wissenschaft in Anbetracht der immer noch hohen Inzidenz- und Mortalitätsraten des Mammakarzinoms darauf neue, epigenetische Biomarker zu etablieren, da die derzeit verfügbaren Bildgebungsmodalitäten keine Mikrometastasierung erkennen lassen und die Tumorbiopsie eine invasive Methode zur Erkennung von Karzinomerkrankungen ist. Die Notwendigkeit einer kostengünstigen, nicht invasiven diagnostischen Methode zur Früherkennung und gezielten Therapieüberwachung des Mammakarzinoms mittels der Analyse von zellfreier Tumor-DNA rückte somit in den letzten 10 bis 15 Jahren in den Vordergrund. Aktuelle Erkenntnisse legen nahe, dass ein Anstieg der ctDNA-Spiegel, also die Quantität der ctDNA, einen signifikanten diagnostischen Wert für die Früherkennung des Mammakarzinoms haben kann, obwohl die Sensitivitäten der unterschiedlichen Methoden immer noch nicht optimal sind, sodass die diagnostische und prognostische Nützlichkeit weiterhin verbessert werden müssen. Zusätzlich ermöglicht die Analyse der ctDNA die Charakterisierung eines Karzinoms auf nicht-invasive Weise und die Überwachung der Therapie durch Mutations- oder Methylierungsuntersuchung bezüglich spezifischer Promotorregionen, wenn auch eine Diskordanz der ctDNA-Ergebnisse aus

Blutproben im Vergleich zu direkten Tumorbiopsien besteht. Die Mammakarzinombiopsie unterliegt Einschränkungen, da sie lediglich eine Momentaufnahme des Tumorgewebes zu dem jeweiligen Entnahmezeitpunkt erfasst, die einer Selektionsverzerrung unterliegt und die Tumorveränderungen möglicherweise nicht darstellt. Außerdem kann die Analyse der ctDNA nicht nur als Früherkennungsmarker hilfreich sein, sondern auch eine Charakterisierung genetischer Merkmale des Tumors ermöglichen, was zu einer personalisierten Tumorthherapie beim Mammakarzinom beitragen könnte. Die Analyse von ctDNA aus peripherem Blut kann möglicherweise zukünftig zu einer früheren Diagnose und besseren Therapie von Brustkrebs führen, diese Hypothese muss jedoch durch empirische Beweise bestätigt werden.

Der Nachweis zellfreier tumorspezifischer DNA im peripheren Blut von Patienten mit metastasierendem Brustkrebs bietet die Möglichkeit, Veränderungen in der Tumormast festzustellen und das Ansprechen auf die Behandlung zu überwachen (Rohanizadegan 2018).

In Anbetracht des aktuellen medizinischen Forschungsinteresses wurden in der vorliegenden Arbeit die Promotorregionen *APC*, *DKK3*, *ESR1*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* mittels einer neu etablierten, quantitativen, methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR auf mögliche Hypermethylierungen untersucht. Die angewandte Methodik wies Unterschiede zu anderen Studien auf, in dem auf eine vorherige Bisulfit-Behandlung der zu analysierenden DNA-Proben verzichtet wurde. Außerdem erfolgte der Versuchsaufbau als eine Multiplex-PCR mit Einsatz einer methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease *BstUI* zur Etablierung einer alternativen und effizienten Methodik. Durch die technisch automatisierte Isolation der ctDNA sowie die Versuchsdurchführung in einem geschlossenen Reaktionssystem konnte die Kontaminationswahrscheinlichkeit gesenkt werden. Die Schnelligkeit des Analyseverfahrens bedingt durch die Messungen der Ct-Werte in Echtzeit mit gleichzeitiger bildlicher Darstellung durch entsprechende Software wurde so ermöglicht.

Es konnte ein signifikanter Unterschied der Messergebnisse der methylierten (positiven) gegenüber der nicht methylierten (negativen) Kontroll-DNA für die Gene *DKK3*, *ESR1*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* ermittelt werden. Für die Promotorregion *APC* war dies nicht möglich, sodass keine weitere Testung an DNA-Proben stattgefunden hat. Die Methodenabklärung hat zunächst an gesunden Probanden ($n = 40$), freiwilligen 20 Blutspendern, stattgefunden, indem eine DNA-Isolation aus EDTA-Plasmaproben von 23 Frauen und 17 Männern erfolgte. Danach fand die Untersuchung an isolierten DNA-Proben von Mammakarzinomzelllinien ($n = 3$) statt. Die Testung der Mammakarzinomzelllinien *MDA-MB-231*, *T47D* und *MCF7* zeigte, dass das etablierte Protokoll dieser Dissertation angewendet werden kann und die Promotorregionen *RASSF1A*, *SOX17* und *MAL* vielversprechende Gewebemarker beim Mammakarzinom darstellen (vgl. Tabelle 9).

Nach Auswertung der erhobenen Daten, erfolgte die methylierungsspezifische *Real-Time*-PCR von 28 Mammakarzinomplasmaproben aus unterschiedlichen Tumorstadien für die Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17*. Die ermittelte diagnostische Testspezifität für die quantitative, methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR der hier vorliegenden experimentellen Studie der Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* beträgt jeweils 95 %, wobei 38 von 40 gesunden Blutspenderplasmaproben keine Hypermethylierung der untersuchten Testgene zeigten. In Anbetracht der niedrigen diagnostischen Sensitivitäten (*MAL* 0 %, *RAR β 2* 3,6 %, *RASSF1A* 10,7 % und *SOX17* 3,6 %) konnte in der hier vorliegenden Arbeit kein Beitrag zur Entwicklung eines PCR- Methylierungsnachweis für die untersuchten Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* aus EDTA-Plasma geleistet werden. Somit sind die vier untersuchten Promotorregionen mittels des etablierten Versuchsaufbaus und der durchgeführten Testung der Mammakarzinomplasmaproben aus den Tumorstadien T1-T4 nicht als Screeningmethode verwendbar. Damit konnte in dieser durchgeführten Studie kein Biomarker für das Mammakarzinom zur Früherkennung, Prognoseeinschätzung, Therapiestratifizierung, Feststellung des Remissionsstatus oder bezüglich einer Redizivierung etabliert werden. Auch die statistische Analyse des Einflusses von Alkohol- und Nikotinkonsum, das Alter und die Ethnie zeigte keine signifikante Korrelation mit einer Promotorhypermethylierung der getesteten Gene.

Die Entwicklung nicht-invasiver Methoden zur Detektion und Therapieüberwachung von Karzinomen ist nach wie vor eine große Herausforderung in der Onkologie. Zusammengefasst legen veröffentlichte Forschungsstudien nahe, dass ctDNA ein breit einsetzbarer, sensibler und spezifischer Biomarker für eine Vielzahl von unterschiedlichen Karzinomerkkrankungen werden könnte (Bettegowda et al. 2014). Es gibt jedoch nur wenige Studien, die das kombinierte Vorhandensein genetischer und epigenetischer Veränderungen beim Mammakarzinom mithilfe der *liquid biopsy* untersucht haben.

Es sind neue Strategien und Ansätze erforderlich, um die Prävention von Brustkrebs zu fördern, die Überlebensrate zu verbessern und die Mortalität von Brustkrebs zu senken (Guerrero-Preston et al. 2014). Ein Ansatz könnte in Bezug zu dem epigenetischen Mechanismus und der damit einhergehenden Inaktivierung von zahlreichen Tumorsuppressorgenen bei der Entwicklung von Karzinomen sein, eine Demethylierung einer betroffenen Promotorregion eines meist intakten Gens zu initiieren (Donninger et al. 2007). Außerdem kann die Überlegung angestellt werden, dass sowohl die quantitative Bestimmung als auch das Vorliegen von genetischen Mutationen oder Hypermethylierungen spezifischer Promotorregionen zirkulierender TumordNA die Wirksamkeit der Behandlung des Mammakarzinoms in Echtzeit darstellen könnte. Diese Informationen könnten eine wichtige Rolle in der spezifischen und zielgerichteten

Therapie einnehmen. In der Zukunft wären solche Daten und Erkenntnisse für die individualisierte systemische Therapie von großer Bedeutung. Die Risikostratifizierung, Rezidiverkennung und die sich daraus ergebene Prognoseeinschätzung von Mammakarzinompatienten stellt eine der zentralen Fragen der aktuellen Forschung dar. Es sollte daher versucht werden die identifizierten Methylierungen der ctDNA hinsichtlich ihrer klinischen Bedeutung, wie dem Tumorstadium, Grading, Erkrankungsalter, Mutationsprofil und bezüglich des Rezeptorstatus zu verifizieren und auszuwerten.

Basierend und orientierend an der derzeitigen Leitlinie erfahren Mammakarzinompatienten keine individuellen Therapiekonzepte, sodass die Gefahr, der Unter- oder einer Übertherapie von einzelnen Erkrankten besteht, da beispielsweise aufgrund des Brustkrebsscreenings mittels der Mammographie frühere Stadien des Mammakarzinoms gefunden werden. So besteht die Möglichkeit, dass diesem Patientenkollektiv ein systemisches adjuvantes Therapiekonzept zukommt inklusiver aller Nebenwirkungen, obwohl dies im Einzelfall nicht erforderlich gewesen wäre (Drukker et al. 2014; Rea und Francis 2014).

Für die routinemäßige Anwendung der *liquid biopsy* als Biomarker in der klinischen Praxis ist es jedoch notwendig, standardisierte präanalytische und analytische Methoden zu entwickeln, einschließlich der Blutentnahme, Verarbeitung und Aufbewahrung als auch die DNA-Extraktion, -Quantifizierung und -Validierung in großen prospektiven klinischen Studien zu evaluieren. Fortschritte bei der klinischen Umsetzung können nur erzielt werden, wenn Langzeitstudien mit angemessenen Stichprobenumfang durchgeführt werden und die Ergebnisse aus solchen Studien mit dem krankheitsfreien Überleben/Gesamtüberleben und anderen klinischen Gegebenheiten korrelierend erfasst werden. Da die Dynamik der Freisetzung von ctDNA noch nicht vollständig erforscht wurde und von diversen Einflüssen abhängig ist, sind unterschiedliche Zeitpunkt der ctDNA-Analyse in Bezug auf die Therapie wichtig. So sollten mehrere Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten von denselben Patienten analysiert werden (Heitzer et al. 2015).

Größere Tumore, im Sinne von einer hohen Tumorlast, produzieren mehr ctDNA, obwohl der die Karzinomart ebenfalls Auswirkungen hat auf den ctDNA-Konzentration hat (Bettegowda et al. 2014). Daher kann die Detektion der ctDNA-Last nicht nur als Präventionsmarker hilfreich sein, sondern auch die Analyse der genetischen Merkmale des Tumors ermöglichen, was zu einer personalisierten Tumorthherapie beim Mammakarzinom beitragen kann (Rohanizadegan 2018).

Seit April 2016 ist durch Epi proColon 2.0, Epigenomics AG, Berlin, Deutschland ein kommerzieller Test der Analyse der Plasmamethylierung von *SEPTIN9* verfügbar. Damit stellt das

SEPTIN9-Gen und seine Methylierung aktuell den ersten Krebscreening-Bluttest dar und zwar für das Kolorektalkarzinom (Cree et al. 2017).

Keiner der zitierten und erläuterten Studien bezüglich zirkulierender Biomarker beim Mammakarzinom haben dazu geführt, dass die vielversprechendsten und unterschiedlichsten *liquid biopsy*-Bestandteile im klinischen Alltag Anwendung finden können oder Einzug in die Leitlinien erhalten haben (IQWiG 2020; Nagy 2019).

5 Zusammenfassung

In dieser vorliegenden *Proof-of-Concept*-Studie mit dem Thema „Epigenetische Veränderung von zirkulierender Tumor-DNA im Ethylendiamintetraessigsäure-(EDTA)Plasma von Mammakarzinompatienten“ wurden die Fragestellungen erörtert und untersucht, ob hypermethylierte Gensequenzen in den aus der Literaturrecherche interessanten Promotor-Regionen *APC*, *ESR1*, *DKK3*, *HOXB4*, *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* im Plasma von Patienten mit Mammakarzinom unterschiedlicher Tumorstadien und ausgewählten Mammakarzinomzelllinien nachweisbar sind. Eine weitere Überlegung war es, ob Alkohol- bzw. Nikotinkonsum, die ethnische Herkunft und/oder das Alter Auswirkungen auf den Methylierungsstatus der genannten Promotor-Regionen haben. Hierzu wurden Plasmaproben von insgesamt 40 Blutspendern und 28 Mammakarzinompatienten sowie drei Zelllinien in einer neu etablierten, quantitativen, methylierungsspezifischen Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR auf mögliche DNA-Hypermethylierungen untersucht. Die Testung erfolgte als eine Multiplex-PCR mit Einsatz einer methylierungsabhängigen Restriktionsendonuklease *BstUI* zur Etablierung einer alternativen und effizienten Methodik. Der Versuchsaufbau und das für *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* etablierte Protokoll zeigten bezüglich der Validierung für die Mammakarzinomzelllinien *MDA-MB-231*, *T47D* und *MCF7* zufriedenstellende Ergebnisse. Bei der Untersuchung von *APC*, *ESR1*, *DKK3* und *HOXB4* zeigte sich dahingegen ein niedriger Signal-Rausch-Abstand zwischen methylierter und unmethylierter Kontroll-DNA. Die Zelllinie *MDA-MB-231* wies ein Genexpressionsmuster mit einer Hypermethylierung der Gene *MAL*, *RASSF1A* sowie *SOX17* auf. Bei der Mammakarzinomzelllinie *T47D* konnte eine Hypermethylierung des Gens *RASSF1A* nachgewiesen werden und bei der *MCF7*-Analyse bestand eine Hypermethylierung aller getesteten Gene. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass aufgrund der Heterogenität der Mammakarzinomarten eine Untersuchung mittels eines Genpanels erforderlich ist. Somit kann die Methodik in der histologischen Analyse Anwendung finden.

Die diagnostische Testspezifität wurde für die quantitative, methylierungsspezifische Ein-Schritt-*Real-Time*-PCR der hier vorliegenden experimentellen Studie der Promotorregionen *MAL*, *RAR β 2*, *RASSF1A* und *SOX17* mit 95 % festgelegt, so dass durch Setzen eines geeigneten *Cut-Offs* 38 von 40 gesunden Blutspendern keine Hypermethylierung der untersuchten Testgene zeigten. Die diagnostische Sensitivität basierte auf einer in Doppelbestimmung durchgeführten Multiplex-PCR-Testung der Mammakarzinomplasmaproben ($n = 28$) und den daraus resultieren Ct-Mittelwerten. Die Bewertung erfolge anhand der promotorspezifischen *Cut-Off*-Ct-Werte in positiv (methyliert) und negativ (nicht methyliert). Die ermittelte Sensitivität

für die Testgene lag für *MAL* bei 0 %, *RAR β 2* bei 3,6 %, *RASSF1A* bei 10,7 % und *SOX17* bei 3,6 %.

In Anbetracht der niedrigen diagnostischen Sensitivitäten konnte in der hier vorliegenden Arbeit kein Beitrag zur Entwicklung eines neuen PCR-Methylierungsnachweises für die ctDNA aus EDTA-Plasma geleistet werden. Somit sind die vier untersuchten Promotorregionen meines Erachtens mittels des etablierten Versuchsaufbaus und der durchgeführten Testung der Mammakarzinomplasmaproben aus den Tumorstadien T1-T4 nicht als Screeningmethode verwendbar. Damit konnte in dieser durchgeführten Studie kein Biomarker für das Mammakarzinom zur Früherkennung, Prognoseeinschätzung, Therapiestratifizierung, Feststellung des Remissionsstatus oder bezüglich einer Rezidiverkennung etabliert werden. Auch die statistische Analyse des Einflusses von Alkohol- und Nikotinkonsum, des Alters und die Ethnie zeigte keine signifikante Korrelation mit einer Promotorhypermethylierung der getesteten Gene.

6 Literaturverzeichnis

Agostini M, Enzo MV, Bedin C, Belardinelli V, Goldin E, del Bianco P, Maschietto E, d'Angelo E, Izzi L, Saccani A et al. (2012): Circulating cell-free DNA: a promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients. *Cancer Biomark* **11**, 89-98

Aktas B, Kasimir-Bauer S, Heubner M, Kimmig R, Wimberger P (2011): Molecular profiling and prognostic relevance of circulating tumor cells in the blood of ovarian cancer patients at primary diagnosis and after platinum-based chemotherapy. *Int J Gynecol Cancer* **21**, 822-830

Alix-Panabieres C, Schwarzenbach H, Pantel K (2012): Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med* **63**, 199-215

Alsamarai S, Abu-Khalaf MM, Harris LN (2012): DTCs/CTCs in breast cancer: five decades later. *Recent Results Cancer Res* **195**, 217-225

Alonso MA, Weissman SM (1987): cDNA cloning and sequence of MAL, a hydrophobic protein associated with human T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 1997-2001

Antequera F, Boyes J, Bird A (1990): High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* **62**, 503-514

Antoniou AC, Spurdle AB, Sinilnikova OM et al. (2008): Common breast cancer-predisposition alleles are associated with breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* **82**, 937-948

Aoki K, Taketo MM (2007): Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* **120**, 3327-3335

Aulmann S (2011): Duktale und lobuläre Präneoplasien: Biologische Bedeutung in der Entstehung invasiver Mammakarzinome. *Pathologe* **32**, 316-320

Aung KL, Donald E, Ellison G, Bujac S, Fletcher L, Cantarini M, Brady G, Orr M, Clack G, Ranson M et al. (2014): Analytical validation of BRAF mutation testing from circulating free DNA using the amplification refractory mutation testing system. *J Mol Diagn* **16**, 343-349

Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Altieri A, Coglianò V (2007): Carcinogenicity of alcoholic beverages. *Lancet Oncol* **8**, 292-293

Balic M, Dandachi N, Hofmann G, Samonigg H, Loibner H, Obwaller A, van der Kooi A, Tibbe AG, Doyle GV, Terstappen LW et al. (2005): Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin Cytom* **68**, 25-30

Barnes B, Kraywinkel K, Nowossadeck E, Schönfeld I, Starker A, Wienecke A, Wolf U: Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut, Berlin 2016

Bartkova J, Hořejší Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldberg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C et al. (2005): DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**, 864

Benezeder T, Tiran V, Treitler AAN, Suppan C, Rossmann C, Stoeger H, Cote RJ, Datar RH, Balic M, Dandachi N (2017): Multigene methylation analysis of enriched circulating tumor cells associates with poor progression-free survival in metastatic breast cancer patients. *Oncotarget* **8**, 92483-92496

Bestor TH (2000): The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* **9**, 2395-2402

- Berner A, Lund-Iversen M, Nesland JM (2011): Fine needle aspirations in oncology. *Arkh Patol* 73, 21-26
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM et al. (2014): Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies, *Sci Transl Med* 6, 224
- Beutler E, Gelbart T, Kuhl W (1990): Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 9, 166
- Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A (2007): Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 14, 1008-1016
- Bidard FC, Vincent-Salomon A, Sigal-Zafrani B, Dieras V, Mathiot C, Mignot L, Thiery JP, Sastre-Garau X, Pierga JY (2008): Prognosis of women with stage IV breast cancer depends on detection of circulating tumor cells rather than disseminated tumor cells. *Ann Oncol* 19, 496-500
- Bird A (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21
- Bird AP (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213
- Bloom HJ, Richardson WW (1957): Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 11, 359-377
- Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE (2000): Immunocytochemical detection of the homeobox B3, B4, and C6 gene products in breast carcinomas. *Anticancer Res* 20, 3281-3286
- Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H, Höfler G, Kreipe H (Hrsg.): *Pathologie*. 5. Auflage; Urban & Fischer Elsevier, München, 2012, 811-826
- Boffetta P, Hashibe M, La Vecchia C, Zatonski W, Rehm, J (2006): The burden of cancer attributable to alcohol drinking. *Int J Cancer* 119, 884-887
- Buffart TE, Overmeer RM, Steenbergen RD, Tijssen M, van Grieken NC, Snijders PJ, Grabsch HI, van de Velde CJ, Carvalho B, Meijer GA (2008): MAL promoter hypermethylation as a novel prognostic marker in gastric cancer. *Br J Cancer* 99, 1802-1807
- Burnside ES, Sickles EA, Bassett LW et al. (2009): The ACR BI-RADS experience: learning from history. *J Am Coll Radiol* 6, 851-860
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55, 611-622
- Bustin SA, Wittwer CT (2017): MIQE: A step toward more robust and reproducible quantitative PCR. *Clin Chem* 63, 1537-1538
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A et al. (2006): Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. *Clin Chem* 52, 2211-2218
- Cheung HH, Lee TL, Rennert OM, Chan WY (2009): DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87, 335-350

- Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES (2013): SOX17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. *Clin Chem* 59, 270-279
- Chimonidou M, Strati A, Tzitzira A, Sotiropoulou G, Malamos N, Georgoulas V, Lianidou ES (2011): DNA methylation of tumor suppressor and metastasis suppressor genes in circulating tumor cells. *Clin Chem* 57, 1169-1177
- Cho YH, Shen J, Gammon MD, Zhang YJ, Wang Q, Gonzalez K, Xu X, Bradshaw PT, Teitelbaum SL, Garbowski G et al. (2012): Prognostic significance of gene-specific promoter hypermethylation in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 131, 197-205
- Christgen M, Langer F, Kreipe H (2016): Histologisches Grading beim Mammakarzinom. *Pathologe* 37, 328-336
- Chudy M, Hewlett I, Saldanha J et al. (2003): Technical considerations for the performance of nucleic acid amplification technology (NAT), The NAT Task Force Group. *Biologicals* 31, 153-159
- Cohen SJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, Sabbath KD, Gabrail NY, Picus J, Morse M, Mitchell E, Miller MC et al. (2008): Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, 3213-3221
- Conway K, Edmiston SN, Parrish E, Bryant C, Tse CK, Swift-Scanlan T, McCullough LE, Kuan PF (2017): Breast tumor DNA methylation patterns associated with smoking in the Carolina Breast Cancer Study. *Breast Cancer Res Treat* 163, 349-361
- Costa A, Zanini V (2008): Precancerous lesions of the breast. *Nat Clin Pract Oncol* 5, 700-704
- Cree IA, Uttley L, Buckley Woods H, Kikuchi H, Reiman A, Harnan S, Whiteman BL, Philips ST, Messenger M, Cox A et al. (2017): The evidence base for circulating tumour DNA blood-based biomarkers for the early detection of cancer: a systematic mapping review. *BMC Cancer* 17, 697
- Cristofanilli M, Mendelsohn J (2006): Circulating tumor cells in breast cancer: Advanced tools for "tailored" therapy? *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 17073-17074
- Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (2006): International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev* 58, 773-781
- Dammann R, Yang G, Pfeifer GP (2001): Hypermethylation of the CpG island of Ras association domain family 1A (RASSF1A), a putative tumor suppressor gene from the 3p21.3 locus, occurs in a large percentage of human breast cancers. *Cancer Res* 61, 3105-3109
- Dang CV (2013): MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, 1-15
- Daura-Oller E, Cabre M, Montero MA, Paternain JL, Romeu A (2009): Specific gene hypomethylation and cancer: new insights into coding region feature trends. *Bioinformatics* 3, 340-343
- Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forshew T, Mahler-Araujo B et al. (2013): Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368, 1199-1209
- Deans C, Maggert KA (2015): What do you mean, "Epigenetic"? *Genetics* 199, 887-896

- de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D (2008): Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6302-6309
- de Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martinez-Ricarte F, Torrejon D, Oliveira M, Arias A, Raventos C, Tang J et al. (2015): Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun* 6, 8839
- Dikovskaya D, Schiffmann D, Newton IP, Oakley A, Kroboth K, Sansom O, Jamieson TJ, Meniel V, Clarke A, Nathke IS (2007): Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol* 176, 183-195
- Ding M, Bullotta A, Caruso L, Gupta P, Rinaldo CR, Chen Y (2011): An optimized sensitive method for quantitation of DNA/RNA viruses in heparinized and cryopreserved plasma. *J Virol Methods* 176, 1-8
- Doebar SC, Slaets L, Cardoso F et al. (2017): Male breast cancer precursor lesions: analysis of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program. *Mod Pathol*. 30, 509-518
- Donninger H, Vos MD, Clark GJ (2007): The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci* 120, 3163-3172
- Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R et al. (2011): Assessment of Ki-67 in breast cancer: recommendations from the International Ki-67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst* 103, 1656-1664
- Drenckhahn D, Waschke J(Hrsg): Taschenbuch Anatomie. 16. Auflage; Urban & Fischer Elsevier, München, 2008
- Drukker CA, Schmidt MK, Rutgers EJ, Cardoso F, Kerlikowske K, Esserman LJ, van Leeuwen FE, Pijnappel RM, Slaets L, Bogaerts J et al. (2014): Mammographic screening detects low-risk tumor biology breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 144, 103-111
- Duffy MJ, Evoy D, McDermott EW (2010): CA 15-3: uses and limitation as a biomarker for breast cancer. *Clin Chim Acta* 411, 1869-1874
- Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, Cardoso F (2017): Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). *Eur J Cancer* 75, 284-298
- Dumitrescu RG (2018): Alcohol-induced epigenetic changes in cancer. *Methods Mol Biol* 1856, 157-172
- Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama JV (2013): The clinical utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int J Mol Sci* 14, 18925-18958
- Esen G, Tutar B, Uras C, Calay Z, İnce Ü, Tutar O (2016): Vacuum-assisted stereotactic breast biopsy in the diagnosis and management of suspicious microcalcifications. *Diagn Interv Radiol* 22, 326-333
- Fackler MJ, Lopez Bujanda Z, Umbricht C, Teo WW, Cho S, Zhang Z, Visvanathan K, Jeter S, Argani P, Wang C et al. (2014): Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Cancer Res* 74, 2160-2170
- Fang C, Jian ZY, Shen XF, Wei XM, Yu GZ, Zeng XT (2015): Promoter methylation of the Retinoic Acid Receptor *Beta2* (*RARbeta2*) Is Associated with increased risk of breast cancer: A PRISMA Compliant Meta-Analysis. *PLoS One* 10, e0140329
- Fehm T, Krawczyk N, Ruckhäberle E, Scharl A et al. (2015): Mammographiescreening - wo stehen wir? *Forum* 30, 42-45

- Fiegl H, Millinger S, Mueller-Holzner E, Marth C, Ensinger C, Berger A, Klocker H, Goebel G, Widschwendter M (2005): Circulating tumor-specific DNA: a marker for monitoring efficacy of adjuvant therapy in cancer patients. *Cancer Res* 65, 1141-1145
- Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT et al. (2001): Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78-83
- Förster T (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55-75
- Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suner D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J et al. (2005): Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10604-10609
- Fransquet PD, Lacaze P, Saffery R, McNeil J, Woods R, Ryan J (2018): Blood DNA methylation as a potential biomarker of dementia: A systematic review. *Alzheimers Dement* 14, 81-103
- Friedrich A, Kullmann F (2003): Familial adenomatous polyposis syndrome (FAP): pathogenesis and molecular mechanisms. *Med Klin (Munich)* 98, 776-782
- Fu D, Ren C, Tan H, Wei J, Zhu Y, He C, Shao W, Zhang J (2015): SOX17 promoter methylation in plasma DNA is associated with poor survival and can be used as a prognostic factor in breast cancer. *Medicine (Baltimore)* 94, e637
- Fu DY, Tan HS, Wei JL, Zhu CR, Jiang JX, Zhu YX, Cai FL, Chong MH, Ren CL (2015): Decreased expression of SOX17 is associated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer. *Tumour Biol* 36, 8025-8034
- Gage M, Wattendorf D, Henry LR (2012): Translational advances regarding hereditary breast cancer syndromes. *Journal of Surgical Oncology* 105, 444-451
- Gardiner-Garden M, Frommer M (1987): CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol.* 196, 261-282
- Geyer FC, Pareja F, Weigelt B, Rakha E, Ellis IO, Schnitt SJ, Reis-Filho JS (2017): The spectrum of triple-negative breast disease: High- and low-grade lesions. *Am J Pathol* 187, 2139-2151
- Gimelli S, Caridi G, Beri S, McCracken K, Bocciardi R, Zordan P, Dagnino M, Fiorio P, Murer L, Benetti E et al. (2010): Mutations in SOX17 are associated with congenital anomalies of the kidney and the urinary tract. *Hum Mutat* 31, 1352-1359
- Ginder GD, Williams DC Jr. (2018): Readers of DNA methylation, the MBD family as potential therapeutic targets. *Pharmacol Ther.* 184, 98-111
- Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB et al. (2017): Breast cancer - major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual CA. *Cancer J Clin* 67, 290-303
- Global Burden of Disease Cancer Collaboration et al. (2017): Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: A systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA Oncology* 3, 524-548
- Gøtzsche PC, Jørgensen KJ (2013): Screening for breast cancer with mammography. *Cochrane Database Syst Rev* 6, 1-73

- Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS et al. (2011): Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann Oncol* 22,1736-1747
- Grunau C, Clark SJ, Rosenthal A (2001): Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res* 29, 1-7
- Guerrero-Preston R, Hadar T, Ostrow KL, Soudry E, Echenique M, Ili-Gangas C, Perez G, Perez J, Brebi-Mieville P, Deschamps J et al. (2014): Differential promoter methylation of kinesin family member 1a in plasma is associated with breast cancer and DNA repair capacity. *Oncol Rep* 32, 505-512
- Guth SI, Wegner M (2008): Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cell Mol Life Sci* 65, 3000-3018
- Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B et al. (1995): The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med* 332, 839-847
- Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70
- Hannafon BN, Trigos YD, Calloway CL, Zhao YD, Lum DH, Welm AL, Zhao ZJ, Blick KE, Dooley WC, Ding WQ (2016): Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer. *Breast Cancer Res* 18, 90
- Hassiotou F, Geddes D (2013) Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clin Anat* 26, 29-48
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW (2006): Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res* 12, 4218-4224
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994
- Heidary M, Auer M, Ulz P, Heitzer E, Petru E, Gasch C, Riethdorf S, Mauermann O, Lafer I, Pristauz G et al. (2014): The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 16, 421
- Heitzer E, Peter Ulz, Jochen B. Geigl (2015): Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical Chemistry* 61, 112-123
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004): Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61, 2571-2587
- Hesson LB, Cooper WN, Latif F (2007): The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis Markers* 23, 73-87
- Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, Diez J, Sanchez-Mut JV, Setien F, Carmona FJ et al. (2012): Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 10522-10527
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology N Y* 10, 413-417
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3'-exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7276-7280
- Holliday R (1994): Epigenetics: An overview. *Developmental Genetics* 15, 453-457

- Holliday R, Pugh J (1975): DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226-232
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995): Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine* 1, 149-153
- Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves E, Merigan TC (1991): Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 29, 676-679
- Horne HN, Lee PS, Murphy SK, Alonso MA, Olson JA Jr., Marks JR (2009): Inactivation of the MAL gene in breast cancer is a common event that predicts benefit from adjuvant chemotherapy. *Mol Cancer Res* 7, 199-209
- Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, Wood T, Jeronimo C, Rosenbaum E, Stern J et al. (2006): Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol* 24, 4262-4269
- Horvath S (2013): DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14, 1-20
- Huang ZH, Li LH, Hua D (2006): Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett* 243, 64-70
- Huguet EL, McMahon JA, McMahon AP, Bicknell R, Harris AL (1994): Differential expression of human *Wnt* genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. *Cancer Research* 54, 2615-2621
- IQWiG (Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen) (Hrsg.): Biomarkerbasierte Tests zur Entscheidung für oder gegen eine adjuvante systemische Chemotherapie beim primären Mammakarzinom. 1.1 Auflage; Köln, 2020, 1-133
- Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M (2010): Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci* 101, 293-299
- Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Dolle P, Renucci A, Duboule D (1991): Murine genes related to the *Drosophila* AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J* 10, 2279-2289
- Jia Y, Chen Y, Wang Q, Jayasinghe U, Luo X, Wei Q, Wang J, Xiong H, Chen C, Xu B et al. (2017): Exosome: emerging biomarker in breast cancer. *Oncotarget* 8, 41717-41733
- Jing F, Zhang J, Tao J, Zhou Y, Jun L, Tang X, Wang Y, Hai H (2007): Hypermethylation of tumor suppressor genes BRCA1, p16 and 14-3-3-sigma in serum of sporadic breast cancer patients. *Onkologie* 30, 14-19
- Joehanes R, Just AC, Marioni RE, Pilling LC, Reynolds LM, Mandaviya PR, Guan W, Xu T, Elks CE, Aslibekyan S et al. (2016): Epigenetic signatures of cigarette smoking. *Circ Cardiovasc Genet* 2, 436-447
- Johnson KC, Houseman EA, King JE, Christensen BC (2017): Normal breast tissue DNA methylation differences at regulatory elements are associated with the cancer risk factor age. *Breast Cancer Res* 19, 81
- Johnstone SE, Baylin SB (2010): Stress and the epigenetic landscape: a link to the pathobiology of human diseases? *Nature Reviews Genetics* 11, 806
- Josse SA, Hannemann J, Spotter J, Bauche A, Andreas A, Muller V, Pantel K (2012): Changes in keratin expression during metastatic progression of breast cancer: impact on the detection of circulating tumor cells. *Clin Cancer Res* 18, 993-1003

- Joosse SA, Muller V, Steinbach B, Pantel K, Schwarzenbach H (2014): Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *Br J Cancer* 111, 909-917
- Jung JK, Park SH, Jang KL (2010): Hepatitis B virus X protein overcomes the growth-inhibitory potential of retinoic acid by downregulating retinoic acid receptor-*beta2* expression via DNA methylation. *J Gen Virol* 91, 493-500
- Kader A, Agarwal A, Abdelrazik H, Sharma RK, Ahmady A, Falcone T (2009): Evaluation of post-thaw DNA integrity of mouse blastocysts after ultrarapid and slow freezing. *Fertil Steril* 91, 2087-2094
- Kader F, Ghai M (2017): DNA methylation-based variation between human populations. *Mol Genet Genomics* 292, 5-35
- Kaiser J (2010): Epigenetic drugs take on cancer. *Science* 330, 576-578
- Katoh M (2002): Molecular cloning and characterization of human SOX17. *Int J Mol Med* 9, 153-157
- Kawano Y, Kitaoka M, Hamada Y, Walker MM, Waxman J, Kypta RM (2006): Regulation of prostate cell growth and morphogenesis by Dickkopf-3. *Oncogene* 25, 6528-6537
- Kelly TL, Trasler JM (2004): Reproductive epigenetics. *Clin Genet* 65, 247-260
- Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, Chaitcik S, Brenner HJ (1979): Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* 15, 659-670
- Khosravinia H, Ramesha K (2007): Influence of EDTA and magnesium on DNA extraction from blood samples and specificity of polymerase chain reaction. *African Journal of Biotechnology* 6, 184-187
- Kloten V, Becker B, Winner K, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T, Veeck J, Hartmann A, Knuchel R, Dahl E (2013): Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Res* 15, 1-11
- Kobayashi K, Ouchida M, Tsuji T, Hanafusa H, Miyazaki M, Namba M, Shimizu N, Shimizu K (2002): Reduced expression of the REIC/Dkk-3 gene by promoter-hypermethylation in human tumor cells. *Gene* 282, 151-158
- Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, Bitzer J, Wight E, Burki N, Diesch C, Holzgreve W, Zhong XY (2009): Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer* 8, 105
- Kondo Y, Issa JP (2004): Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 29-39
- Kong W, Yang H, He L, Zhao JJ, Coppola D, Dalton WS, Cheng JQ (2008): MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor *beta*/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol* 28, 6773-6784
- Kozera B, Rapacz M (2013): Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet* 54, 391-406
- Krupnik VE, Sharp JD, Jiang C, Robison K, Chickering TW, Amaravadi L, Brown DE, Guyot D, Mays G, Leiby K et al. (1999): Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* 238, 301-313
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27, 95-125

- Kucharzewska P, Belting M (2013): Emerging roles of extracellular vesicles in the adaptive response of tumour cells to microenvironmental stress. *J Extracell Vesicles* 2, 1-10
- Kumar R, Rajagopal K (2008): Single-step overlap-primer-walk polymerase chain reaction for multiple mutagenesis without overlap extension. *Anal Biochem* 377, 105-107
- Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL (2006): HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J* 75, 23-31
- Lee EJ, Jo M, Rho SB, Park K, Yoo YN, Park J, Chae M, Zhang W, Lee JH (2009): Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of *beta*-catenin. *Int J Cancer* 124, 287-297
- Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993): Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21, 3761-3766
- Lee MV, Katabathina VS, Bowerson ML, Mityul MI, Shetty AS, Elsayes KM, Balachandran A, Bhosale PR, McCullough AE, Menias CO (2017): BRCA-associated cancers: Role of imaging in screening, diagnosis and management. *Radiographics* 37, 1005-1023
- Leonard JL, Leonard DM, Wolfe SA, Liu J, Rivera J, Yang M, Leonard RT, Johnson JPS, Kumar P, Liebmann KL et al. (2017): The Dkk3 gene encodes a vital intracellular regulator of cell proliferation. *PLoS One* 12, e0181724
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977): Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37, 646-650
- Lianidou ES, Mavroudis D, Pantel K (2013): Advances in circulating tumor cells (CTC): from basic research to clinical practice. *Breast Cancer Res* 15, 319
- Liggett TE, Melnikov AA, Marks JR, Levenson VV (2011): Methylation patterns in cell-free plasma DNA reflect removal of the primary tumor and drug treatment of breast cancer patients. *Int J Cancer* 128, 492-499
- Liu J, Mao Q, Liu Y, Hao X, Zhang S, Zhang J (2013): Analysis of miR-205 and miR-155 expression in the blood of breast cancer patients. *Chin J Cancer Res* 25, 46-54
- Logan CY, Nusse R (2004): The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810
- Loenen WA (2006): S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything? *Biochem Soc Trans* 34, 330-333
- Lowry MC, Gallagher WM, O'Driscoll L (2015): The Role of Exosomes in Breast Cancer. *Clin Chem* 61, 1457-1465
- Luu HH, Zhang R, Haydon RC, Rayburn E, Kang Q, Si W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W et al. (2004): Wnt/*beta*-catenin signaling pathway as a novel cancer drug target. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 653-671
- Macias H, Hinck L (2012): Mammary gland development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 1, 533-557
- Magal LG, Yaffe Y, Shepshelovich J, Aranda JF, de Marco Mdel C, Gaus K, Alonso MA, Hirschberg K (2009): Clustering and lateral concentration of raft lipids by the MAL protein. *Mol Biol Cell* 20, 3751-3762

- Magny SJ, Shikhman R, Keppke AL (2020): Breast, Imaging, Reporting and Data System (BI RADS) StatPearls, Treasure Island (FL), 2020, <https://www.statpearls.com/kb/viewarticle/18585> abgerufen am 28.09.2020
- Malek D, Kaab-Sanyal V (2016): Implementation of the German Mammography Screening Program (German MSP) and first results for initial examinations, 2005-2009. *Breast Care (Basel)* 11, 183-187
- Mangia A, Malfettone A, Simone G, Darvishian F (2011): Old and new concepts in histopathological characterization of familial breast cancer. *Ann Oncol.* 22, 24-30
- Marmot MG, Altman DG, Cameron DA, Dewar JA, Thompson SG, Wilcox M (2012): The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review (2012). *Lancet* 380, 1778-1786
- Martinez-Galan J, Torres-Torres B, Nunez MI, Lopez-Penalver J, Del Moral R, Ruiz De Almodovar JM, Menjon S, Concha A, Chamorro C, Rios S et al. (2014): 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* 14, 1-8
- Martinez-Galan J, Torres B, Del Moral R, Munoz-Gamez JA, Martin-Oliva D, Villalobos M, Nunez MI, Luna Jde D, Oliver FJ, Ruiz de Almodovar JM (2008): Quantitative detection of methylated ESR1 and 14-3-3-sigma gene promoters in serum as candidate biomarkers for diagnosis of breast cancer and evaluation of treatment efficacy. *Cancer Biol Ther* 7, 958-965
- Matuschek C, Bolke E, Lammering G, Gerber PA, Peiper M, Budach W, Taskin H, Prisack HB, Schieren G, Orth K et al. (2010): Methylated APC and GSTP1 genes in serum DNA correlate with the presence of circulating blood tumor cells and are associated with a more aggressive and advanced breast cancer disease. *Eur J Med Res* 15, 277-286
- Mattei MG, de The H, Mattei JF, Marchio A, Tiollais P, Dejean A (1988): Assignment of the human hap retinoic acid receptor RAR *beta* gene to the p24 band of chromosome 3. *Hum Genet* 80, 189-190
- McAlpine PJ, Shows TB (1990): Nomenclature for human homeobox genes. *Genomics* 7, 460
- McNally S, Stein T (2017): Overview of Mammary Gland Development: A Comparison of Mouse and Human. *Methods Mol Biol* 1501, 1-17
- Meindl A, Hellebrand H, Wiek C et al. (2010): Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. *Nat Genet* 42, 410-414
- Metz CH, Scheulen M, Bornfeld N, Lohmann D, Zeschnigk M (2013): Ultradeep sequencing detects GNAQ and GNA11 mutations in cell-free DNA from plasma of patients with uveal melanoma. *Cancer Med* 2, 208-215
- Mizobuchi Y, Matsuzaki K, Kuwayama K, Kitazato K, Mure H, Kageji T, Nagahiro S (2008): REIC/Dkk-3 induces cell death in human malignant glioma. *Neuro Oncol* 10, 244-253
- Møller MH, Lousdal ML, Kristiansen IS, Stovring H (2019): Effect of organized mammography screening on breast cancer mortality: A population-based cohort study in Norway. *Int J Cancer* 144, 697-706
- Müller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, Perkmann E, Marth C, Widschwendter M (2003): DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res* 63, 7641-7645
- Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin SF, Kingsbury Z, Wong AS et al. (2013): Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 497, 108-112

- Nagase H, Nakamura Y (1993): Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* 2, 425-434
- Nagy B (2019): Cell-Free nucleic acids. *Int J Mol Sci* 20, 5649
- Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A et al. (2007): Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 450, 1235-1239
- Nelson HD, Cantor A, Humphrey L, Fu R, Pappas M, Daeges M, Griffin J (Hrsg): U.S. Preventive Services Task Force Evidence Syntheses, formerly Systematic Evidence Reviews: Screening for Breast Cancer: A Systematic Review to Update the 2009 U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. 124. Auflage; Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD), 2016
- Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclov NC, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE et al. (2014): An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature Medicine* 20, 548-554
- Nicola MH, Bizon R, Machado JJ, Sollero T, Rodarte RS, Nobre JS, Magalhaes MM, Takiya CM, Borojevic R (2003): Breast cancer micrometastases: different interactions of carcinoma cells with normal and cancer patients' bone marrow stromata. *Clin Exp Metastasis* 20, 471-479
- Niehrs C (2006): Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 25, 7469-7481
- Nishigaki K, Kaneko Y, Wakuda H, Husimi Y, Tanaka T (1985): Type II restriction endonucleases cleave single-stranded DNAs in general. *Nucleic Acids Res* 13, 5747-5760
- Njor S, Nystrom L, Moss S, Paci E, Broeders M, Segnan N, Lynge E (2012): Breast cancer mortality in mammographic screening in Europe: a review of incidence-based mortality studies. *J Med Screen* 19, 33-41
- Nusse R (2005): Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15, 28-32
- Nusse R, Varmus H (2012): Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. *Embo J* 31, 2670-2684
- Olayioye MA (2001): Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res* 3, 385-389
- Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, Blighe K, Marchese SD, Hills A, Woodley L et al. (2013): Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS One* 8, e77963
- Page K, Hava N, Ward B, Brown J, Guttery DS, Ruangpratheep C, Blighe K, Sharma A, Walker RA, Coombes RC et al. (2011): Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 104, 1342-1348
- Pang K, Martindale MQ (2008): Developmental expression of homeobox genes in the ctenophore *Mnemiopsis leidyi*. *Dev Genes Evol* 218, 307-319
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008): Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8, 329-340
- Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S (2009): Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 6, 339-351

- Park HL, Hong J (2014): Vacuum-assisted breast biopsy for breast cancer. *Gland Surg* 3, 120-127
- Park JK, Ryu JK, Yoon WJ, Lee SH, Lee GY, Jeong KS, Kim YT, Yoon YB (2012): The role of quantitative NPTX2 hypermethylation as a novel serum diagnostic marker in pancreatic cancer. *Pancreas* 41, 95-101
- Patterson SK, Roubidoux MA (2014): Update on new technologies in digital mammography. *Int J Womens Health* 6,781-788
- Paz MF, Fraga MF, Avila S, Guo M, Pollan M, Herman JG, Esteller M. (2003): A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Res* 63, 1114-1121
- Perry N, Broeders M, de Wolf C, Tornberg S, Holland R, von Karsa L (2008): European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis. Fourth edition-summary document. *Ann Oncol* 19, 614-622
- Piñeros M, Parkin DM, Ward K et al. (2019): Essential TNM: a registry tool to reduce gaps in cancer staging information. *Lancet Oncol* 20, 103-111
- Polisson C, Morgan RD (1990): AciI, a unique restriction endonuclease from *Arthrobacter citreus* which recognizes 5' CCGC 3'. *Nucleic Acids Res* 18, 5911
- Rack B, Schindlbeck C, Juckstock J, Andergassen U, Hepp P, Zwingers T, Friedl TW, Lorenz R, Tesch H, Fasching PA et al. (2014): Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 106, 1-11
- Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Burki N, Diesch C, Bitzer J, Zheng H, Schmid S, Zhong XY (2011): Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. *PLoS One* 6, e16080
- Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F et al. (2010) Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 12, 207
- Rea D, Francis A (2014): Breast screening saves lives: now is the time to address overtreatment. *J Comp Eff Res* 3, 111-113
- Rehm J, Room R, Monteiro M, Gmel G, Graham K, Rehn N, Sempos CT, Frick U, Jernigarn D: Alcohol use. In: Ezzati M et al., WHO (Hrsg.): Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. 1. Auflage; Geneva, 2004, 959-1109
- Remmele W, Klöppel G, Dietel M, Kreipe H: Pathologie: Mamma, Weibliches Genitale, Schwangerschaft und Kindererkrankungen. 3. Auflage; Springer, Heidelberg Berlin 2012, 73-87
- Robert Koch-Institut 2017: s ZfKD 2017
- Rodríguez-Paredes M, Esteller M. (2011): Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Me.* 17, 330-339
- Rohanizadegan M (2018): Analysis of circulating tumor DNA in breast cancer as a diagnostic and prognostic biomarker. *Cancer Genet* 228-229, 159-168
- Roth C, Pantel K, Muller V, Rack B, Kasimir-Bauer S, Janni W, Schwarzenbach H (2011): Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer* 11, 1-12

- Ruddy KJ, Winer EP (2013): Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship. *Ann Oncol* 24, 1434-1443
- Rykova EY, Tsvetovskaya GA, Sergeeva GI, Vlassov VV, Laktionov PP (2008): Methylation-based analysis of circulating DNA for breast tumor screening. *Ann N Y Acad Sci* 1137, 232-235
- Satya-Prakash KL, Pathak S, Hsu TC, Olivé M, Cailleau R (1981): Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: High frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 3, 61-73
- Sawaki M, Tamura K, Shimomura A, Taki Y, Nagashima F, Iwata H (2018): Practice management for elderly patients with breast cancer; Findings from a survey by the Japan Breast Cancer Study Group. *Nagoya J Med Sci* 80, 217-226
- Scholzen T, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182, 311-322
- Schwarzenbach H (2013): Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. *Breast Cancer Res* 15, 211
- Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K (2011a): Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 11, 426-437
- Schwarzenbach H, Müller V, Milde-Langosch K, Steinbach B, Pantel K (2011b): Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. *Mol Biosyst* 7, 2848-2854
- Scott MP (1992): Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 71, 551-553
- Sedlmayer F, Sautter-Bihl ML, Budach W, Dunst J, Fastner G, Feyer P, Fietkau R, Haase W, Harms W, Souchon R et al. (2013): DEGRO practical guidelines: radiotherapy of breast cancer I: radiotherapy following breast conserving therapy for invasive breast cancer. *Strahlenther Onkol* 189, 825-833
- Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Nguyen M (2001): p53 mutation in plasma DNA and its prognostic value in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 7, 2222-2227
- Sharma G, Mirza S, Yang YH, Parshad R, Hazrah P, Datta Gupta S, Ralhan R (2009): Prognostic relevance of promoter hypermethylation of multiple genes in breast cancer patients. *Cell Oncol* 31, 487-500
- Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK (2010): Various types and management of breast cancer: an overview. *J Adv Pharm Technol Res* 1, 109-126
- Shaw JA, Stebbing J (2014): Circulating free DNA in the management of breast cancer. *Ann Transl Med* 2, 1-3
- Shinozaki M, Hoon DS, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ, Turner R, Taback B (2005): Distinct hypermethylation profile of primary breast cancer is associated with sentinel lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 2156-2162
- Silvestri V, Barrowdale D, Mulligan AM, Neuhausen SL, Fox S, Karlan BY, Mitchell G, James P, Thull DL, Zorn KK et al. (2016): Male breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: pathology data from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2. *Breast Cancer Research* 18, 15
- Sinn HP, Kreipe H (2013): A brief overview of the WHO classification of breast tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care* 8, 149-154

- Siu AL (2016): Screening for Breast Cancer: U.S. preventive services task force recommendation statement. *Ann Intern Med.* 164, 279-296
- Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV, Laktionov PP (2006): Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer* 94, 1492-1495
- Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA et al. (2001): Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Hum Mol Genet* 10, 1413-1419
- Sotiriou C, Pusztai L (2009): Gene-expression signatures in breast cancer. *N Engl J Med* 360, 790-800
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1409-1416
- Stang A, Jockel KH (2018): The impact of cancer screening on all-cause mortality. *Dtsch Arztebl Int* 115, 481-486
- Starker A, Kuhnert R (2017): Früherkennung von Brustkrebs: Inanspruchnahme der Mammografie in Deutschland. *Journal of Health Monitoring* 2, 74-80
- Stratton MR, Rahman N (2007): The emerging landscape of breast cancer susceptibility. *Nature Genetics* 40, 17
- Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA (1987): Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 23, 707-712
- Suijkerbuijk KP, van der Wall E, Vooijs M, van Diest PJ (2008): Molecular analysis of nipple fluid for breast cancer screening. *Pathobiology* 75, 149-152
- Summers T, Langan RC, Nissan A et al. (2013): Serum-based DNA methylation biomarkers in colorectal cancer: potential for screening and early detection. *J Cancer.* 4, 210-216
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP (2017): Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 13, 1387-1397
- Swellam M, Abdelmaksoud MD, Sayed Mahmoud M, Ramadan A, Abdel-Moneem W, Hefny MM (2015): Aberrant methylation of APC and RAR β 2 genes in breast cancer patients. *IUBMB Life* 67, 61-68
- Tan W, Li Q, Chen K, Su F, Song E, Gong C (2016): Estrogen receptor *beta* as a prognostic factor in breast cancer patients: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 7, 10373-10385
- Taylor P, Potts HW (2008): Computer aids and human second reading as interventions in screening mammography: two systematic reviews to compare effects on cancer detection and recall rate. *Eur J Cancer* 44, 798-807
- Thompson LH, Schild D (1999): The contribution of homologous recombination in preserving genome integrity in mammalian cells. *Biochemie* 81, 87-105
- Thomas L: Labor und Diagnose, 8. Auflage; TH-Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt, 2012
- Thomssen C, Wand D (2012): Hereditäre Brustkrebs. *Onkologe*, 18, 216-223

- Thormann T: Etablierung eines Verfahrens zum Nachweis epigenetischer Biomarker im peripheren Blut zur Stratifizierung der Therapie des Rektumkarzinoms. Med. Diss. Göttingen 2015
- Turnbull L, Brown S, Harvey I, Olivier C, Drew P, Napp V, Hanby A, Brown J (2010): Comparative effectiveness of MRI in breast cancer (COMICE) trial: a randomised controlled trial. *Lancet* 375, 563-571
- van der Auwera I, Elst HJ, van Laere SJ, Maes H, Huget P, van Dam P, van Marck EA, Vermeulen PB, Dirix LY (2009): The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumour cells in blood from breast cancer patients. *Br J Cancer* 100, 1277-1286
- van Uden DJ, van Laarhoven HW, Westenberg AH, de Wilt JH, Blanken-Peters CF (2015): Inflammatory breast cancer: an overview. *Crit Rev Oncol Hematol* 93, 116-126
- Varela-Rey M, Woodhoo A, Martinez-Chantar ML, Mato JM, Lu SC (2013): Alcohol, DNA methylation, and cancer. *Alcohol Res* 35, 25-35
- Veeck J, Bektas N, Hartmann A, Kristiansen G, Heindricks U, Knuchel R, Dahl E (2008): Wnt signalling in human breast cancer: expression of the putative Wnt inhibitor Dickkopf-3 (DKK3) is frequently suppressed by promoter hypermethylation in mammary tumours. *Breast Cancer Res* 10, 82
- Vinayagamoorthy T, Maryanski D, Vinayagamoorthy D et al. (2015): Improved internal control for molecular diagnosis assays. *MethodsX* 2, 159-164
- Volodko N, Gordon M, Salla M, Ghazaleh HA, Baksh S (2014): RASSF tumor suppressor gene family: biological functions and regulation. *FEBS Lett* 588, 2671-2684
- Wang M, Ji S et al. (2018): Effect of exosome biomarkers for diagnosis and prognosis of breast cancer patients. *Clin Transl Oncol* 20, 906-911
- Wang Y, Zhang J, Xiao X, Liu H, Wang F, Li S, Wen Y, Wei Y, Su J, Zhang Y et al. (2016): The identification of age-associated cancer markers by an integrative analysis of dynamic DNA methylation changes. *Sci Rep* 6, 1-16
- Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ (2002): Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 27, 101-107
- Wegner M (1999): From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res* 27, 1409-1420
- Wei H, Therrien C, We A, Guan S, Zhu Z (2008): The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 36, 1-10
- Welsch (Hrsg.): Sobotta Lehrbuch Histologie. 2. Auflage; Urban & Fischer Elsevier, München 2006, 1044-1067
- Wen Y, Eng CH, Schmoranzler J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG (2004): EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol* 6, 820-830
- Wikman H, Vessella R, Pantel K (2008): Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS* 116, 754-770
- Wöckel A, Albert US, Janni W, Scharl A, Kreienberg R, Stuber T (2018a): The screening, diagnosis, treatment and follow-up of breast cancer, *Dtsch Arztebl Int* 115, 316-323

- Wöckel A, Festl J, Stuber T, Brust K, Krockenberger M, Heuschmann PU, Jiru-Hillmann S, Albert US, Budach W, Follmann M et al. (2018b): Interdisciplinary screening, diagnosis, therapy and follow-up of breast cancer. Guideline of the DGGG and the DKG (S3-Level, AWMF Registry Number 032/045OL, December 2017) - Part 2 with recommendations for the therapy of primary, recurrent and advanced breast cancer. *Geburtshilfe Frauenheilkd* **78**, 1056-1088
- Wu C-T, Morris JR (2001): Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science* **293**, 1103-1105
- Yamamoto N, Nakayama T, Kajita M, Miyake T, Iwamoto T, Kim SJ, Sakai A, Ishihara H, Tamaki Y, Noguchi S (2012): Detection of aberrant promoter methylation of GSTP1, RASSF1A, and RARbeta2 in serum DNA of patients with breast cancer by a newly established one-step methylation-specific PCR assay. *Breast Cancer Res Treat* **132**, 165-173
- Yazici H, Terry MB, Cho YH, Senie RT, Liao Y, Andrulis I, Santella RM (2009): Aberrant methylation of RASSF1A in plasma DNA before breast cancer diagnosis in the breast cancer family registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 2723-2725
- Yedjou CG, Tchounwou PB, Payton M, Miele L, Fonseca DD, Lowe L, Alo RA (2017): Assessing the racial and ethnic disparities in breast cancer mortality in the United States. *Int J Environ Res Public Health* **14**, 1-14
- Yeo W, Wong WL, Wong N, Law BK, Tse GM, Zhong S (2005): High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in tumorous and non-tumorous tissue of breast cancer. *Pathology* **37**, 125-130
- Yi JM, Guzzetta AA, Bailey VJ, Downing SR, Van Neste L, Chiappinelli KB, Keeley BP, Stark A, Herrera A, Wolfgang C et al. (2013): Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* **19**, 6544-6555
- Yue W, Sun Q, Dacic S, Landreneau RJ, Siegfried JM, Yu J, Zhang L (2008): Downregulation of Dkk3 activates beta-catenin/TCF-4 signaling in lung cancer. *Carcinogenesis* **29**, 84-92
- ZfKD (Zentrum für Krebsregisterdaten), GEKID (Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, e.V.): Krebs in Deutschland für 2013/2014, Robert Koch-Institut, Berlin 2017
- Zhou SJ, Zhuo SR, Yang XQ, Qin CX, Wang ZL (2014): Serum Dickkopf-1 expression level positively correlates with a poor prognosis in breast cancer. *Diagn Pathol* **9**, 161
- Zhu W, Qin W, Atasoy U, Sauter ER (2009): Circulating microRNAs in breast cancer and healthy subjects. *BMC Res Notes* **2**, 1-5

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle im Besonderen bei Herrn Prof. Dr. med. T. Legler herzlich bedanken für die Möglichkeit der Erstellung einer experimentellen Doktorarbeit in der Abteilung der Transfusionsmedizin der UMG. Nur durch sein großes Engagement sowie der hervorragenden, zielführenden und konstruktiven Betreuung war ein erfolgreicher Abschluss dieser Arbeit möglich.

Ein besonderes Dankeschön gilt zudem den medizinisch-technischen Assistentinnen des PCR- und HLA-Labors der Transfusionsmedizin, wobei ich insbesondere Frau Quentin-Perkaus und Frau Brandfaß für ihre geduldige und umfassende Unterstützung bei der praktischen Anleitung und Umsetzung der Experimente sowie der Verwaltung der Plasmaproben und Materialien sehr dankbar bin.

Besonderer Dank muss außerdem allen Patientinnen und Patienten sowie den Blutspenderinnen und Blutspendern für ihre Zustimmung zur wissenschaftlichen Verwendung ihrer Blutbestandteile zu Teil werden. Durch ihre Bereitschaft wurde die hier vorliegende Arbeit erst ermöglicht.

Lebenslauf