

Aus dem
Institut für Onkologische Chemie
Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Bojar

**Assoziation methylierter Gene
im Blut von Mammakarzinompatientinnen mit dem Auftreten
zirkulierender Tumorzellen und dem
Progress der Krankheit**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Humanmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Handan Sürmen

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Bojar

Koreferent: PD Dr. med. Edwin Boelke

Marito meo et illis, quos amo et quibus gratias ex animo ago

Aus dieser Arbeit ist folgende Veröffentlichung hervorgegangen:

Matuschek C, Bölke E, Lammering G, Gerber PA, Peiper M, Budach W, Taskin H, Prisack HB,
Schieren G, Orth K, Bojar H:

„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”

European Journal of Medical Research 2010 Jul 26;15(7):277 – 86

Abstract: Assoziation methylierter Gene im Blut von Mammakarzinompatientinnen mit dem Auftreten zirkulierender Tumorzellen und dem Progress der Krankheit

Theoretischer Hintergrund

Tumorassoziierte DNA-Methylierungen scheinen, ebenso wie zirkulierende Tumorzellen (CTCs), eine bedeutende prognostische Relevanz bei Mammakarzinomen zu besitzen. Die vorliegende Studie erforscht Korrelationen zwischen DNA-Hypermethylierungen bei Mammakarzinompatientinnen zu prognostisch bedeutsamen klinischen Parametern und zeigt Assoziationen zwischen DNA-Methylierungen mit erhöhten CTC-Mengen im Blut auf.

Material und Methoden

Die freie Serum-DNA von 86 Mammakarzinompatientinnen und 23 gesunden Probanden wurde auf Methylierungen der brustkrebsassoziierten Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1 und CDKN2 hin untersucht. Die Detektion der DNA-Methylierungen erfolgte mittels spezieller methylierungs-spezifischer PCR, dem MethyLight-Verfahren. Korrelationen zwischen Hypermethylierungen der einzelnen Gene zu klinisch pathologischen Parametern, wie Tumorgröße, Nodalstatus, Metastasierungsstand, histologisches Grading, ER-Status, PR-Status, Her-2/neu-Status, CA 15-3-Status, histologische Tumordifferenzierung, Alter und Unterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidivtumoren wurden analysiert. Anschließend wurden Zusammenhänge zwischen DNA-Methylierungen mit dem Vorkommen erhöhter CTCs im peripheren Blut von Mammakarzinom-patientinnen anhand der Untersuchungsergebnisse einer parallelen Studie des Instituts für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf an 63 Patientinnen erforscht und gewertet.

Ergebnisse

Abnormal erhöhte Methylierungen traten vor allem beim APC-Gen ($p=0,05$) auf. Im Gegensatz dazu wurden alle Patienten und Kontrollpersonen, bis auf eine, negativ auf eine Methylierung des Gens CDKN2 getestet. Positiv zum Lymphknotenbefall korrelierte insbesondere das Gen GSTP1 ($p=0,002$). Dahingegen weisen APC ($p=0,002$) und RASSF1 ($p=0,046$) einen deutlichen Zusammenhang zu bestehenden Metastasen auf. Neben ESR1 ($p=0,024$), zeigt vor allem das GSTP1 ($p=0,003$) eine deutliche Wechselbeziehung zum Her-2/neu-Status. Eindrucksvoll ist die Hypermethylierung des APC ($p=0,000$) bei CA 15-3 positiven Patientinnen. Bei der Unterscheidung zwischen Primärtumoren und Rezidiven offenbart das APC Gen ($p=0,006$) eine hohe Korrelation zu Patientinnen mit Rezidivtumor. Das Auftreten von CTCs korrelierte mit der Hypermethylierungen speziell der Gene GSTP1 ($p=0,022$) und APC ($p=0,013$).

Fazit

DNA-Methylierungen, insbesondere der Gene APC und GSTP1, korrelieren mit einem aggressiveren und fortgeschritteneren Mammakarzinom sowie mit einem erhöhten Vorhandensein von CTCs im peripheren Blut von Patientinnen. Die kombinierte Untersuchung von DNA-Hypermethylierungen, insbesondere des GSTP1, und erhöhten CTC-Mengen, optimiert die hohe prognostische und prädiktive Aussagekraft vor allem als Verlaufsparemeter im Therapiemonitoring von Mammakarzinomen.

<i>1 Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Mammakarzinom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.1.1 Prävalenz	1
1.1.1.2 Inzidenz	1
1.1.2 Risikofaktoren	2
1.1.2.1 Genetische Faktoren	2
1.1.2.2 Nicht genetische Faktoren	3
1.1.3 Diagnostik / Therapiemonitoring	4
1.1.4 Therapie	4
1.1.4.1 Operation	4
1.1.4.2 Nicht-invasive-Therapie	5
1.1.4.3 Neue Therapieverfahren	6
1.1.5 Prognostische und prädiktive Parameter	7
1.1.5.1 Tumorgröße und Nodalstatus	7
1.1.5.2 Alternative Marker	8
1.1.5.3 Etablierte Biomarker	8
1.1.5.4 Methylierungsstatus	9
1.1.6 Prognose	9
1.2 Karzinogenese	10
1.2.1 Genetische Veränderungen	10
1.2.2 Epigenetische Prozesse	11
1.2.2.1 Imprinting	11
1.2.2.2 Silencing	12
1.2.3 Two-Hit-Theorie	12
1.3 Methylierung von DNA	13
1.3.1 Biochemischer Prozess	13
1.3.2 Methylierung und Karzinome	14
1.3.3 Methylierung und klinische Relevanz	18
1.3.3.1 Diagnostik mittels Methylierung	19
1.3.3.2 Monitoring mittels Methylierung	19
1.3.3.3 Methylierung als neuer Therapieansatz	20
1.3.3.4 Prognostische Aussagekraft von Methylierungsmustern	20
1.4 Die Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1, CDKN2	21
1.4.1 APC	22
1.4.2 RASSF1	22
1.4.3 GSTP1	23
1.4.4 ESR1	23

1.4.5 CDKN2A	24
1.5 Metastasierung, zirkulierende Tumorzellen und Tumor-DNA im Blutserum	24
1.5.1 Metastasierung	24
1.5.2 Tumorassoziierte DNA im Serum	25
1.5.3 Zirkulierende Tumorzellen	26
1.6 MethyLight	28
2 Zielsetzung	29
3 Material und Methoden	31
3.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe	31
3.1.1 Allgemeine Kollektivbeschreibung	31
3.1.2 Staging und Grading	31
3.1.2.1 TNM-Klassifikation	31
3.1.2.2 AJCC-Klassifikation	33
3.1.2.3 Grading	34
3.1.3 Therapiestatus	34
3.3 Materialliste	36
3.4 Methoden	38
3.4.1 Methodenübersicht	38
3.4.1.1 Validierung der Methodik	38
3.4.1.2 Untersuchung der Patienten-DNA	39
3.4.2 Anlegen von Zellkulturen	39
3.4.3 PBL-DNA	40
3.4.3.1 Gewinnung von PBL	40
3.4.3.2 Isolierung der PBL-DNA	40
3.4.3.3 Methylierung von PBL-DNA	40
3.4.3.4 Verdünnungsreihe	41
3.4.3.5 Modifikation der PBL-DNA	41
3.4.4 Patienten-DNA aus Serum	41
3.4.4.1 Gewinnung von Blutserum	41
3.4.4.2 Aufreinigung von DNA aus Serumproben	41
3.4.5 Quantifizierung der DNA	44
3.4.6 Bisulfit-Modifizierung von DNA	44
3.4.7 PCR nach MethyLight	48
3.4.8 Zirkulierende Tumorzellen	49
3.4.9 Statistische Auswertung	49
3.4.9.1 Methylierungen der Gene	49

3.4.9.2 Korrelationsanalysen der Hypermethylierungen mit klinischen Daten	50
3.4.9.3 Korrelationsanalysen der Hypermethylierungen mit positiven CTC-Befunden	50
4 Resultate	51
4.1 Resultate der Validierung	51
4.1.1 Validierung durch Zelllinien und artifiziell methylierter PBL-DNA	51
4.1.2 Funktion des MethyLight-Verfahrens	52
4.1.3 Nachweisgrenzen von Methylierungen durch MethyLight	53
4.2 Tumorspezifische DNA im Serum von Mammakarzinompatientinnen	55
4.3 DNA-Methylierungen im Serum von Mammakarzinompatientinnen	58
4.3.1 APC	58
4.3.2 RASSF1	59
4.3.3 GSTP1	59
4.3.4 ESR1	60
4.3.5 CDKN2	60
4.4 Genkombinationen	61
4.4.1 Kombination APC+RASSF1	61
4.4.2 Kombination APC+RASSF1+GSTP1	62
4.5 Korrelation des Methylierungsstatus der vier relevanten Gene	63
4.6 Hypermethylierung einzelner Gene und Korrelationen zur Klinik	63
4.6.1 Korrelationen mit klinischen Parametern	64
4.6.1.1 Korrelationen zur Tumorgröße (X ² linearer Zusammenhang)	64
4.6.1.2 Korrelationen zum Lymphknotenbefall	65
4.6.1.3 Korrelationen zum Metastasierungsstatus	66
4.6.1.4 Korrelationen zum Grading (χ^2 bei linearem Zusammenhang)	67
4.6.1.5 Korrelationen zum AJCC-Index (American Joint Committee on Cancer)	68
4.6.1.6 Korrelationen zum ER-Status	69
4.6.1.7 Korrelationen zum PR-Status	70
4.6.1.8 Korrelationen zum HER-2/neu-Status	71
4.6.1.9 Korrelationen zum CA 15-3 Status	72
4.6.1.10 Korrelationen zur histologischen Tumorart	73
4.6.1.11 Korrelationen zum Alter	74
4.6.1.12 Korrelationen zur Diagnoseart	75
4.6 Zirkulierende Tumorzellen und Hypermethylierung einzelner Gene	76
4.6.1 Korrelation des APC mit zirkulierenden Tumorzellen	76
4.6.2 Korrelation des RASSF1 mit zirkulierenden Tumorzellen	77
4.6.3 Korrelation des GSTP1 mit zirkulierenden Tumorzellen	77

4.6.4 Korrelation des ESR1 mit zirkulierenden Tumorzellen _____	78
4.6.5 Korrelation der Genkombination von APC und RASSF1 mit zirkulierenden Tumorzellen ____	78
4.6.6 Korrelation der Genkombination von APC und GSTP1 mit zirkulierenden Tumorzellen ____	79
4.6.7 Korrelation der Genkombianation Min-1 mit zirkulierenden Tumorzellen _____	79
4.6.8 Korrelation der Genkombiantion Min-2 mit zirkulierenden Tumorzellen _____	80
5 Diskussion und Ausblick _____	81
6 Fazit _____	92
LITERATURVERZEICHNIS _____	IV
INTERNETVERZEICHNIS _____	XIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS _____	XIV
TABELLENVERZEICHNIS _____	XVI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS _____	XVII
LEBENS LAUF _____	XX
DANKSAGUNG _____	XXII
ERKLÄRUNG _____	XXIII

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die global häufigste maligne Neoplasie des weiblichen Geschlechts. Nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellt Brustkrebs die zweithäufigste Todesursache bei Frauen dar.

1.1.1 Epidemiologie

1.1.1.1 Prävalenz

Weltweit erkranken über eine Million Frauen jährlich am Mammakarzinom. Im Jahr 2002 erlagen 410.712 Frauen dem Leiden. National betrug im Jahr 2005 die Prävalenz 26,8%. Bei der weiblichen Bevölkerung über sechzig Jahren liegt der Anteil bei 40%. So wird insgesamt bei über 55.100 Frauen in Deutschland jährlich die Erstdiagnose Mammakarzinom gestellt. Etwa 23.200 (42%) der Patientinnen sind unter sechzig Jahre alt. Das mittlere Erkrankungsalter für Brustkrebs (62 Jahre) liegt sieben Jahre unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalter für Karzinome insgesamt bei Frauen (69 Jahre) (RKI: Krebs in Deutschland 2006). In der Letalitätsstatistik belegt das Mammakarzinom bei den 45-65 Jährigen Frauen sogar den ersten Platz (Kemper 2007).

Nur ein kleiner Teil (< 1%) der Brustkrebserkrankungen und -sterbefälle betrifft das männliche Geschlecht. Jedoch ist die Prognose verglichen mit Frauen schlechter, da das Mammakarzinom bei Männern meist erst in einem fortgeschritteneren Stadium diagnostiziert wird (Schindler 2004).

1.1.1.2 Inzidenz

Eine stetig steigende Inzidenz seit dem zweiten Weltkrieg ist international zu vermerken. Während in den USA beispielsweise in den 40er Jahren erst jede vierundvierzigste Frau am Mammakarzinom erkrankte, ist es heute bereits jede siebte Frau (Kemper 2007).

1.1.2 Risikofaktoren

Die Wahrscheinlichkeit an einem Mammakarzinom zu erkranken wird durch eine Reihe von Risikofaktoren begünstigt. In ca. 5-10% der Fälle wird von einer genetischen Disposition ausgegangen (Tyczynski et al. 2002). Für die Mehrheit der Brustkrebserkrankungen (> 90%) allerdings sind andere Faktoren ursächlich.

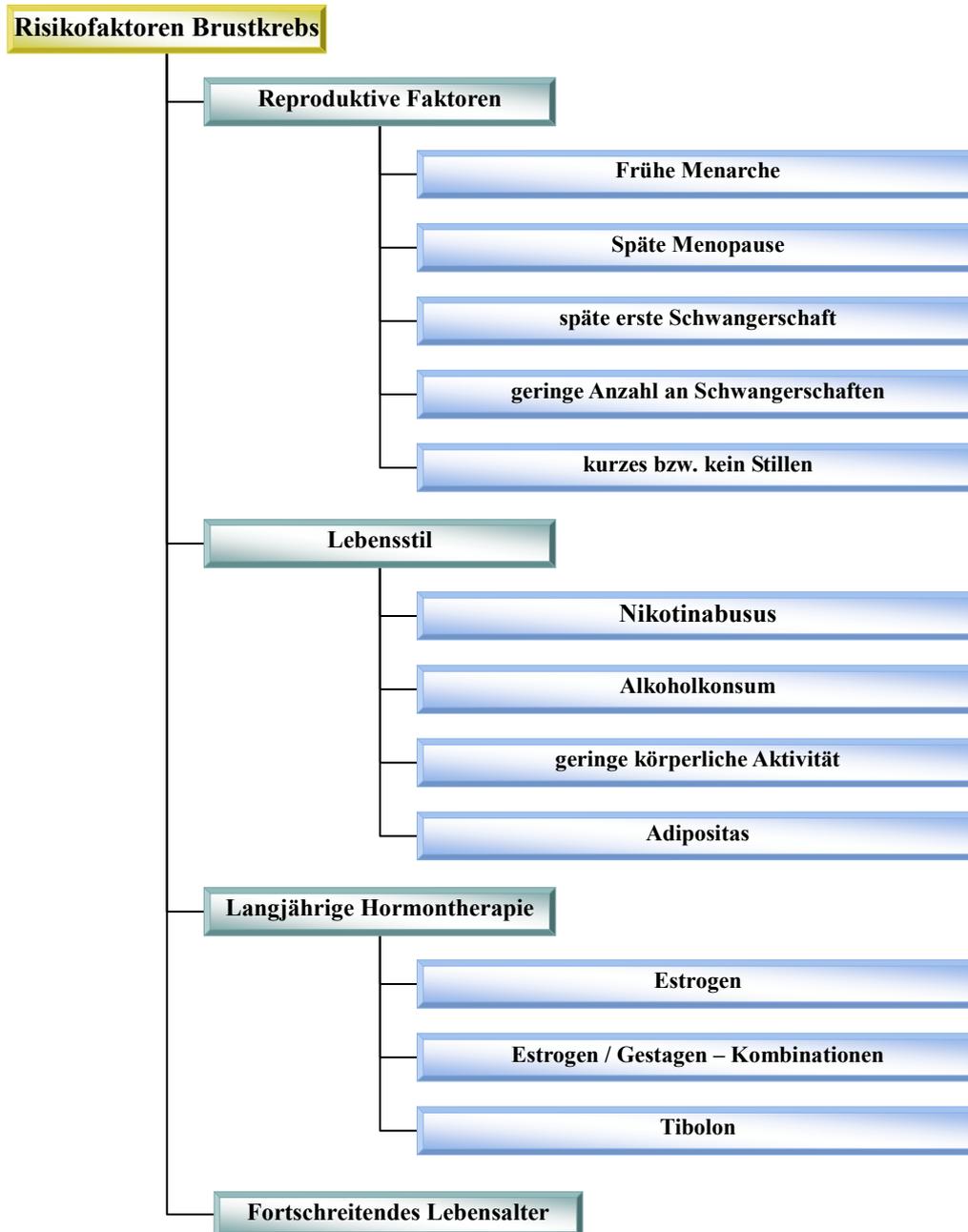
Dennoch können in über 50% der Fälle keine eindeutigen Risikofaktoren identifiziert werden (Zugmaier et al. 2003).

1.1.2.1 Genetische Faktoren

Für die genetische Disposition scheinen insbesondere die Gene BRCA1 und BRCA2 von großer Bedeutung zu sein. Bei Trägerinnen dieser Gene beträgt die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens ein Mammakarzinom zu entwickeln 80-85% (Tyczynski et al. 2002). Doch auch das Risiko für die Entwicklung anderer Karzinome wie Ovar-, Tuben- und Peritonealkarzinome ist erhöht. Eine Mutation von BRCA1 oder BRCA2 prädisponiert auch Männer für die Entwicklung von Krebs, insbesondere für Prostata-, Pankreas- und Brustkrebs (Schindler 2004).

1.1.2.2 Nicht genetische Faktoren

Folgendes Schema gibt eine Übersicht über häufig diskutierte nicht-genetische Risikofaktoren für die Entstehung des Mammakarzinoms (Million Women Study 2003):



Tibolon = synthetisches Estrogen / Gestagenähnlicher Wirkstoff

Abb. 1: Übersicht Risikofaktoren Brustkrebs

1.1.3 Diagnostik / Therapiemonitoring

Die meisten Tumore werden im Rahmen einer Selbstuntersuchung der Mamma oder während der Tastuntersuchung bei der gynäkologischen Krebsvorsorge entdeckt. Der palpierbare Knoten wird anschließend mittels bildgebender Methoden wie der Sonografie, Mammografie oder MRT näher identifiziert. In Zweifelsfällen können vor einer Operation auch Biopsien erforderlich werden. Anschließend entscheidet der pathologische Befund über die Notwendigkeit einer Operation und das weitere therapeutische Vorgehen.

Obgleich die Mammographie bisher den Goldstandard in der Früherkennung des Mammakarzinoms darstellt, bleiben durch sie immerhin 20 % der Tumore unentdeckt (Vlahou et al. 2003).

Dieses relativ große Leck in der Diagnostik begründet den dringenden Bedarf an neuen sensibleren und spezifischeren Früherkennungsmethoden.

1.1.4 Therapie

Prinzipiell gibt es zwei unterschiedliche Ansätze zur Therapie des Mammakarzinoms:

- die chirurgische Entfernung des Tumors
- nicht-invasive Behandlungsverfahren / Medikamentöse Therapien
(Strahlentherapie, Zytostatika, Hormontherapie etc.)

1.1.4.1 Operation

Ziel der Operation ist meist die Genesung. Idealerweise erfolgt die vollkommene chirurgische Sanierung (R₀-Resektion) im frühestmöglichem Stadium der Erkrankung (Wajed et al. 2001). Zumeist ist eine zusätzliche medikamentöse Systemtherapie notwendig. Man differenziert zwischen adjuvanter Therapie und neo-adjuvanter Therapie.

Unter adjuvanter Therapie wird eine medikamentöse Therapie nach erfolgter Tumor-Chirurgie verstanden. Hierfür stehen diverse Schemata zur Auswahl. Ziel ist die Eliminierung eventuell vorhandener, aber noch nicht diagnostizierbarer Metastasen. Demnach findet diese Form der Therapie ihre Anwendung primär bei operablen Tumoren.

Die neoadjuvante Therapie erfolgt bereits vor dem chirurgischen Eingriff zum Zwecke der Situationsverbesserung, zum Beispiel einer Reduzierung der Tumorgröße (Zugmaier et al. 2003, DGS 2007).

1.1.4.2 Nicht-invasive-Therapie

1.1.4.2.1 Radiotherapie

Die Radiotherapie wird heutzutage vorwiegend, kombiniert mit der operativen Therapie, bei Metastasen (Bsp.: Gehirn, Lymphabflusswege) oder zur Schmerzreduzierung bei Metastasen (Bsp.: Skelettmastasen) eingesetzt.

1.1.4.2.2 Zytostatika

Eine Therapie mit Zytostatika wird allen Patientinnen mit befallenen Lymphknoten der Axilla bzw. nodal-negativen Patientinnen mit erhöhtem Risiko empfohlen. Kriterien eines erhöhten Risikos sind (Zugmaier et al. 2003, DGS 2007):

- Nodal-positiv
- Tumor > 1 cm
- rapid progressiver Tumor
- Hormonrezeptor-negativ
- Alter < 35 Jahre

Bereits bei Vorhandensein eines einzigen Kriteriums sollte eine Chemotherapie angewandt werden.

1.1.4.2.3 Hormontherapie

Auf etwa 70-80% aller Mammakarzinome wirken Östrogen und Progesteron wachstumsfördernd. Ein Großteil der Tumore (ca. 60%) ist in der Lage diese Hormone selbst zu produzieren. In diesen Fällen hat sich die Hormontherapie bewährt. Sie kann in drei Wirkstoffkategorien unterteilt werden: Antiöstrogene (Bsp. Tamoxifen), Aromatasehemmer und GnRH-Agonisten (Gonadotropin-Releasing-Hormon-Agonisten). Je nach Wirkstoff

greift die Therapie an unterschiedlichen Stellen der Hormonbildung und -wirkung ein und wirkt dem hormonbedingten Tumorwachstum entgegen (Zugmaier et al. 2003, DGS 2007).

1.1.4.2.4 Antikörpertherapie

Bei bis zu 25% der Patientinnen mit Metastasen werden Rezeptoren von Wachstumsfaktoren (Her-2/neu) auf Mammakarzinomzellen im Übermaß produziert (Zugmaier et al. 2003, DGS 2007). Gegen Tumore mit solchen Rezeptoren steht seit einigen Jahren als effektive Antikörpertherapie Trastuzumab/Herceptin® zur Verfügung (Lower et al. 2008).

1.1.4.2.5 Biphosphonate

Biphosphonate (Zoledronat, Clodronat, Ibandronat und Pamidronat) gewinnen hauptsächlich bei der unterstützenden Therapie von Skelettmetastasen eine zunehmende Bedeutung (Zugmaier et al. 2003, DGS 2007).

1.1.4.3 Neue Therapieverfahren

1.1.4.3.1 Immuntherapie

Das Prinzip der Antikörpertherapie findet bereits wirkungsvollen Einsatz bei der Behandlung des Mammakarzinoms. Ein weiteres stark erforschtes Teilgebiet der Immuntherapie sind Impfungen gegen Krebs (Emens 2008). Erste Erfolge wurden mit der Entwicklung eines Impfstoffes gegen Gebärmutterhalskrebs erzielt. An einer Impfung gegen das Mammakarzinom wird ebenfalls rege geforscht (Deutsche Krebshilfe 2004, Mittendorf et al. 2008, Tsuruma et al. 2008).

1.1.4.3.2 Angiogenese-Hemmer

Angiogenese-Hemmer, die die Blutversorgung des Tumors blockieren sollen, werden als neuer Therapieansatz diskutiert und untersucht (Zugmaier et al. 2003, DGS 2007).

1.1.4.3.3 Gentherapie

Hohe Erwartung verspricht sich die Forschung insbesondere von den Chancen der Gentherapie. Genetische beziehungsweise epigenetische Veränderungen (z.B.: Methylierung)

stehen hierbei im Fokus (DGS 2007). Methylierungsprofile von Brustkrebspatientinnen können richtungweisende Informationen zur exakteren Diagnosestellung und Prognose über den klinischen Verlauf liefern. Die Erstellung besserer, weil individuellerer, Therapiepläne wird ermöglicht (Wajed et al. 2001).

1.1.5 Prognostische und prädiktive Parameter

Erkrankungen und Krankheitsverläufe von Mammakarzinomen präsentieren sich äußerst heterogen. Daraus resultiert eine individuell unterschiedliche optimale Therapie. Um die persönlich bestmögliche Behandlung definieren zu können, bedient man sich prognostischer und prädiktiver Marker.

Prognostische Parameter werden zur Einschätzung der Überlebenszeit ohne Therapie bzw. unter Standardtherapie herangezogen. Prädiktive Parameter werden ermittelt, um exaktere Prognosen über die Sensibilität gegenüber einer Therapie treffen zu können.

1.1.5.1 Tumorgröße und Nodalstatus

Abgesehen von der Tumorgröße ist der Nodalstatus, also die Anzahl der befallenen LK, der wichtigste gängige prognostische Parameter bei Mammakarzinompatientinnen (Zugmaier et al. 2003, Müller et al. 2003). Dennoch stellt der Befall von axillären Lymphknoten nur ein indirektes Maß für die Metastasierungstendenz eines Karzinoms dar. Schätzungsweise ein Drittel aller Brustkrebspatientinnen mit negativem Nodalstatus erleidet ein Rezidiv, während hingegen ein Drittel aller Patientinnen mit positivem axillären LK-Befall nach zehn rezidivfreien Jahren als geheilt betrachtet werden kann. Diese Zahlen demonstrieren die Dringlichkeit nach spezifischeren und sensitiveren Parametern.

Idealerweise sollten zudem Veränderungen, die möglicherweise erst viele Jahre später zu einer Metastasierung führen können, so früh wie möglich im Blut registriert werden (Müller et al. 2003).

1.1.5.2 Alternative Marker

Aus dem Bedürfnis nach aussagekräftigeren Markern heraus sind alternative, viel versprechende Parameter in Diskussion. Hierzu zählen unter anderem Genexpressionsprofile, den Zellzyklus regulierende Proteine sowie okkulte Zytokeratin-positive metastatische Zellen im Knochenmark. Allen ist jedoch gemeinsam, dass der Wissensstand um diese Marker noch zu gering ist. Es bedarf weiterer intensiver Erforschung, die noch viel Zeit in Anspruch nehmen wird, um ihre prognostische Relevanz beurteilen zu können (Payne et al. 2008).

1.1.5.3 Etablierte Biomarker

1.1.5.2.1 ER-Status

Einer der bedeutsamsten prädiktiven Marker ist der Östrogenrezeptorstatus (ER-Status). Der ER-Status gibt zum einen Anhaltspunkte im Hinblick auf die Gesamtprognose. Zum anderen lassen sich Vorhersagen über die Ansprechbarkeit auf eine endokrine Therapie (z.B. Tamoxifen) durch den ER-Status exakter treffen (Payne et al. 2008).

1.1.5.2.2 PR-Status

Ein ebenfalls sehr gebräuchlicher hormonabhängiger Marker ist der Progesteronrezeptorstatus (PR-Status). Ähnlich wie der ER-Status wird er bei prognostischen und prädiktiven Fragestellungen herangezogen (Feng et al. 2007).

1.1.5.2.3 Her-2/neu Status

Auch der Her-2/neu-Status gehört zu den etablierten prognostischen und prädiktiven Markern der Mammakarzinomtherapie (Payne et al. 2008). Eine Überexpression des Her-2/neu findet sich bei ca. 30% der invasiven Brustkrebstumore sowie gehäuft bei gesteigertem Metastasierungspotenzial. Auch bei geringer Sensitivität dem Antiöstrogen Tamoxifen gegenüber sind vermehrt positive HER-2/neu-Befunde zu diagnostizieren (Fiegl et al 2006).

Ein positiver HER-2/neu-Status ist stets ein Zeichen für erhöhte Aggressivität der Karzinomzellen und erfordert eine besondere Behandlung (Agrawal et al. 2007).

1.1.5.4 Methylierungsstatus

Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass die Identifizierung tumorspezifischer Veränderungen der DNA in Serum oder Plasma von Krebspatienten ein großes prognostisches Potential birgt. Hierzu zählen neben Onkogenmutationen, Mikrosatellitenveränderungen und Reorganisation von Genen auch epigenetische Veränderungen, wie die Hypermethylierung von Promotorregionen.

Eine steigende Anzahl von Studien berichtet außerdem über das gehäufte Auftreten methylierter DNA im Plasma/Serum von Krebspatienten, hierunter auch Brustkrebspatientinnen, und über das Fehlen von methylierter DNA bei gesunden Kontrollgruppen (Müller et al 2003, Van der Auwera et al. 2009).

1.1.6 Prognose

Die 5-Jahresüberlebenswahrscheinlichkeit bei Mammakarzinompatientinnen ist mit bis zu 78% im Vergleich zu anderen Karzinomentitäten relativ günstig. In den letzten Jahren ist zudem eine kontinuierliche Verbesserung der 5- und 10-Jahresüberlebensraten zu beobachten. Frauen mit einem Tumor T3 oder T4 hatten nahezu unveränderte Überlebensraten, während bei Frauen mit Tumoren im Stadium T1 oder T2 die Überlebenswahrscheinlichkeit deutlich stieg.

Doch die Ursache für die steigenden Überlebenswahrscheinlichkeiten liegt nicht unbedingt in einer verbesserten Therapie. Vielmehr ist anzunehmen, dass Brustkrebspatientinnen länger leben, weil das Karzinom mittlerweile exakter und zu einem früheren Zeitpunkt diagnostiziert und somit operiert beziehungsweise therapiert werden kann (Vainio et al 2002). Der Zeitpunkt der Diagnosestellung ist folglich der bedeutendste prognostische Faktor.

Insbesondere Möglichkeiten zur Früherkennung von Brustkrebs bzw. von Tumorrezidiven müssen daher im Fokus zukünftiger Forschung liegen.

1.2 Karzinogenese

Die Entstehung von Brustkrebs ist ein komplexer multifaktorieller Mechanismus. Damit eine physiologische Zelle sich zu einer Karzinomzelle entwickelt, muss sie laut Hanahan und Weinberg folgende sechs Funktionen erwerben (Widschwendter und Jones 2002):

- unbegrenztes Proliferationspotenzial
- autokrine Versorgung
- Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- Umgehung der Apoptose
- progressive Angiogenese und Gewebsinvasion sowie Metastasierung

Lange Zeit wurden Mutationen auf genetischer Basis für die Entstehung von Karzinomen verantwortlich gemacht. Neue Studien zeigen indessen, dass die Signifikanz epigenetischer Einflüsse immer mehr in den Vordergrund rückt (Wajed et al 2001).

1.2.1 Genetische Veränderungen

Wenn der Mechanismus der Mitose außer Kontrolle gerät, führt dies zu einer ungehemmten Proliferation von Zellen. Ein Karzinom entsteht.

Physiologisch wird der Vorgang der Zellteilung von einer Reihe von Genen reguliert. Solche ursprünglich normalen Gene, die im Falle einer Mutation aber eine unkontrollierte Zellvermehrung auslösen können, werden Proto-Onkogene genannt. Mutierte, defekte Gene, die eine pathologische beschleunigte Mitose initiieren, werden als Onkogene bezeichnet.

Tumorsuppressorgene hingegen sind verantwortlich dafür, die Zellvermehrung zu limitieren und die Apoptose defekter Zellen induzieren. Sie sollen die Entstehung von Karzinomzellen supprimieren. Auch eine Mutation dieser Gene kann demnach ursächlich für maligne Neoplasien sein (Wajed et al. 2001).

Man unterscheidet ferner zwischen so genannten „gatekeeper“-Genen und den „caretaker“-Genen. Pfortnergene (Gatekeepergene) kontrollieren den Zellzyklus, während Aufsehergene (Caretakergene) die Stabilität der DNA sichern (Schindler 2004).

Laut Hemminki et al. (2007) sind für das Auftreten des familiären Mammakarzinoms in erster Linie genetische Veränderungen verantwortlich, während epigenetische Veränderungen hingegen primär das Spontanauftreten von Brustkrebs verursachen. Ferner gibt es Indize dafür, dass das Risiko eines zweiten Mammakarzinoms bei Patientinnen, die nach der Erstdiagnose aufgetretene epigenetische Veränderungen aufweisen, gesteigert ist.

1.2.2 Epigenetische Prozesse

Während in der Genetik Vererbung und Variationen der Basenabfolge der DNA (Nukleotid-Sequenz) als Informationsbasis zur Merkmalsausprägung im Fokus stehen, beschäftigt sich die Epigenetik mit einer Abweichung der Genexpression (Umsetzung des genetischen Codes in Proteine) und Genregulation. Die Sequenz der Nukleotide bleibt konstant. Stattdessen wird das Nukleotid selbst biochemisch, in der Regel durch Methylierung, verändert. (Jablonka und Lamb 2002).

Die größte Differenz zu genetischen Veränderungen besteht darin, dass epigenetische Veränderungen zum einen viel häufiger vorkommen, des weiteren nur in ganz bestimmten DNA-Abschnitten auftreten und drittens reversibel sind (Widschwendter und Jones 2002).

1.2.2.1 Imprinting

Üblicherweise wird jedes Gen eines Chromosoms exprimiert. Eine Abweichung hiervon ist das Imprinting (Syn. genomische Prägung).

Imprinting bezeichnet die reversible elternspezifische Prägung eines Allels bei unveränderter DNA-Sequenz. Es ist demzufolge gekennzeichnet durch zusätzliche epigenetische Modifikationen der DNA und bestimmt den Aktivitätsgrad eines Allels. Je nach paternaler oder maternaler Abstammung kann das imprintete Gen dann aktiv (überwiegend unmethyliert) oder inaktiv (vorwiegend methyliert) vorliegen. Das imprintete Gen wird nicht mehr exprimiert.

1.2.2.2 Silencing

Gen-Silencing (Syn. Knockdown, Inaktivierung) bezeichnet die Stilllegung eines Gens, in der Regel durch ein verändertes Methylierungsmuster. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung von DNA-Promoterregionen wird in der Epigenetik mittlerweile als Hauptmechanismus in der Entstehung von malignen Neoplasien angesehen (Karpf 2007).

1.2.3 Two-Hit-Theorie

Die 1971 von Knudson entwickelte Two-Hit-Theorie ist ein Erklärungsversuch für die ersten Schritte der Karzinogenese.

Hierbei wird davon ausgegangen, dass die alleinige Mutation eines Allels (Hit 1) nicht ausreichend für die Entstehung von Karzinomen ist. Erst wenn eine zusätzliche Mutation des zweiten Allels (Hit 2) folgt, ist die Basis geschaffen, um maligne Neoplasien zu entwickeln. Bei genetisch prädisponierten Karzinomen liegt die Inaktivierung des betreffenden Tumorsuppressorgens auf einem Allel bereits in der Keimbahn vor. Die Mutation des zweiten Allels folgt später im Laufe des Lebens. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide Mutationen erst im Laufe des Lebens auftreten ist geringer (Knudson 1971). Der Verlust beider Allele wird auch als „Loss of Heterozygosity“ (LOH) bezeichnet (Schindler 2004).

Die Inaktivierung eines Allels durch Methylierung kann somit der erste Schritt (Hit 1) in der Karzinogenese sein. Eine durch unabhängige genetische Vorgänge, durch Umweltfaktoren oder erneute Methylierung bedingte Mutation des zweiten Allels (Hit 2) komplettiert die Voraussetzungen der Karzinomentwicklung.

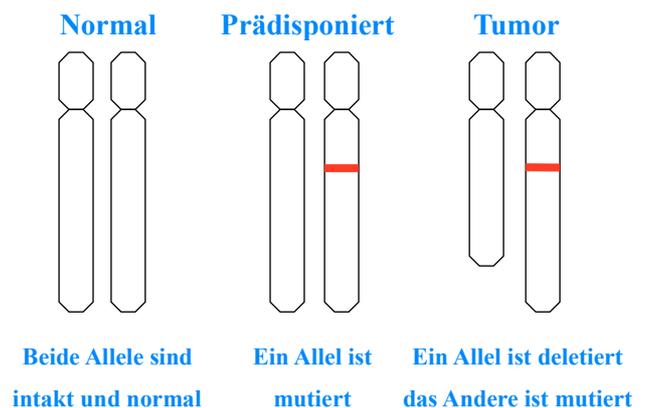


Abb. 2: Two – Hit – Theorie (nach Schindler 2004)

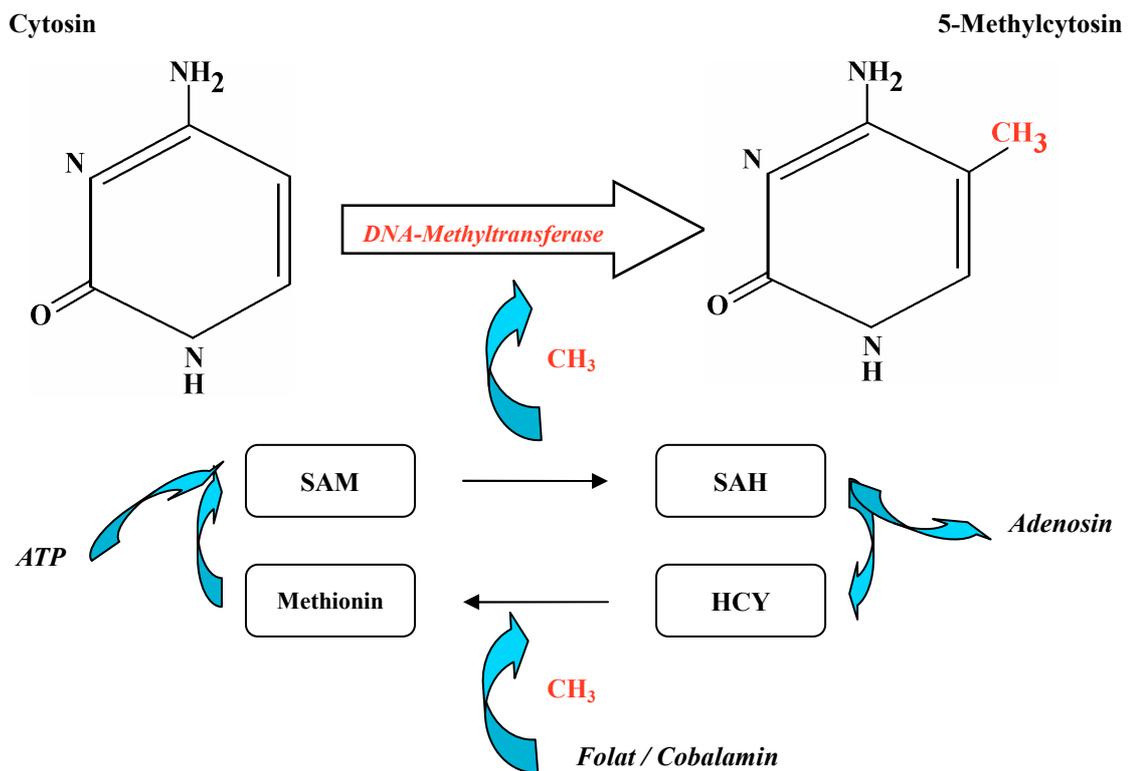
Dies besagt folglich, dass Methylierung nicht nur elementar mit der Genese von malignen Neoplasien zusammenhängt, sondern vor allem einen der allerersten, auch klinisch erfassbaren, Schritte der Karzinogenese repräsentieren kann (Wajed et al. 2001).

1.3 Methylierung von DNA

Eine irreguläre Methylierung von DNA wird mit einer Mehrzahl von Pathologien wie beispielsweise Immunschwäche-Syndromen beim Menschen assoziiert (Wajed et al 2001). Doch vor allem die Entstehung diverser Karzinomentitäten, inklusive die des Mammakarzinoms, scheint mit einem abweichenden Methylierungsstatus assoziiert zu sein (Dulaimi et al. 2004).

1.3.1 Biochemischer Prozess

DNA-Methylierung ist ein essentieller und zunächst physiologischer Vorgang in der Embryogenese von Säugetieren und Menschen. Sie stellt eine chemische Modifikation der DNA-Struktur dar, mit der Gene bei den meisten Lebewesen für gewöhnlich reguliert werden (Widschwendter und Jones 2002).



CH_3 =Methylgruppe, *SAM* =*S*-Adenosylmethionin (Methylgruppenlieferant), *SAH* =*S*-Adenosylhomocystein, *HCY* =Homocystein

Abb. 3: Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin (Wajed et al. et al. 2001)

DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3a und DNMT3b) katalysieren die kovalente Bindung der Methylgruppe ($-\text{CH}_3$) an die 5-Position des Cytosins (C). Es entsteht 5-Methylcytosin (^5mC). S-Adenosyl-Methionin fungiert als Methylgruppenspender und wird zu S-Adenosyl-Homocystein (Widschwendter und Jones 2002).

Es werden ausschließlich diejenigen Cytosine methyliert, die in direkter Nachbarschaft zu Guanin liegen. Solche Regionen der DNA werden als CpG Dinukleotide (CpGs) bezeichnet. Wider höherer Erwartungen (ca. 6%) beträgt der Gesamtanteil der CpGs in der DNA lediglich 1%. CpG-Inseln bezeichnen Abschnitte mit einem besonders hohen Vorkommen an CpGs. Solche CpG-Inseln mit einem Basenpaar-Aufkommen von mehreren Hundert bis einigen Tausend CpGs finden sich gehäuft in Promoterregionen multipler Gene. Insbesondere hiervon betroffen sind Tumorsuppressorgene (Wajed et al. 2001). Physiologischerweise liegen diese CpGs in unmethyliertem Zustand vor (Cottrell et al. 2004).

Die Hypermethylierung solcher Promotorregionen der DNA führt zu einer reduzierten Genexpression. Maßgeblich hierfür ist die methylierungsbedingte Anlagerung bestimmter Proteine (z.B. MeCP2) mit methylierungsspezifischer Bindungsstelle (Methyl-CpG binding domain = MDB). Zudem verfügen diese Proteine über eine so genannte TRD (transcriptional repression domain), die die Ausbildung von Proteinkomplexen (z.B. HDAC1, HDAC2) begünstigt. Diese binden an methylierte DNA-Regionen und rufen durch Deacetylierung umliegender Histone eine Veränderung der Chromatinstruktur hervor. Die Konsequenz ist eine Unterdrückung der Transkription.

Eine Umkehrung dieses Effektes kann durch Hemmung der Histondeacetylase mit Hilfe von Trichostatin A (TSA) erfolgen. TSA überschreibt das Silencing der Transkription (Wajed et al 2001).

1.3.2 Methylierung und Karzinome

Prinzipiell kann ein abweichendes Methylierungsmuster auf zwei Arten auf die Karzinogenese einwirken. Dies geschieht zum einen durch globale Hypomethylierung weitläufiger DNA-Abschnitten oder zum anderen durch De-Novo-Methylierung lokalisierter Regionen, den CpG-Inseln der Promotorregion.

Hypomethylierung (A) führt zur Aktivierung zuvor inaktiver Protoonkogene. De-Novo-Methylierung (B) hingegen hat durch das Silencing der Transkription eine Supprimierung von Tumorsuppressorgenen zur Folge.

Das Resultat ist in beiden Fällen eine gestörte Zellproliferation, welche ursächlich für die Entstehung von Karzinomen, hierunter auch von Mammakarzinomen, ist (Wajed et al. 2001).

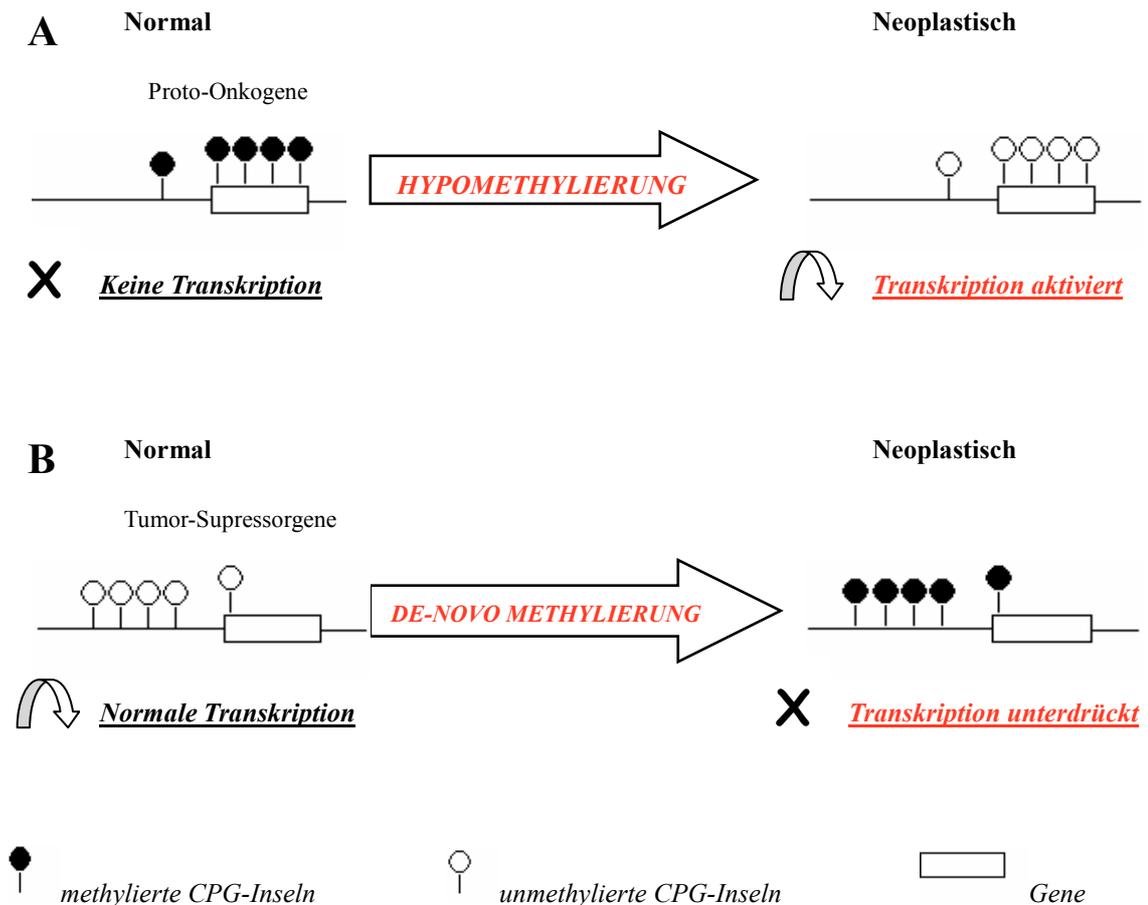


Abb. 4: Die Rolle der DNA-Methylierung bei der Entstehung von Krebs (Wajed et al. et al. 2001)

In Bezug auf das Kolorektalkarzinom beim Menschen konnte beispielsweise eine Hypermethylierung der CpG-Promotorregion des Gens MLH1 ausfindig gemacht werden. Dieses Gen reguliert physiologischerweise Reparaturvorgänge der DNA während der Mitose, um Neoplasien zu vermeiden. Durch Hypermethylierung wird jedoch eine Instabilität verursacht, die zu einer etwa hundertfach erhöhten Mutationsrate führt. Schätzungsweise

13% aller sporadischen Kolorektalkarzinome und nahezu jeder Fall von HNPCC (Hereditäres Non-Polypöses Kolorektal Karzinom) weisen diese Art von Instabilität auf. Betroffen sind hierbei Mutationen der Reparaturgene hMLH1 und hMLH2.

Bei vielen Tumoren, die von einer solchen Instabilität betroffen sind, kann zwar keine Mutation nachgewiesen werden, Hypermethylierung und fehlerhafte Genexpression von hMLH1 treten dennoch in Erscheinung.

Dasselbe Phänomen wird ferner bei Darmkrebslinien beobachtet, bei denen eine pharmakologische Reversion der Methylierung mit Hilfe von 5-aza-dC, die ursprünglich korrekte Expression von hMLH1 und eine einwandfreie Reparaturkapazität ermöglichen. Auch bei Harnblasenkarzinom-Zelllinien konnte durch Hemmung der Methylierung mittels 5-aza-dC eine Reaktivierung von Genen und Transkription der Genprodukte von CDKN2 bewirkt werden.

Ebenso von einem durch Methylierung veränderten Imprinting-Status betroffen sind die Tumorassoziierten Gene H19 und IGF2. Die Liste bekannter, die Zellproliferation regulierender Gene, deren Promotorregion bei diversen Krebsarten einer Hypermethylierung unterliegen, wird immer länger (Wajed et al. 2001).

Eine Selektion der relevantesten Mammakarzinom-assoziierten Gene ist nachfolgend in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Brustkrebs assoziierte Gene mit irregulärem Methylierungsstatus

Suppressor- gen	Synonyme	Funktionen	Weitere Krebsentitäten	Quellen
CDKN2A	Cyclinabhängiger Kinase-Inhibitor 2A, p16	Kontrolle des Zellzyklus	Speiseröhre, Magen, Darm, Pankreas, Lunge, Harnblase, Ovarien, Malignes Melanom	Wajed 2001, Sinha et al. 2008, Feng et al. 2007
RASSF1	RAS association domain family protein 1A	Hemmung der Zellproliferation, Apoptose	Lungen, Pankreas, Ovarien, Nieren, Prostata, Leber, Schilddrüse, Malignes Melanom	Dammann 2004, Shukla et al. 2006 Van der Auwera et al. 2009
APC	Adenomatous Polyposis of the Colon	Inhibition des β - Catenins, Zell- adhäsion, Signaltransduktion, Stabilisierung des Zytoskeletts, Regu- lierung des Zell-zyklus und Apoptose		Zhang et al. 2007, Paluszczak and Baer- Dubowska 2006, Liu et. al 2007, Parella et al. 2004, Van der Auwera et al. 2009
DAP-Kinase	Death-associated protein kinase, DAPK	Mediator der Interferon- γ -induzierten Apoptose		Widschwendter und Jones 2001, Kristensen et al. 2008
CDH-1	E-Cadherin,	Verhinderung von Invasion und Metastasierung	Schilddrüse	Caldeira et al. 2006, Wajed 2001, Prasad et al. 2008
TIMP-3	Tissue inhibitor MP3	Verhinderung von Metastasen	Niere, Gehirn, Darm, Lunge,	Wajed 2001, Liu, Choong et al. 2005
ER	Östrogen Rezeptor	Wachstumshemmung	Darm, Lunge, Leukämie, Prostata	Wei et al. 2008, Wajed 2001,

				Mirza et al. 2007, Van der Auwera 2009
GSTP1	Gluthation-S- Transferase pi 1 Gen	Entgiftungsfunktion, Schutz vor Karzinogenen	Prostata, Lunge	Cottrell 2004, Widschwendter und Joens 2001, Rønneberg et al. 2008
P53	Transformation related protein 53	Apoptose, Regulierung des Zellzyklus, Inhibition von Wachstum und Invasion		Feng et al. 2007, Li et al 2006
BRCA1	Breast Cancer 1, Brustkrebsgen 1	DNA-Reparation und Rekombination, Kontrolle von Zellzyklus und Transkription	Ovarien, Tuben, Peritoneum, Prostata, Pankreas	Tapia et al. 2008, Schindler 2004, Jing et al. 2007
Maspin	Protease Inhibitor 5	Hemmung der Angiogenese, Hemmung von Tumoren und Metastasierungen		Widschwendter und Jones 2001, Oliveira et al. 2005

Die mit dem Alter ansteigende Häufigkeit von Gen-Methylierungen in (noch) normalem Gewebe weist darauf hin, dass der Vorgang der Methylierung möglicherweise ein sehr frühes Ereignis in der Karzinogenese darstellt (Wajed et al. 2001).

1.3.3 Methylierung und klinische Relevanz

Konventionelle Methoden zur Früherkennung, wie reguläre Tumormarker, bildgebende Verfahren, Biopsien und endoskopische Untersuchungen sind mit vielen Mankos behaftet. Sie sind entweder nicht sensitiv beziehungsweise spezifisch genug, zu teuer oder unangenehm für den Patienten und in den meisten Fällen zu invasiv (Wajed et al. 2001).

Die Hypermethylierung der Promotorregionen bei Tumorzellen kann hingegen relativ einfach in Körperflüssigkeiten, wie Urin, Bronchioalveolarlavagen, Sputum und Blutserum, bestimmt werden (Hesson et al. 2007).

Hintergrundkenntnisse über die biochemischen Vorgänge der Methylierung und ihrer Relevanz für die Karzinogenese, eröffnen neue klinische Möglichkeiten im Kampf gegen den Krebs. Diese lassen sich in drei Kategorien gliedern: Diagnostik, Monitoring und Therapie (Wajed et al. 2001).

1.3.3.1 Diagnostik mittels Methylierung

Neben der Tastuntersuchung ist die Mammografie eine der gebräuchlichsten Früherkennungs-Untersuchungen. Doch etwa 15% aller invasiven Mammakarzinome bleiben trotz dieses Screenings unentdeckt. Die Bestimmung des Methylierungsstatus im Serum könnte als zusätzliche Methode zur Früherkennung dieses beachtliche Defizit decken. So sind tumorspezifische, abweichende Methylierungsmuster im Serum nicht nur bei metastasierten Karzinomen zu finden, sondern auch bereits bei Patienten in sehr frühem Krebsstadium und bei Tumoren, die noch nicht invasiv aktiv sind. (Dulaimi et al 2004).

Ferner wird beschrieben, dass unterschiedliche DNA-Methylierungsmuster eher spezifisch für bestimmte Karzinomspesies sind. Die Methylierung von GSTP1 (Gluthation-S-Transferase pi 1 Gen) zum Beispiel findet sich bei malignen Neoplasien der Prostata, Lunge und Brust, während dies hingegen bei Harnblasen-, Magen-, Gehirn- und Halstumoren nicht vorkommt (Cottrell et al. 2004).

Informationen über den Methylierungsstatus ermöglichen eine frühzeitigere und präzisere Diagnostik (Wajed et al. 2001).

1.3.3.2 Monitoring mittels Methylierung

Die Ermittlung von Methylierungsmustern kann Auskunft über die Sensibilität gegenüber einer bestimmten Therapie geben, beziehungsweise vorab die Definition der optimalen Therapie durch ihre prädiktive Aussagekraft erleichtern (Brueckner et al. 2007, Matuschek et al 2010).

1.3.3.3 Methylierung als neuer Therapieansatz

Epigenetische Therapieformen sind nicht gänzlich unbekannt. Ein Beispiel ist der Einsatz von Azanukleosiden bei Leukämien.

Die Hypermethylierung und Histondeacetylierung von Genen als Auslöser vieler Karzinomarten, inklusive des Mammakarzinoms, ist inzwischen bekannt. Der vielleicht bedeutsamste Faktor allerdings ist die Reversierbarkeit dieses Geschehens mittels DNA-Methyltransferase (DNMT) und Histondeacetylase (HDAC) -Inhibitoren (Brueckner et al. 2007).

Außer der Re-Aktivierung zuvor epigenetisch inaktiver Tumorsuppressorgene, erzielen DNMT und HDAC ferner eine Reduzierung der Tumorangiogenese. Der direkte angiostatische Wirkmechanismus von DNMT und HDAC ist allerdings noch nicht geklärt.

1.3.3.4 Prognostische Aussagekraft von Methylierungsmustern

Müller und Kollegen (Müller et al. 2003) führten eine Studie mit 86 Brustkrebspatientinnen durch. Mittels MethyLight, einem DNA-Methylierungsassay, wurden 36 Brustkrebsgene auf ihre prognostische Tauglichkeit hin untersucht. Insbesondere die Gene APC, RASSF1 und ESR1 stellten sich als nützliche prognostische Marker zur Beurteilung der Gesamtüberlebenschancen von Brustkrebspatientinnen heraus. So wiesen Methylierung von APC, RASSF1 oder ESR1 im Serum von Brustkrebspatientinnen auf eine ungünstige Prognose hin. Die Forschungsergebnisse von Van der Auwera und Kollegen 2009 untermauern die Signifikanz der DNA-Methylierung von APC, RASSF1 und ESR1 in ihrer prognostischen Potenz für das Mammakarzinom. Insbesondere das parallele Auftreten einer Methylierung von APC und RASSF1 scheint den Ergebnissen nach ein Indikator für die Progressivität der Erkrankung zu sein (Van der Auwera et al. 2009).

Diese Indizien über die gewichtige klinische Relevanz der DNA-Methylierungen erschließen ein komplett neues Feld der Krebsbekämpfung (Hellebrekers et al 2007). Abbildung 5 stellt die erwägbareren Einsatzmöglichkeiten dar.

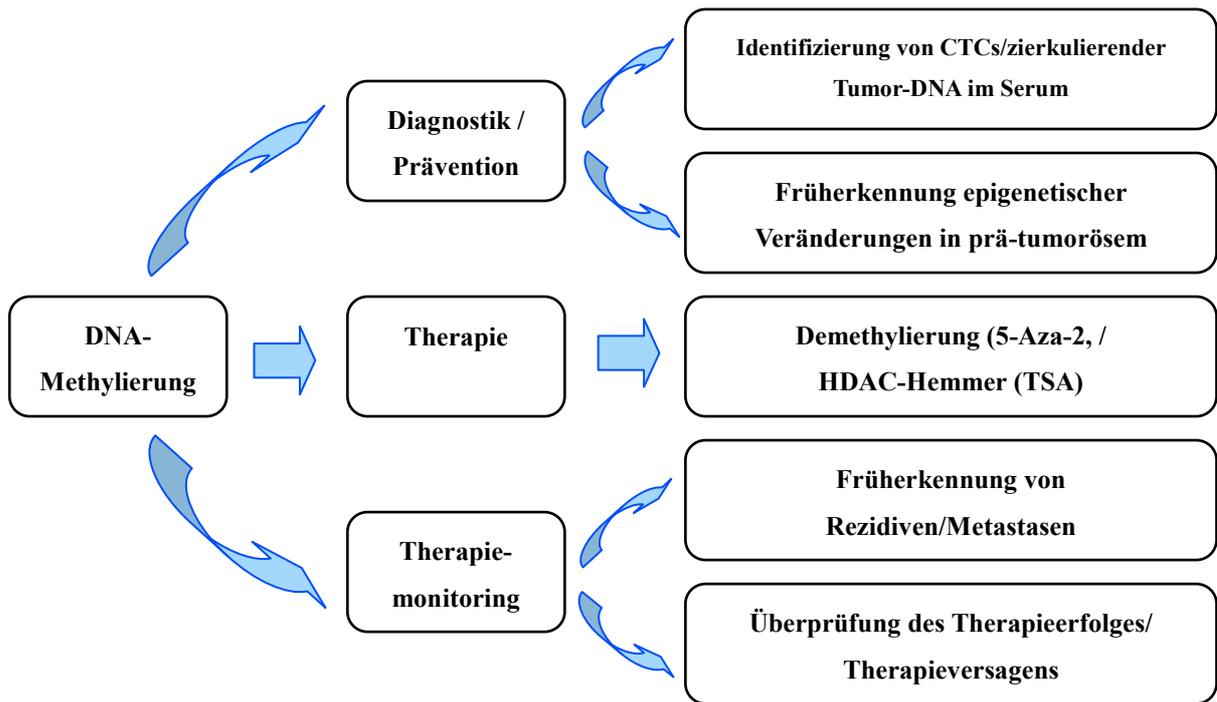


Abb. 5: Klinische Relevanz der DNA-Methylierung

(vgl. Miyamoto und Ushijima 2005, Widschwendter und Jones 2002)

1.4 Die Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1, CDKN2

Abgesehen von der Quelle der methylierten DNA im Serum, eignet sich nicht jedes im Methylierungsmuster veränderte Gen als prädiktiver oder prognostischer Marker. Das Gen HIC1 beispielsweise liegt in ca. 40% der primären Brusttumore und in ca. 90% aller metastasierten Mammakarzinome vor. Verglichen damit ist das Auftreten des Gens bei Gesunden mit nur 10% deutlich seltener. Die Methylierung des Gens HIC1 hätte demnach zwar rein diagnostische Relevanz, dennoch liefert seine Methylierung keinerlei signifikante prognostische Informationen zu Kriterien wie Metastasierungsrisiko, Überlebensrate oder Gesamtprognose (Müller et al. 2003)

Für diese Studie wurden speziell Gene gesucht, die nach derzeitigem Forschungsstand Hinweise auf eine prädiktive und prognostische Aussagekraft besitzen. Es wurden die brustkrebsassoziierten Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1, CDKN2 und als Kontrollgen

ACTB ausgewählt. Im Falle von Brustkrebs sind die Promotorregionen dieser Gene für gewöhnlich hypermethyliert (Dahl und Guldberg 2007).

1.4.1 APC

Das APC-Gen (adenomatous polyposis coli-Gen) ist eine wichtige Komponente der Signaltransduktion. Die Inaktivierung des APC führt zu einer Dysfunktion des Proteins β -Catenin, was wiederum eine abnormale Transkription von Onkogenen (z.B.: c-myc, c-jun und cyclin D1) nach sich zieht. Schließlich führt dies zur Entstehung von Krebs (Liu et al. 2007, Parella et al. 2004).

Aktuellen Studien gemäß ist das APC sogar in bis zu 75% der Fälle beim Vorliegen eines Mammakarzinoms an den CpG-Inseln der Promotorregionen abnormal hypermethyliert (Dahl und Guldberg 2007).

1.4.2 RASSF1

Es wird über eine Fülle von Genen berichtet, deren epigenetische Inaktivierung als Schlüsselfunktion der Karzinogenese gedeutet wird. Als einer der frühesten und häufigsten molekularen Veränderungen bei malignen Neoplasien steht die epigenetische Inaktivierung des RASSF1-Gens (Ras-assoziierte-Domain-Familie 1, Isoform A) in Verdacht.

Das RASSF1-Gen ist im chromosomalen Segment 3p21.3 lokalisiert. Zu seinen Funktionen gehören die Hemmung der Proliferation von Karzinomzellen sowie die Induktion der Apoptose.

Die Hypermethylierung der Promotorregion von CpG-Inseln unterdrückt die Expression von RASSF1 unter anderem bei Gliomen, Neuroblastomen sowie bei Lungen-, Prostata-, Nieren- und Brustkarzinomen. Beim Zervixkarzinom konnte eine umgekehrte Korrelation zwischen der Inaktivierung von RASSF1 und des Auftretens von Pappillomavirus-Infektionen aufgezeigt werden.

Eine Inaktivierung des RASSF1 wird in mehreren Studien mit einer verschlechterten Prognose sowie einem fortgeschrittenem Tumorstadium assoziiert.

Der aktuelle Forschungsstand pointiert das immense diagnostische und prognostische Potential der Methylierung von RASSF1. Die Nutzung der RASSF1-Methylierung als

Biomarker zur Früherkennung von Krebs kann demzufolge verbesserte Überlebenschancen für Krebspatienten bedeuten. Ferner vermochte in Studien nachgewiesen werden, dass die Anwendung von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren bei zuvor RASSF1-inaktivierten Zelllinien zu einer Reexpression des RASSF1 führt (Dammann 2004, Hesson et al. 2007).

1.4.3 GSTP1

GSTP1 (Glutathion S-Transferase P1) besitzt eine Art Entgiftungsfunktion und gewährt einen Schutz des Genoms vor diversen Karzinogenen (Widschwendter und Jones 2001). Es lässt sich vor allem in Östrogenrezeptor (ER)-negativen Brustkrebskulturen nachweisen, während es dagegen bei ER-positiven (ER+) Kulturen nicht detektierbar ist. Bei ER-negativen (ER-) oder GSTP1-exprimierenden Brustkrebszelllinien liegt eine Hypomethylierung der CpG-Inseln des GSTP1 vor. Bei ER-positiven oder nicht GSTP1 exprimierenden Zelllinien hingegen findet sich eine Hypermethylierung (Jhaveri und Morrow 1998).

Der Methylierungsgrad der Promotorregion des GSTP1 hängt somit stark von der Expression des GSTP1 in ER+ und ER- Mammakarzinomzelllinien ab (Jhaveri und Morrow 1998).

Erkenntnisse um das epigenetische Silencing des GSTP1-Gens durch Promoter-Hypermethylierung in Vorstufen von Brustkrebszellen sind noch relativ gering. Dennoch weisen aktuelle Studien darauf hin, dass die Hypermethylierung der GSTP1-Promoterregionen und die damit einhergehende Unterdrückung der GSTP1-Proteinexpression ein bereits sehr früh eintretendes Ereignis in der Entstehung von malignen neoplastischen Veränderungen der Brust ist (Lee 2007).

1.4.4 ESR1

Das ESR1-Gen (Östrogenrezeptor α) supprimiert vermutlich als protektiver Mechanismus die Expression von Rezeptoren für diverse Wachstumsfaktoren in gesundem Mammaepithel. Im Falle einer ESR1-Methylierung hingegen kommt es zu einer Inaktivierung des Gens. Dies führt zu einer abnormen, unkontrollierten Überexpression der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und einer Aufhebung der normalen Wachstumsregulation von Zellen. Allerdings ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob die Methylierung von ESR1 ein initialer Faktor in der Entstehung des Mammakarzinoms ist oder erst im Verlauf der Erkrankung

auftritt (Widschwendter und Jones 2002). Die epigenetische Veränderung des ESR1 Gens stellt jedenfalls eine extrem frühe genetische Veränderung in der Genese proliferativer Erkrankungen der Brust dar. Hierzu zählen neben dem fortgeschrittenem Mammakarzinom bereits auch Vorstufen von Krebs (Holst et al. 2007).

1.4.5 CDKN2A

Ein ebenso mit der Genese diverser Karzinomentitäten, unter anderem Brustkrebs, assoziiertes Tumorsuppressorgen ist das CDKN2A (Syn. p16). Es ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert und beansprucht eine tragende Rolle bei der Regulierung des Zellzyklus durch Inhibition Zyklin-abhängiger Kinase. Die Hypermethylierung der Promotorregion von p16 ist eines der meist berichteten epigenetischen Ereignisse in der Entstehung von Krebs (Wajed et al. 2001, Widschwendter und Jones 2002).

Erstaunlicherweise gibt es Hinweise auf eine Korrelation zwischen Methylierung von p16 und einer besseren Prognose ($p=0,002$) für Brustkrebspatientinnen (Roa et al. 2004).

1.5 Metastasierung, zirkulierende Tumorzellen und Tumor-DNA im Blutserum

Die Möglichkeiten der Tumortherapie werden in den meisten Fällen durch das Vorhandensein von Metastasen limitiert. Selbst Fortschritte in Tumorchirurgie, Radiotherapie und Chemotherapie konnten bei klinisch manifesten Metastasen die Überlebensraten von Tumorpatienten nur eingeschränkt verbessern (Chen und Yates 2006). Es ist anzunehmen, dass überwiegend die Absiedlung von Metastasen bestimmend für die Mortalität bei Krebspatienten ist (Cunnick et al. 2002). Daher kommt der Diagnose einer Tumorprogression zu einem früheren Zeitpunkt eine erhebliche Bedeutung zu.

1.5.1 Metastasierung

Der Prozess der Metastasierung ist komplex und erfolgt je nach Tumorentität auf unterschiedliche Art und Weise (Chen and Yates 2006). Prinzipiell lässt sich die zugrunde

liegende Systematik in acht Schritte unterteilen: Das lokale Infiltrieren des Tumors in umliegendes Gewebe („lokale Invasion“), das Eindringen von Tumorzellen in den Blutkreislauf („Intravasation“), die Zirkulation im peripheren Blut („Zirkulation“), die Auswanderung der Tumorzellen aus dem Blutkreislauf („Extravasation“), das Überleben der Zellen in der neuen Umgebung („Überleben“), die Vermehrung der Tumorzellen im befallenen Organ („Proliferation“) und die Ausbildung von Blutgefäßen („Angiogenese“) (Gassmann et al. 2004).

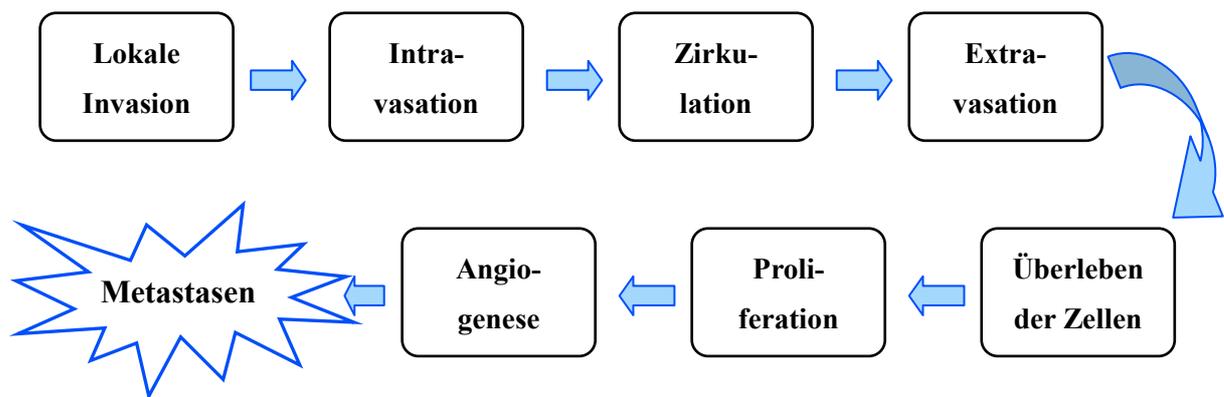


Abb. 6: Entstehungsprozess von Metastasen

Die frühe Disseminierung von Tumorzellen bleibt allerdings trotz hochwertiger bildgebender Technologien lange Zeit latent. Patientinnen mit erhöhtem Metastasierungsrisko können selbst durch traditionelle etablierte prognostische Faktoren noch nicht identifiziert werden (Van der Auwera et al. 2009).

1.5.2 Tumorassoziierte DNA im Serum

Bereits in den 70er Jahren wurden außergewöhnlich hohe Konzentrationen zellfreier tumorspezifischer DNA im Serum von Krebspatienten, darunter auch Mammakarzinompatienten, registriert (Miyamoto und Ushijima 2005). Neue Studien belegen, dass bei Mammakarzinompatientinnen die Konzentrationen bei Patientinnen mit Metastasen im Vergleich noch höher ausfallen (Müller et al. 2003, Van der Auwera et al. 2009, Matuschek et al. 2010).

Eine weitere interessante Hypothese ist die „Hypothese der Genometastasierung“. Sie besagt, dass zirkulierende veränderte DNA per se verantwortlich für die de novo Entwicklung von Tumorzellen in Organen sein kann. Ursächlich hierfür wird die Gentransfektion anfälliger Zellen in peripheren Organen mit vorherrschenden Onkogenen, die im Plasma zirkulieren und vom Primärtumor abstammen, gemacht. Speziell betroffen hiervon sind Organe, die sensibel für Mammakarzinom-Metastasen sind (Müller et al. 2003).

Der momentane Wissenstand erlaubt keine definitive Aussage über den exakten Ursprung tumorspezifischer DNA im Serum von Krebspatienten. Als Quellen erhöhter DNA-Mengen kommen sowohl Primärtumoren und zirkulierende Tumorzellen (CTCs) als auch DNA aus Tumorzerfall in Frage (Koyanagi et al. 2006).

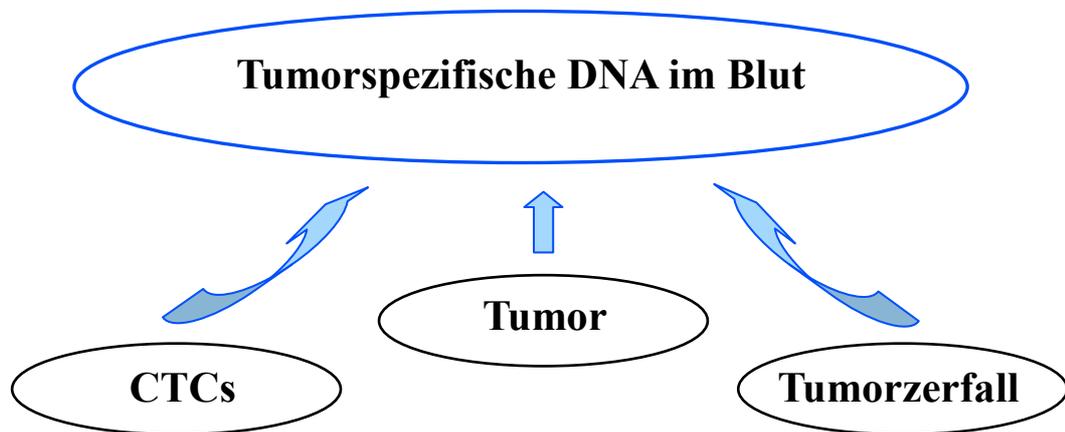


Abb. 7: Mögliche Quellen im Blut zirkulierender tumorspezifischer DNA

Nichtsdestotrotz ist zellfreie tumorspezifische DNA nur schwer zu detektieren (Koyanagi et al. 2006). Selbst wenn dies gelingt, müssen darüber hinaus krebsartspezifische Veränderungen identifiziert werden können, um die für klinische Zwecke benötigte Spezifität zu gewährleisten. Bisher wurden hierzu nur tumorspezifische genetische Mutationen herangezogen. Diese erwiesen sich jedoch als wenig nützlich oder waren zu kompliziert in der Erfassung (Miyamoto und Ushijima 2005).

1.5.3 Zirkulierende Tumorzellen

Die Wissenschaft weiß seit geraumer Zeit um zirkulierende Tumorzellen (CTCs) im Blut von Karzinompatienten. Da CTCs nur eine kurze Überlebenszeit im peripheren Blut von etwa 24

Stunden besitzen, deutet der positive Befund auf einen kontinuierlichen Nachschub hin. Dies ist am wahrscheinlichsten bei einem proliferativen Karzinom der Fall (Pantel et al 2002). Die Rolle der CTCs bezüglich ihres metastasierenden Potenzials ist allerdings noch nicht vollends aufgeklärt (Eckart et al. 2006).

Sicher ist jedoch, dass der positive Befund zirkulierender Tumorzellen mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf und einer schlechteren Gesamtprognose, insbesondere für Mammakarzinompatientinnen, einhergeht (Jotsuka et al. 2004, Van der Auwera et al. 2009). Der positive Nachweis von CTCs weist auf einen fortschreitenden Prozess hin und kann als unabhängiger prognostischer Marker und klinischer Parameter bei der Erfassung subklinischer maligner Tumorerkrankungen dienen (Van der Auwera et al. 2009, Matuschek et al. 2010). Ein Fortbestehen der CTCs drei bis fünf Wochen nach Therapiebeginn deutet überdies auf ein Therapieversagen hin (Hayes und Smerage 2008).

Neben prognostischen Informationen lassen sich so auch Kenntnisse über Krankheitsverlauf und Therapieerfolg beziehungsweise Therapieversagen gewinnen und können zur Auswahl der optimalen Therapie herangezogen werden (Pantel et al 2002).

Korrelationen zwischen dem Vorhandensein von CTCs und dem Auftreten methylierter Tumor-DNA werden ebenfalls beschrieben. Studien mit Melanompatienten zeigten eine negativere Resonanz auf Biochemotherapie, schnellere Progression der Erkrankung und eine ungünstigere Gesamtprognose der Patienten beim positiven Nachweis einer hohen CTC-Anzahl kombiniert mit einer gleichzeitigen Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen (Koyanagi et al. 2006). Okegawa und Kollegen bestätigten mit ihrer Studie 2010 die schlechtere Prognose und kürzere Überlebenserwartung für Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom, die gleichzeitig sowohl DNA-Hypermethylierungen als auch ein erhöhtes Vorkommen von CTCs aufwiesen (Okegawa et al 2010). Van der Auwera und Kollegen konnten in ihrer Studie 2009 die Signifikanz dieser Korrelation auch für Mammakarzinompatientinnen nachweisen. Disseminierte Tumorzellen stellen demnach eine wahrscheinliche Quelle für tumorassoziierte DNA dar. Die Identifizierung der Zellen erfolgt mittels des RT-PCR Verfahrens (Koyanagi et al. 2006) oder durch immunhistochemische Verfahren. Die Sensitivität bei der Erfassung von CTCs ist allein jedoch meist nicht hoch genug, insbesondere bei nur geringer Anzahl zirkulierender Zellen (Miyamoto und Ushijima 2005).

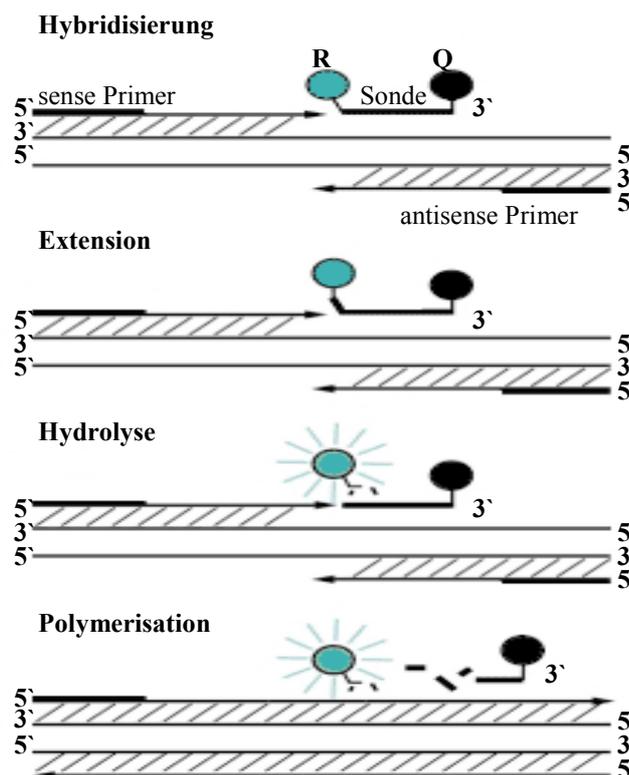
1.6 MethyLight

Quantitative MethyLight (QM) beschreibt eine fluoreszenzbasierte Echtzeit-PCR-Technologie zur Detektion und Quantifizierung von DNA-Methylierungen. Bei diesem Verfahren wird eine Taqmansonde verwendet, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff ausgestattet ist. Die Sonde und Amplifikationsprimer binden methylierungsspezifisch an die Amplifikate (Hybridisierung) und werden durch Aktivierung der Taq-Polymerase während der Extensionsphase hydrolysiert. Die Methylierungsspezifität wird dabei durch die Bisulfitmodifikation nichtmethylierter Cytosine erreicht. Bei der Hydrolyse werden in der PCR-Reaktion Reporter und Quencher voneinander getrennt und es kommt zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs und anschließenden Fertigstellung der Polymerisation. Der freigesetzte Farbstoff kann als Signal detektiert werden, wobei die gemessene Signalintensität in direkter Proportionalität zur Anzahl der freigesetzten Moleküle ansteigt.

Das Besondere dieser Methode, im Vergleich zu anderen Detektionsverfahren von DNA-Methylierungen, ist ihre extraordinär hohe Ertragsrate und somit ihre Verwendbarkeit schon bei sehr geringen DNA-Mengen (Eads et al. 2000).

Abb. 8: Prinzip TaqMan Sonden (Epigenomics 2007):

(Primer, Sonde und Reverseprimer müssen spezifisch für die methylierte DNA nach Bisulfitmodifikation sein)



2 Zielsetzung

Die Forschungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass das Mammakarzinom nicht als ein primär lokales Geschehen, sondern vielmehr als eine sich früh generalisierende Pathologie angesehen werden muss. Grundlegend hierfür ist die Erkenntnis, dass zirkulierende tumorspezifische DNA sowie die hämatogene Aussaat von Tumorzellen in allen Stadien der Karzinogenese auftreten können. Als Folge dessen werden kategorisch immer mehr Patienten bereits bei kleiner Tumorgöße und ohne Nachweis eines Lymphknotenbefalls systemisch mit Chemo- oder Hormontherapie behandelt. Weitergehende Forschung muss sich intensiviert auf die Ermittlung geeigneter Prognosefaktoren konzentrieren, um eine differenziertere Evaluierung der Patienten zur individuelleren Therapie vornehmen zu können (Schindlbeck et al. 2005). Ebenso muss die Observation des Krankheitsverlaufes und Therapieerfolgs effektiver durch geeignete Marker erfolgen.

- 1) Die Intention dieser Studie besteht darin, aufzuklären, inwieweit Kenntnisse über DNA-Methylierungen jetzt und in Zukunft in der Mammakarzinombekämpfung dienlich sein können.

Es wurden diesbezüglich Blutseren von 86 Mammakarzinompatientinnen und 23 gesunden Probanden *in vitro* getestet. Die Methylierungsmuster der brustkrebsassoziierten Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1 und CDKN2 wurden in der freien Serum-DNA untersucht. Speziell diese Gene werden in der Literatur als besonders geeignete Biomarker mit hoher prädiktiver und prognostischer Aussagekraft aufgeführt, deren Promotorregionen im Falle von Brustkrebs für gewöhnlich hypermethyliert vorliegen (Dahl und Guldborg 2007). Korrelationen zwischen Hypermethylierungen der einzelnen Gene und bestehenden klinischen Patientendaten sollten identifiziert werden, um so die sich daraus ergebende therapeutische und prognostische Relevanz der Gene definieren zu können. Zu den analysierten Parametern gehören: Tumorgöße, Nodalstatus, Metastasierungsstand, histologisches Grading, ER-Status, PR-Status, Her-2/neu- Status, CA 15-3-Status, histologische Tumordifferenzierung, Alter und Unterschiede zwischen Primärtumoren und Rezidivtumoren.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde zur Detektion der DNA-Methylierungen das MethyLight-Verfahren eingesetzt. Die Validierung, inwieweit sich dieser Test als Nachweismethode für veränderte Methylierungsmuster der DNA eignet, stellte ein weiteres Ziel der Studie dar.

- 2) Als Alternative zur direkten Bestimmung zirkulierender Tumorzellen (CTCs) und zur Erhöhung der Sensitivität wird die Bestimmung methylierter DNA diskutiert. Methylierte DNA im Serum ist stabil. Sie kann zudem durch Methoden mit hoher Ertragsrate, wie MethyLight, bereits in geringer Anzahl zuverlässig detektiert werden. Auch vereinfacht sie die Durchführung der Untersuchung. Es bedarf lediglich einer Blutnahme beim Patienten, die unkompliziert, einfach und beliebig häufig im Verlauf der Erkrankung durchgeführt werden kann (Miyamoto und Ushijima 2005, Müller et al. 2003). Über das Auftreten zirkulierender Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen wird berichtet (Pantel et al. 2002, Hayes und Smerage 2008, Koyanagi et al. 2006).

Es existieren zwar Forschungsarbeiten zu beiden einzelnen Faktoren, aber die Betrachtung beider Aspekte im Zusammenhang, DNA-Hypermethylierungen und zirkulierende Tumorzellen, wurde bis vor kurzem nur bei Ösophaguskarzinomen untersucht (IKOma Anticancer research). Van der Auwera und Kollegen führten 2009 diesbezüglich erstmalig eine Studie bei Mammakarzinompatientinnen durch. Diese Studie versucht folgende drei wichtige Komponenten im Kontext zu betrachten: Die Präsenz methylierter DNA, das Vorhandensein von CTCs sowie Hypermethylierung von Genen bei Mammakarzinompatientinnen im Vergleich zu Gesunden.

Weiteres wichtiges Ziel meiner Arbeit ist es, genau diesen Nexus zu überprüfen, in dem Korrelationen zwischen erhöhten CTC- Mengen und dem simultan positiven Befund einer Hypermethylierung bestimmter Gene bei Mammakarzinompatientinnen aufgedeckt werden sollen. Über den Nachweis einer Korrelation hinaus soll ferner ihre methodische und klinische Bedeutung gewertet werden. Auch dazu ist die Wahl des Patientenkollektives mit einem höheren Anteil fortgeschrittener Tumore sinnvoll, da mit einem häufigeren Auftreten von CTCs und methylierter DNA im Serum gerechnet werden kann.)

3 Material und Methoden

3.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

3.1.1 Allgemeine Kollektivbeschreibung

Diese Arbeit basiert auf den Daten von 86 Brustkrebspatientinnen der MNR-Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Zum Zeitpunkt der Studie befanden sich alle Patientinnen in Strahlentherapie. Fünfundsechzig Patientinnen (76%) erhielten eine Therapie im Anschluss an die Erstdiagnose, während es sich bei einundzwanzig Patientinnen (24%) um Therapien nach Auftreten von Rezidiven handelte. Das Alter der Patientinnen variierte zwischen vierunddreißig und einundachtzig Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei sechzig Jahren.

Zur Vergleichskontrolle wurden die Daten von 23 gesunden Probanden herangezogen. Das Alter der Kontrollgruppe lag zwischen vierundzwanzig und einundsechzig Jahren mit einem Durchschnittsalter von etwa vierundvierzig Jahren.

Alle Patientinnen und gesunden Probanden wurden über die Studie und die damit verbundenen Untersuchungen aufgeklärt und gaben vor Beginn ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde unter der Studien – Nr.: 2394 von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf geprüft und genehmigt.

3.1.2 Staging und Grading

3.1.2.1 TNM-Klassifikation

Die Stadieneinteilung der Tumore erfolgte nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer) für Mammakarzinome (Wittekind et al 2005):

T = Größe des Primärtumors: (größte Ausdehnung)	pT1	→	Karzinome ≤ 2 cm
	pT2	→	Karzinome > 2 cm und ≤ 5 cm
	pT3	→	Karzinome > 5 cm
	pT4	→	Karzinome mit Infiltration der Brustwand (nicht jedoch Mm. pectorales major / minor)
N = Nodalstatus:	pN1	→	Kein Befall der regionalen LK
	pN1	→	Metastasenbefall der regionalen LK
M = (Fern-) Metastasierung:	M0	→	Keine Fernmetastasen
	M1	→	Fernmetastasen

<u>Zusätze:</u>	p	postoperativ (ansonsten klinischer Tastbefund)
	x	nicht beurteilbar
	o	kein Anhalt / Befall
	Tis	Carcinoma in situ

Tab. 2: Staging des Patientenkollektivs

STAGING		GESAMT	%	ED	%	RD	%
TNM		84	100	65	77	19	23
pT	x	9	10,7	7	10,8	2	10,5
	is	2	2,4	2	2,4	0	0,00
	1	32	38,1	23	35,4	6	31,6
	2	30	35,7	24	36,9	6	31,6
	3	3	3,6	2	3,1	7	36,8
pN	4	10	11,9	7	10,8	3	15,8
	x	10	11,9	9	13,9	4	21,1
	0	33	39,3	29	44,6	13	68,4
	1	43	51,2	27	41,5	2	10,5
pM	x	25	29,8	19	29,2	5	26,3
	0	36	42,9	35	53,9	13	68,4
	1	25	29,8	11	16,9	0	0,00

Bei zwei Patientinnen konnte mangels vollständiger Datenlage keine Einteilung vorgenommen werden.

3.1.2.2 AJCC-Klassifikation

Eine erweiterte Klassifikation des Mammakarzinoms erfolgt seit 2002 nach dem Stagingssystem des AJCC (American Joint Committee on Cancer).

Hierbei wird der Tumor in die Stadien 0-IV gegliedert. Die Grundlage für die Einteilung bildet weiterhin die TNM-Klassifizierung (Kap. 3.1.2.1).

Bei drei Patientinnen konnte mangels vollständiger Datenlage keine Einteilung vorgenommen werden.

Tab. 3: AJCC-Klassifizierung

AJCC	T	N	M	Gesamt (n=83)	%	ED (n=64)	%	RD (n=18)	%
0	Tis	N0	M0	2	2,4	2	3,1	0	0,0
I	T1	N0	M0	18	21,7	16	25	2	11,1
IIa	T1	N1	M0	14	16,9	13	20,3	1	5,6
	T2	N0	M0						
IIb	T2	N1	M0	10	12,0	10	15,6	0	0,0
	T3	N0	M0						
IIIa	T1/T2	N2	M0	7	8,4	6	9,4	1	5,6
	T3	N1/N2	M0						
IIIb	T4 jedes T	Jedes N N3	M0 M0	9	10,8	7	10,9	1	5,6
IV	jedes T	Jedes N	M1	23	27,7	10	15,4	13	72,2

3.1.2.3 Grading

Die Stadieneinteilung in TNM wird durch den histologischen Differenzierungsgrad nach Bloom und Richardson (1957) ergänzt:

G1	→	gut differenziert
G2	→	mässig differenziert
G3	→	schlecht differenziert
Gx	→	nicht beurteilbar / unbekannt

Bei zwei Patientinnen konnte mangels vollständiger Datenlage keine Einteilung vorgenommen werden.

Tab. 4: Grading (Differenzierungsgrad)

Differenzierungsgrad		Malignität	GESAMT (n=84)	%	ED (n=65)	%	RD (n=19)	%
G	1	Gering	4	4,7	4	6,2	0	0,00
	2	Mittelgradig	44	51,2	34	52,3	10	52,6
	3	Hochgradig	26	30,2	20	30,8	6	31,6
	x	Unbekannt	10	11,6	7	10,8	3	15,8

3.1.3 Therapiestatus

Fünfundzwanzig Patientinnen nach Erstdiagnose (43,1%) erhielten vor der Radiotherapie eine Chemotherapie. Sechs der Rezidivpatientinnen mit Radiotherapie (50%) hatten zuvor Chemotherapie erhalten. Insgesamt betrug die Anzahl der mit Chemotherapie behandelten Patientinnen dreiunddreißig, das entspricht 45,83 % (Tabelle 3).

Tab. 5: Angewandte Schemata der Chemotherapie

Art der Chemotherapie	GESAMT (n=86)	%	ED (n=65)	%	RD (n=19)	%
EC	5	5,81	2	3,08	3	15,79
FEC	10	11,63	10	15,38	0	0,00
EC+CMF	3	3,49	1	1,54	2	10,53
ET	2	2,33	2	3,08	0	0,00
EC-ET	1	1,16	1	1,54	0	0,00
CMF	1	1,16	0	0,00	1	5,26
EC+TAX	5	5,81	5	7,69	0	0,00
EC+TAX+CMF	1	1,16	1	1,54	0	0,00
TAX	1	1,16	1	1,54	0	0,00
TAC	2	2,33	2	3,08	0	0,00
Keine	39	45,35	33	50,77	6	31,58
Unbekannt	14	16,23	7	10,77	7	36,84

EC= Epirubicin+Cyclophosphamid; FEC= 5-Fluorouracil(5-FU)+Epirubicin+Cyclophosphamid; ET= Taxane+Epirubicin; CMF= Cyclophosphamid + Methotrexat + 5-Fluoruracil TAX= Taxane (Paclitaxel/ Docetaxel) TAC= Docetaxel+Doxorubicin+Cyclophosphamid

3.3 Materialliste

Untersuchungsmaterial

- ca. 2-3 ml Serum aus peripher venösem Blut (Patienten / Kontrollgruppe)

Reagenzien

- | | |
|----------------------------------|---|
| ➤ H ₂ O | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| ➤ NaOH | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| ➤ EtOH 100 % / 90 % / 70 % | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| ➤ PBS (pH 7,2) | Gibco, Karlsruhe, Deutschland |
| ➤ Proteinase K | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| ➤ QIAmp DNA Mini Kit | QIAgen, Hilden, Deutschland |
| ➤ QIAamp Virus Kit | QIAgen, Hilden, Deutschland |
| ➤ SssI DNA-Methyltransferase | New England Biolabs |
| ➤ Puffer NEB 2 | New England Biolabs |
| ➤ SAM | New England Biolabs |
| ➤ MEM-Medium | Gibco, Karlsruhe, Deutschland |
| ➤ Ficoll-Paque-Lösung | Gibco, Karlsruhe, Deutschland |
| ➤ Fötale Kälberserum | Seromed, Berlin, Deutschland |
| ➤ Glutamin | Gibco, Karlsruhe, Deutschland |
| ➤ Antibiotic / Antimycotic | Gibco, Karlsruhe, Deutschland |
| ➤ CpGenome DNA -Modification Kit | CHEMICON International |
| ➤ β-Mercaptoethanol | Sigma, München Deutschland |
| ➤ TE-Puffer (pH 7,4) | Fluka Chemie, Buchs, Schweiz |
| ➤ Indikatorpapier zur pH-Messung | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| ➤ Oligonukleotidprimer | Eurogentec, Reinheim, D |
| ➤ TaqMan-PCR-Mastermix
USA | Applied Biosystems, Kalifornien,
USA |

Geräteliste

- | | |
|--|---------------------------------|
| ➤ Serumröhrchen Vacutainer [®] | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| ➤ EDTA-Röhrchen Vacutainer [®] | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| ➤ Pipetten 2-20 µl / 20-200 µl / 200-1000 µl | Eppendorf AG, Hamburg, D |
| ➤ Vortexgerät MS2 Minishaker | IKA, Staufen, Deutschland |
| ➤ Thermomixer Compact | Eppendorf AG, Hamburg, D |

- Zentrifugen Mikro 24-48 R, 30F Hettich Universal, Königs
Wusterhausen, D
- RT-PCR Thermocycler ABI PRISM 7900HT Applied Biosystems, Kalifornien,
USA

Plastikartikel

- Zellkulturschalen 150mm Greiner, Essen, Deutschland
- Reaktionsgefäße 2 ml Eppendorf AG, Hamburg, D
- 96 Well-PCR-Mikrotiterplatten Applied Biosystems, Kalifornien,
USA

3.4 Methoden

3.4.1 Methodenübersicht

3.4.1.1 Validierung der Methodik

Die angewandte Methodik der MethyLight-Reaktion wurde durch zwei verschiedene Versuchsreihen etabliert und die Grenzwerte untersucht. Die Machbarkeit wurde dabei zum einen durch die Analyse der Methylierungsmuster in Mammakarzinom-Zelllinien, zum anderen mittels einer artifiziell methylierten PBL-DNA überprüft.

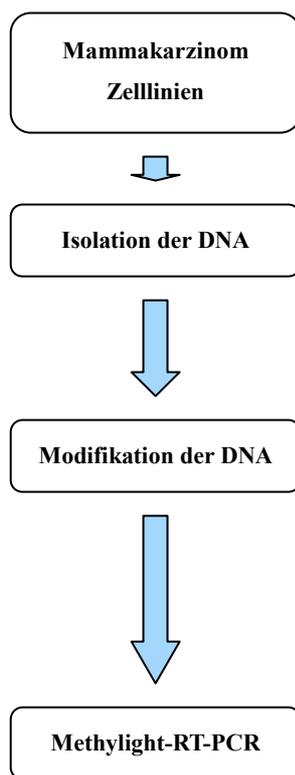


Abb. 9: Validierung mittels Zelllinien

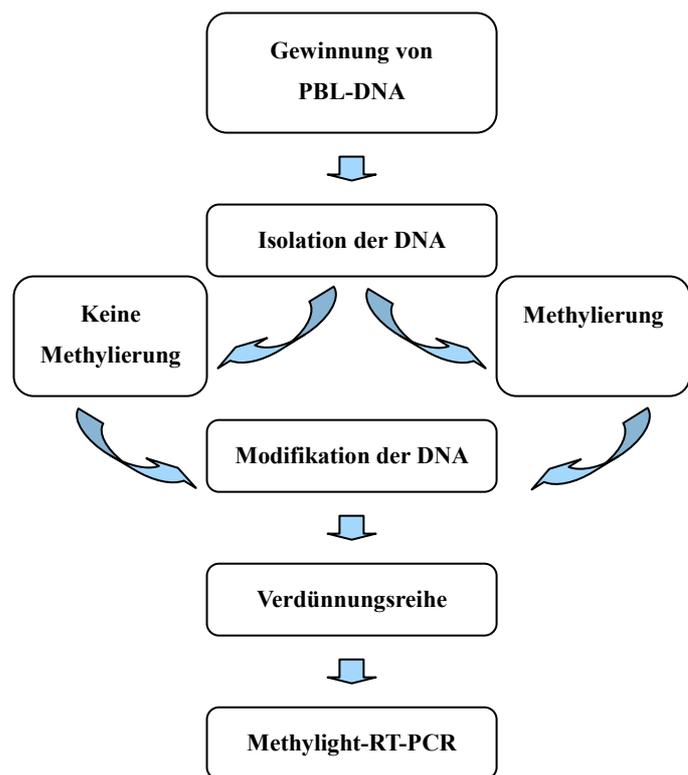


Abb. 10: Validierung mittels artifiziell methylierter DNA

3.4.1.2 Untersuchung der Patienten-DNA

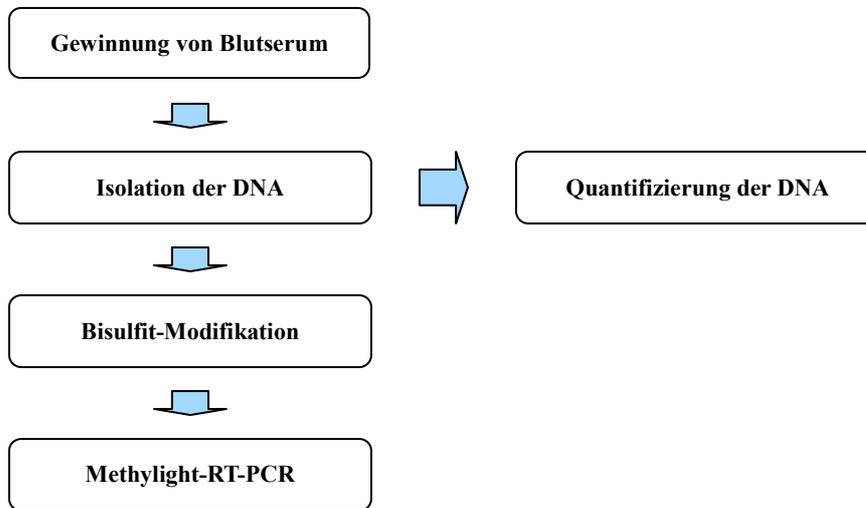


Abb. 11: Untersuchung der Patienten-DNA aus Serum

3.4.2 Anlegen von Zellkulturen

Unter aseptischen Bedingungen wurden Kulturen der Brustkrebszelllinien SK-BR-3, ZR-75-1 und MDA 231 angesetzt. Alle Zellkulturen entstammten der Zellbank der ATCC (American Type Culture Collection). Die Zellkulturen wurden bei 37°C im Brutschrank mit feuchtigkeitsgesättigter Luft und einem CO₂-Anteil von 5% inkubiert. In 150mm Petrischalen aus Kunststoff wuchsen die Zellen in adhärenenten Kulturen auf der Oberfläche eines herkömmlichen Kulturmediums. Dieses setzte sich wie folgt zusammen:

- | | |
|-----------------------------|---|
| • Basismedium | 500 ml MEM-Medium |
| • Serum | 100 ml fötales Kälberserum
(hitzeinaktiviert 30 Min bei 58 °C) |
| • Zusätze (sterilfiltriert) | 5 ml Glutamin
5 ml Antibiotika / Antimykotika |

Die aus den Zelllinien gewonnene DNA wurde durch die Bisulfitreaktion (s.u.) modifiziert.

3.4.3 PBL-DNA

3.4.3.1 Gewinnung von PBL

Einem klinisch unauffälligen Probanden wurden 4 ml Blut in einem EDTA-Röhrchen abgenommen, mit 4 ml PBS verdünnt und einem Ficollkissen überschichtet. Anschließend wurde das EDTA-Blut zwanzig Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Das Blut schichtet sich hierbei in drei Phasen auf. Die Interphase (Buffycoat) mit den peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurde vorsichtig abpipettiert, zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und jeweils bei 500 x g erneut zentrifugiert.

3.4.3.2 Isolierung der PBL-DNA

Die Isolierung der PBL-DNA erfolgte gemäß dem QIAamp DNA Mini Kit-Protokoll (QIAamp DNA Mini Kit, QIAgen, Hilden, Deutschland).

3.4.3.3 Methylierung von PBL-DNA

Die Hälfte der isolierten PBL-DNA wurde durch das Enzym SssI-DNA-Methyltransferase methyliert.

Hierzu wurden 5 µg PBL-DNA in 100 µl Reaktionsansätzen zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend 10 Minuten bei 65°C. Der Reaktionsansatz für die Methylierung setzte sich wie folgt zusammen:

- 88 µl á 57 ng / µl (= 5 µg) PBL-DNA
- 10 µl Puffer NEB 2
- 0,5 µl S-Adenosyl-Methionin (SAM)
- 1,5 µl H₂O
- 2 x 2,5 µl (= 20 U) SssI-Methyltransferase

Die aus Blut gewonnene unmethylierte DNA und die methylierte DNA wurden durch die Bisulfitreaktion (s.u.) modifiziert.

3.4.3.4 Verdünnungsreihe

Zur Bestimmung der Detektionsgrenzen der Methylierung mittels quantitativer RT-PCR wurden aus 16 ng vollständig methylierter PBL-DNA Proben mit einem definierten Mischverhältnis von 1:2 / 1:10 / 1:100 / 1:1000 / 1:10000 / 1:100000 / 0:1 methylierter und nicht methylierter DNA hergestellt.

Anschließend wurden die Gene APC, ESR1, RASSF1 detektiert. Als Kontrollgen diente das Gen ACTB. Es besitzt keine CpG-Inseln und ist somit nicht methylierungsspezifisch. Das ACTB wurde zuvor ebenfalls modifiziert.

3.4.3.5 Modifikation der PBL-DNA

Die artifiziell methylierte PBL-DNA sowie die andere Hälfte unmethylierter PBL-DNA wurden gemäß der in Abschnitt 3.4.6 beschriebenen Bisulfit-Reaktion modifiziert.

3.4.4 Patienten-DNA aus Serum

3.4.4.1 Gewinnung von Blutserum

Zur Gewinnung der Probe wurden spezielle mit einem Gerinnungsaktivator beschichtete Serumröhrchen der Firma Becton Dickinson verwendet. Nach der Entnahme von ca. 9 ml peripher venösen Blutes wurde das Röhrchen vier bis fünfmal geschwenkt. Um eine vollständige Gerinnung des Blutes zu gewährleisten, wurde es frühestens 30 Minuten nach Blutgewinnung 15 Min bei 2000 x g zentrifugiert. Hierbei erfolgte die Trennung des Serums von geronnenen Blutbestandteilen. Das Serum wurde ohne Kontakt zur Zellfraktion mit einer Plastikpipette abgenommen. Bis zur Isolierung von DNA wurden die Serumproben aliquotiert und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

3.4.4.2 Aufreinigung von DNA aus Serumproben

Die Isolierung der DNA aus den Serumproben erfolgte gemäß dem Protokoll zur Isolation von Virus-DNA mit dem UltraSens VirusKit der Firma QIAGEN (QIAamp Virus Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland). Alle Puffer und Reagenzien waren frei von RNase. Der Elutionspuffer enthielt RNase-freies Wasser.

Folgende Vorbereitungen wurden getroffen:

- Den Puffern AB, AW1 und AW2 wurde 96-100 % Ethanol hinzugefügt.
- Der Puffer AB wurde 10 x geschwenkt, um eine vollständige Auflösung des viskösen Puffers zu gewährleisten.
- Carrier-RNA wurde mit 310 µl AVE Puffer vermischt und aufgelöst, sodass eine 1 µg / µl RNA-Lösung entstand. Diese wurde aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Vor Verwendung wurde die Lösung zuvor auf Raumtemperatur erwärmt.
- Der Puffer AR wurde im Wasserbad auf 60°C erwärmt.
- Vor unmittelbarer Benutzung wurden alle Proben auf Raumtemperatur gebracht (15-25°C).
- Alle Zentrifugationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Anschließend wurde bei jeder Probe wie folgt vorgegangen:

1. 1 ml Serum wurde in einem 2 ml Röhrchen zentrifugiert.
2. Mit einer Pipette wurden der Probe 0,8 ml Puffer AC sowie anschließend 5,6 µl Carrier-RNA hinzugefügt.
3. Die Probe wurde dreimal geschwenkt, um eine komplette Vermischung der Carrier-RNA mit der Probe sicherzustellen. Anschließend wurde sie 10 s gevortext.
4. Dann wurde die Probe 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 2400 x g für 3 Minuten.
6. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und verworfen.
7. Dem verbliebenen Pellet wurden 300 µl Puffer AR sowie 20 µl Proteinase K beigesetzt. Die vorherige Erwärmung des Puffers auf 60°C trägt erheblich zur besseren Auflösung des Pellets sowie der Steigerung der Lyse-Aktivität der Proteinkinase K bei.
8. Die Probe wurde bis zur vollständigen Auflösung des Pellets gevortext.
9. Anschließend wurde sie 10 Minuten bei 40°C und maximaler Leistung in einem Thermomixer inkubiert.

10. Nach kurzer Zentrifugation wurde 300 µl Puffer AB hinzugefügt und anschließend gevortext. Es folgte erneut eine kurze Zentrifugation, um die gesamte Flüssigkeit auf dem Boden des Röhrchens zu sammeln.
11. 700 µl des Lysats wurden in ein spezielles 2 ml Röhrchen mit integrierter Spinsäule appliziert. Die darauf folgende Zentrifugation bei 5000 x g diente der Bindung der DNA an die Spinsäule. Abweichend zum Protokoll wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Das Röhrchen mit dem restlichen Filtrat konnte verworfen werden.
12. Die Spinsäule wurde in ein neues 2 ml Röhrchen gesetzt und mit 500 µl Puffer AW1 gewaschen und danach bei 6000 x g eine Minute lang erneut zentrifugiert.
13. Wieder wurde die Spinsäule mit der DNA in ein neues Röhrchen gesetzt und das Filtrat verworfen. Die DNA wurde mit 500 µl Puffer AW2 gewaschen und bei maximaler Leistung (20000 x g) 3 Minuten zentrifugiert.
14. Das Filtrat wurde erneut verworfen und die Spinsäule in ein 1,5 µl Zentrifugenröhrchen gesetzt. Der so gereinigten DNA wurden 65 µl Elutionspuffer AVE hinzugefügt und das Röhrchen 1 Minute bei 6000 x g zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde zur maximalen Gewinnung der DNA mit weiteren 65 µl des Elutionspuffers wiederholt.
15. Die isolierte DNA wurde in Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C konserviert.

3.4.5 Quantifizierung der DNA

Es wurde 1 µl der isolierten genomischen DNA mittels Echtzeit-PCR-Verfahren quantifiziert. Hierzu wurde das TaqMAN RNase P Detektionsreagenz der Firma ABI verwendet. Das RNase P ist ein Einzel-Kopiegen, welches den RNA-Teil des RNase P-Gens kodiert. Somit eignet es sich zur Quantifizierung genomischer DNA-Kopien.

Als Referenz diente eine Verdünnungsreihe humaner genomischer DNA mit definierter Konzentration.

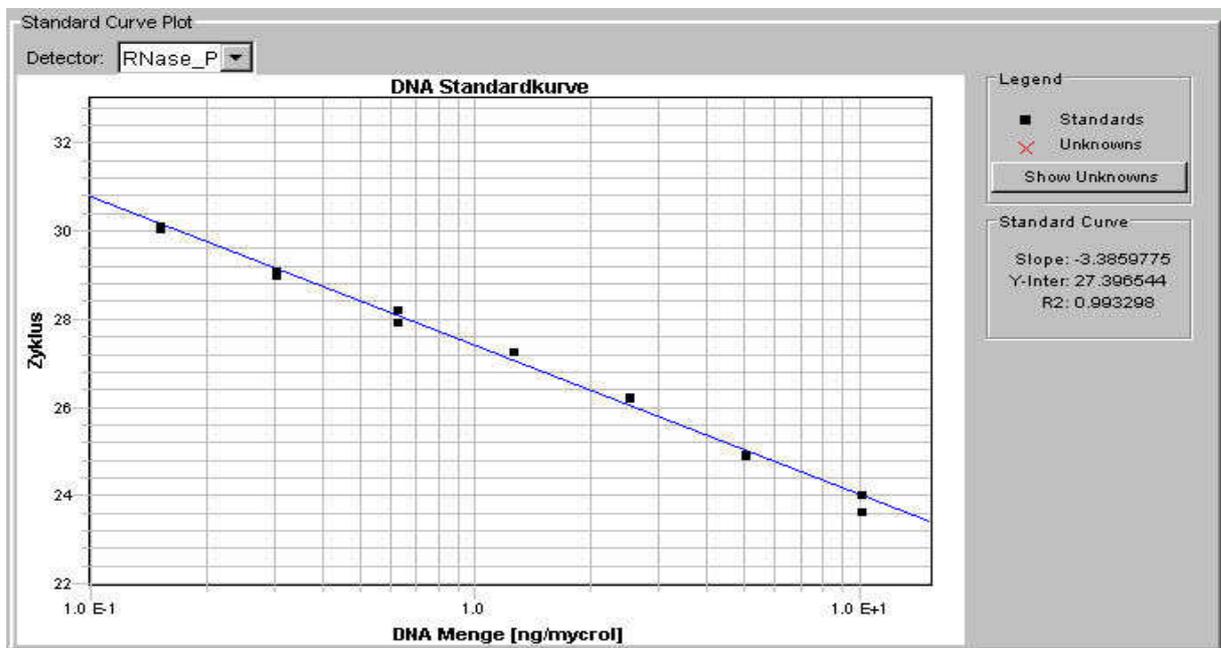


Abb. 12: DNA-Standardkurve

3.4.6 Bisulfit-Modifizierung von DNA

Um in der PCR methyliertes Cytosin von unmethyliertem Cytosin unterscheiden zu können bedient man sich zuvor der Bisulfit-Modifizierung nach Frommer (Frommer et al. 1992). Sie stellt den Goldstandard in der hochauflösenden Detektion von DNA-Methylierungen dar (Dahl und Guldborg 2007). Hierbei wird durch die Desaminierung und Desulfonierung mittels Natrium-Bisulfit selektiv unmethyliertes Cytosin (^uC) in Uracil (U) konvertiert. Das 5-methylierte Cytosin (^mC) hingegen bleibt unverändert bestehen und kann in der darauf

folgenden PCR unverfälscht als ^{5m}C erfasst werden. Unterdessen werden die Uracil-Moleküle als Thymin (T) gelesen.

Da die Umwandlung von ^{14}C zu U nur am Einzelstrang erfolgt, muss die vorherige vollständige Denaturierung der DNA gewährleistet sein.

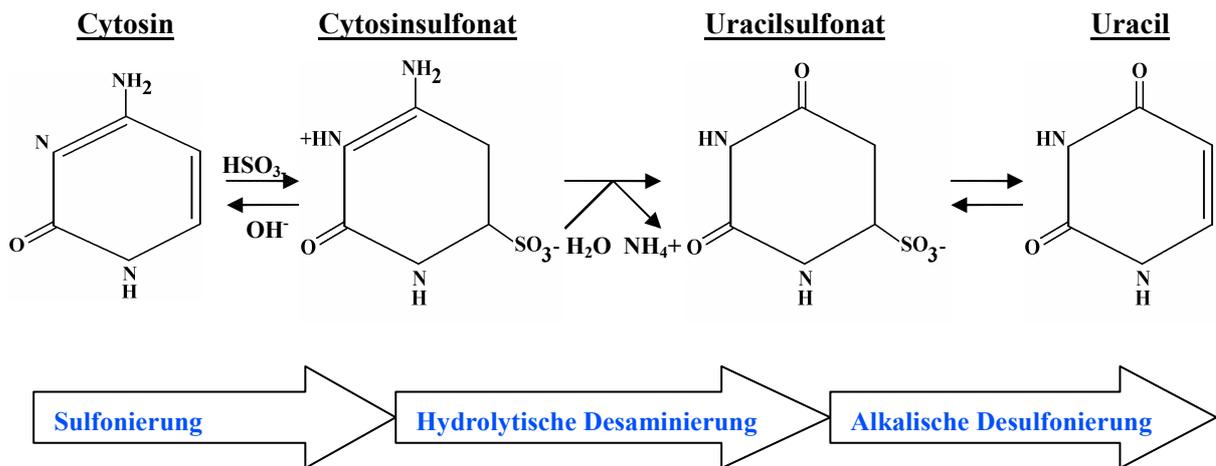


Abb. 13: Bisulfit Modifikation (nach Gratchev 2008)

Die nachfolgenden Schritte zur Bisulfit-Modifikation der DNA basieren auf dem CpGenome™ DNA Modification Kit der Firma CHEMICON International.

Vorbereitung:

- Die Reagenzien I + II wurden bei $-20^{\circ}C$ gelagert und vor Verwendung immer erst auf Raumtemperatur erwärmt.
- Die isolierte DNA wurde auf Raumtemperatur erwärmt.

Vorbereitung Reagenz I:

- 1 g NaOH -Plättchen wurden in 8,3 ml H_2O gelöst, um eine 3 M Natronlauge zu erhalten.
- 900 μ l 100% EtOH, 93,4 μ l H_2O und 6,6 μ l der Natronlauge wurden vermischt.

- 0,227 g der DNA-Modifikations-Reagenz I (DNA-MR I) wurden zu 0,571 ml H₂O hinzugefügt und sukzessive unter Zugabe von ca. 20 µl der Natronlauge bis zu einem pH-Wert von 5 gepuffert. Der pH-Wert wurde mit Indikatorpapier kontrolliert.

Vorbereitung Reagenz II:

- 1 µl β-Mercaptoethanol wurden 20 ml entionisiertem H₂O hinzugefügt. 750 µl dieser Lösung wurde mit 1,35 g der DNA-Modifikations-Reagenz II (DNA-MR II) vermennt.

Denaturierung der DNA:

1. 100 µl isolierter DNA wurden 7,0 µl der 3 M Natronlauge hinzugefügt und vermischt.
2. Es folgte eine 10 Min. Inkubation bei 50°C im Wasserbad.
3. Anschließend wurden 550 µl der Reagenz I beigefügt und die Mischung gevortext.
4. Diese Lösung wurde bei 50°C über Nacht (ca. 16 h) im Thermomixer inkubiert.

Initiale Entsalzung:

1. DNA-Modifikations-Reagenz III (DNA-MR III) wurde gevortext und 10 x in einer 1 ml Pipette vermischt, um alle Verklumpungen zu lösen.
2. 5 µl der DNA-MR III wurden der DNA-Lösung hinzupipettiert.
3. 750 µl der DNA-MR II wurden ebenfalls hinzugefügt.
4. Die Lösung wurde kurz vermischt und dann für 10 Minuten bei RT inkubiert.
5. Anschließend wurde sie für 10 s bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen.
6. Das Pellet mit der DNA wurde durch Vortexen in 1,0 ml 70% EtOH gelöst, nochmals bei 5000 x g 10 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Reinigungsschritt wurde dreimal wiederholt.
7. Abschließend wurde das Probenröhrchen ein viertes Mal bei 10000 x g 2 Min. zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen.

Desulfonierung:

1. Der Probe werden 50 µl 20 mM NaOH / 90% Ethanol-Lösung hinzugefügt und bis zur vollständigen Auflösung gevortext.
2. Es folgte eine Inkubation bei RT für 10 Min.
3. Das Röhrchen wurde bei 5000 x g für 10 s zentrifugiert. Anschließend wurden 1,0 ml 90% EtOH hinzugefügt und nochmals gevortext und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt.
4. Nach dem letzten Reinigungsschritt wurde die Probe bei 10000 x g für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen.
5. Abschließend wurde die Probe 20 Min getrocknet.

Elution:

1. 100 µl TE-Puffer wird hinzugefügt.
2. Zur Elution der DNA wurde die Probe erneut bei 55 °C für 15 Minuten im Thermomixer inkubiert.
3. Anschließend folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 10000 x g für 2 Min. Der Überstand enthielt dann die DNA und wurde sorgfältig abpipettiert und in ein neues Röhrchen gegeben.
4. Die DNA wurde bei – 80 °C aufbewahrt.

Die Bisulfit-Reaktion erlaubt den Einsatz hoher DNA-Mengen in der RT-PCR bei einem Minimum an inhibierenden Bestandteilen.

3.4.7 PCR nach MethyLight

Die Bestimmung der DNA-Methylierung erfolgte in der Polymerasekettenreaktion (PCR) nach MethyLight.

Die Bestimmung der Genexpression wurde auf dem **Thermocycler ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System** von Applied Biosystems durchgeführt. Pro Assay wurden je zwei Oligonukleotidprimer (Forward und Reward) der Firma Eurogentec Deutschland GmbH sowie eine TaqMan®-Sonde mit je einer 6-Fam-Markierung am 5'-Ende als Reporter und einem TAMRA-Quencher-Molekül am 3'-Ende verwendet.

Die genauen Sequenzen sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tab. 6: Verwendete Primersequenzen und Sonde (vgl. Widschwendter et al. 2004)

GEN	Forward Primer Sequenz	Reverse Primer Sequenz	Sonde
ESR1	GGCGTTCGTTTTGGGATTG	GCCGACACGCGAACTCTAA	6FAM- CGATAAAACCGAACGACCCGA CGA-BHQ-1
APC	GAACCAAAAACGCTCCCCAT	TTATATGTCGGTTACGTGCG TTTATAT	6FAM- CCCGTCGAAAACCCGCCGATT A-BHQ-1
RASSF1	ATTGAGTTGCGGGAGTTGG T	ACACGCTCCAACCGAATACG	6FAM- CCCTTCCCAACGCGCCCA- BHQ-1
ACTB	TGGTGATGGAGGAGGTTTA GTAAGT	AACCAATAAAAACCTACTCCT CCCTTAA	6FAM- ACCACCACCAACACACAATA ACAAACACA-BHQ-1
CDKN 2 A	TGGAGTTTTCGGTTGATTG GTT	AACAACGCCCGCACCTCCT	6FAM- ACCCGACCCCGAACCGCG- BHQ-1
GSTP1	GTCGGCGTCGTGATTTAGT ATTG	AAACTACGACGACGAAAC TCCAA	6FAM- AAACCTCGCGACCTCCGAACC TTA TAAAA-BHQ-1

Die Durchführung der PCR erfolgte in 96 Well-PCR-Mikrotiterplatten. Der Ansatz für die PCR enthielt je 25 µl Gesamtvolumen / Probe:

- 12,5 µl TaqMan® 2 -fach-Universal-PCR-Mastermix
- 7,25 µl destilliertes Wasser
- 4 µl isolierte Bisulfit-behandelte Plasma-DNA
- 1,25 µl Primermix (jeweils 20 -fach)

Endkonzentration Sonde = 200 µM

Endkonzentration Primer = 600 µM

Nach einem initialen Aktivierungsschritt der Taq-Polymerase von 10 Min bei 95°C, erfolgten anschließend fünfzig Amplifikationszyklen mit je 15 Sekunden bei 95°C und schließlich 1 Min bei 60°C. Die Durchführung aller PCR-Genanalysen erfolgte mit dreifachen Probenansätzen.

3.4.8 Zirkulierende Tumorzellen

Der Nachweis zirkulierender Tumorzellen (CTCs) wurde im Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität anhand des „AdnaTest Breast Cancer Select&Detect-Potokoll“-Testes von der Firma AdnaGen AG, Langenhagen durchgeführt. Die Detektion basiert primär auf Magnet/Immunelektion mit den tumorassoziierten Antikörpern MUC1 und GA733-2 und anschließender multiplex-PCR (AdnaGen-Verfahren) und anschließender quantitativer Bioanalyser Auswertung der PCR-Resultate.

Die Ergebnisse wurden mir zu statistischen Vergleichszwecken freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.4.9 Statistische Auswertung

Sowohl die deskriptive statistische Auswertung der Patientendaten mittels Häufigkeitsanalysen, als auch alle Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Programm SPSS 12.0 für Windows.

3.4.9.1 Statistische Methoden für DNA-Quantifizierung

Die absoluten Quantifizierungswerte sowie einzelne Mittelwerte der Gesamtzahl der Patientinnen, Erstdiagnosefälle, Rezidivdiagnosen und Kontrollpersonen wurden ermittelt. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte mit dem T-Test bei unabhängigen Stichproben.

3.4.9.1 Methylierungen der Gene

Methylierungen der Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1 und CDKN2 wurden mittels MethyLight wie oben beschrieben detektiert. Hypermethylierungen wurden nur als „positiv“ bewertet, wenn sie in der PCR bei mindestens einem der Dreifachwerte unter einer

Zyklusanzahl von vierzig nachweisbar waren ($Ct < 40$). PCR-Signale, die erst nach vierzig PCR-Zyklen auftraten, wurden als „negativ“ bewertet. Methylierungen, die bei $\geq 2/3$ Proben desselben Gens derselben DNA positiv waren, wurden unabhängig von der Zyklusanzahl als positiv gewertet.

3.4.9.2 Korrelationsanalysen der Hypermethylierungen mit klinischen Daten

Nachgewiesenen Hypermethylierungen der Gene wurden auf Korrelationen zu klinischen Parametern der Patientinnen hin überprüft. Zu den untersuchten Daten gehörten der TNM-Status, das histologische Grading, ER- und PR-Status sowie Her-2/neu- und CA 15-3-Status, die histologische Tumordifferenzierung (duktal oder andere), das Alter der Patientinnen (< 55 J oder ≥ 55 J) und Diagnoseart (Primärtumor oder Rezidivtumor). Die Ermittlung des Her-2/neu-Status erfolgte immunhistochemisch. Der CA 15-3-Status wurde mittels ELISA bestimmt, wobei der Grenzwert bei 31 U/ml lag. Die Bestimmung erfolgte seitens der Firma AdnaGen. Die Resultate wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die jeweiligen Kreuztabellen und Korrelationswerte wurden für alle Gene einzeln analysiert und ihre exakte zweiseitige Signifikanz p nach χ^2 nach Pearson kalkuliert. p -Werte über 0,05 wurden als tendenziell nicht signifikant gewertet. Werte unter 0,05 galten als signifikant bis hoch signifikant ($< 0,01$).

3.4.9.3 Korrelationsanalysen der Hypermethylierungen mit positiven CTC-Befunden

Die Berechnung der Korrelationen von Hypermethylierungen der Gene zu dem Auftreten von CTCs wurde ebenfalls durch zweiseitigen χ^2 nach Pearson errechnet. Die Daten zu den CTC-Befunden wurden vom Institut für Onkologische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

4 Resultate

Es galt in dieser Studie drei Fragen zu klären. Erstens wurde geprüft, in wie weit sich die Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1 und CDKN2 in ihrem Methylierungsgrad zwischen Brustkrebspatienten und gesunden Kontrollpersonen unterschieden. Hierbei sollte das angewandte Testverfahren MethyLight validiert und seine Möglichkeiten und Grenzen bestimmt werden.

Ferner lag der Fokus der Untersuchungen auf der Frage nach gegebenen Korrelationen zwischen Hypermethylierung und klinischen Parametern. Die Resultate sollten Auskunft über die Tauglichkeit einzelner Gene in der Früherkennung, dem Monitoring, der Therapie und der Prognose des Mammakarzinoms geben.

Schließlich wurden Korrelationen zwischen Hypermethylierung einzelner Gene zum Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen ermittelt.

Die DNA von 86 Brustkrebspatientinnen und 23 gesunden Probanden wurde hierzu untersucht.

4.1 Resultate der Validierung

4.1.1 Validierung durch Zelllinien und artifiziell methylierter PBL-DNA

Es wurde mittels MethyLight ermittelt, in wie weit eine Hypermethylierung der Mammakarzinomzelllinien ZR75-1, MDA231, und SKBR3 nachweisbar waren.

APC

Eine Hypermethylierung des APC konnte bei allen Zelllinien außer MDA231 detektiert werden. Die synthetische Methylierung der PBL-DNA wurde ebenfalls durch das MethyLight-Verfahren erfasst.

RASSF1

Die Ergebnisse der PCR für eine Hypermethylierung des RASSF1-Gens waren durchgehend positiv. Die PBL-DNA wurde als durchgehend positiv methyliert identifiziert.

GSTP1

Beim GSTP1 verhielt es sich wie beim APC. Die PBL-DNA und alle Zelllinien bis auf das MDA231 waren positiv.

ESR1

Eine Hypermethylierung des ESR1 Gens konnte ausschließlich bei der PBL-DNA detektiert werden.

Eine Hypermethylierung des CDKN2 wurde bei der Zelllinien ZR75-1 und bei der PBL-DNA nachgewiesen. Die Zelllinien MDA231 und SKBR3 waren negativ.

Tab. 7: Methylierungsnachweis anhand von Zelllinien und SssI-methylierter PBL-DNA.

(Angegeben ist die Anzahl positiver Reaktionen bei dreifach bestimmtem PCR-Ansatz)

	APC	RASSF1	GSTP1	ESR1	CDKN2	ACTB
ZR75-1	3	3	3	0	3	3
MDA231	0	3	0	0	0	3
SKBR3	3	3	3	0	0	3
meth. PBL-DNA	3	3	3	3	3	3

4.1.2 Funktion des MethyLight-Verfahrens

Um die methylierungsspezifische Registrierung der DNA durch das MethyLight-Verfahren zu prüfen, wurde ACTB als nicht methylierungsspezifisches Kontrollgen eingesetzt. Die Ergebnisse aller PCR-Reihen bestätigten die korrekte spezifische Erfassung der DNA-Methylierungen.

4.1.3 Nachweisgrenzen von Methylierungen durch MethyLight

Mit Hilfe der Verdünnungsreihe (s. Kap. 3.4.3.4) konnte definiert werden, ab welcher DNA-Menge eine Methylierung mittels MethyLight nicht mehr sicher identifizierbar ist.

Die eingesetzte DNA-Menge betrug 16 ng. Aufgrund der Resultate aller untersuchter Gene liegt die Nachweisgrenze bei einer Verdünnung von 1:1000. Dies entspricht 16 pg DNA (ca. 2 Zelläquivalente)/Reaktion. Stellvertretend werden die Bilanzen des Gens RASSF1 sowie des Kontrollgens ACTB präsentiert. Es zeigt sich, dass ca. mindestes zwei Zelläquivalente/Reaktion bereits deutliche Ergebnisse liefern. Spezifisch besser interpretierbare Signale liefern aber die höheren Konzentrationen (z.B: 1:100er Verdünnung) entsprechend 20 Zelläquivalenten/Reaktion.

Tab. 5: Ergebnisse der Verdünnungsreihe (= kein spezifisches Signal)*

Verdünnung	1:2	1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000	unmethyliert	
APC	32	34	38	39	44	*	*	Anzahl PCR- Zyklus (Ct-Wert)
ESR1	32	35	37	*	*	*	*	
RASSF1	30	32	35	41	*	*	*	
ACTB	31	31	31	31	31	31	32	

Es wurden jeweils doppelte Probenansätze pro Verdünnungsfaktor analysiert.

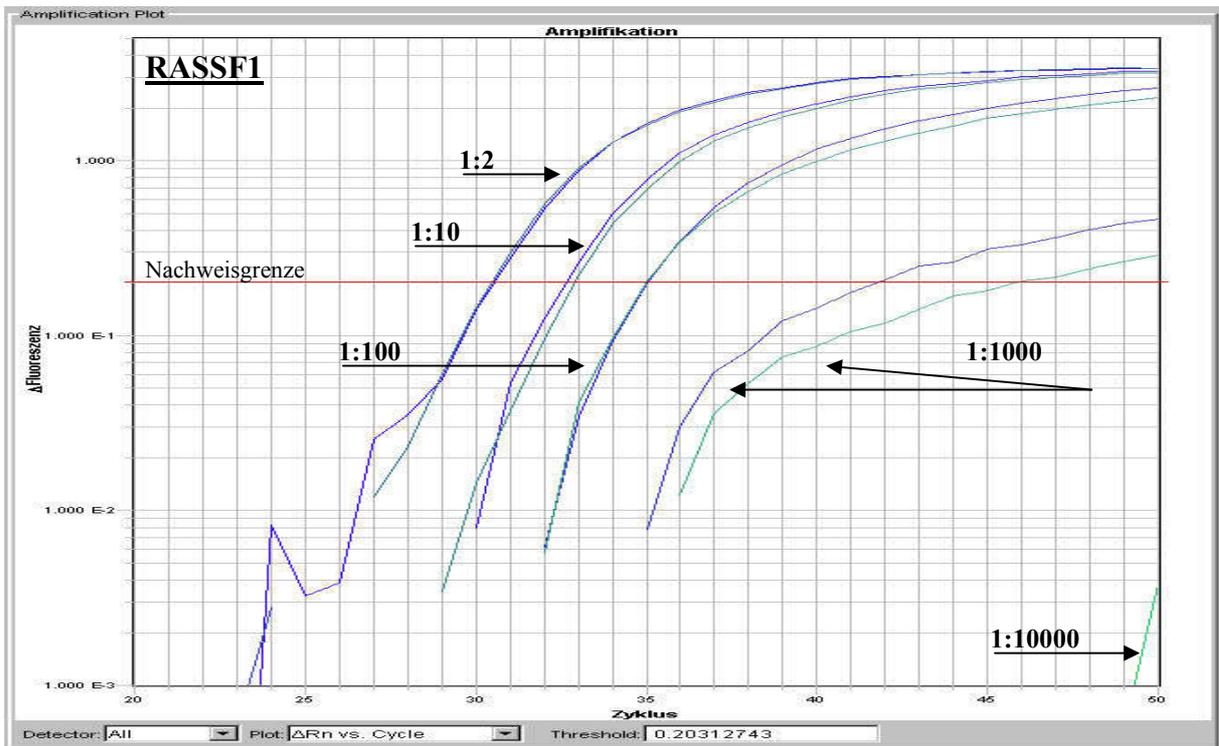


Abb. 14: PCR-Signale der RASSF 1-Sonde bei unterschiedlichem Grad der Verdünnung

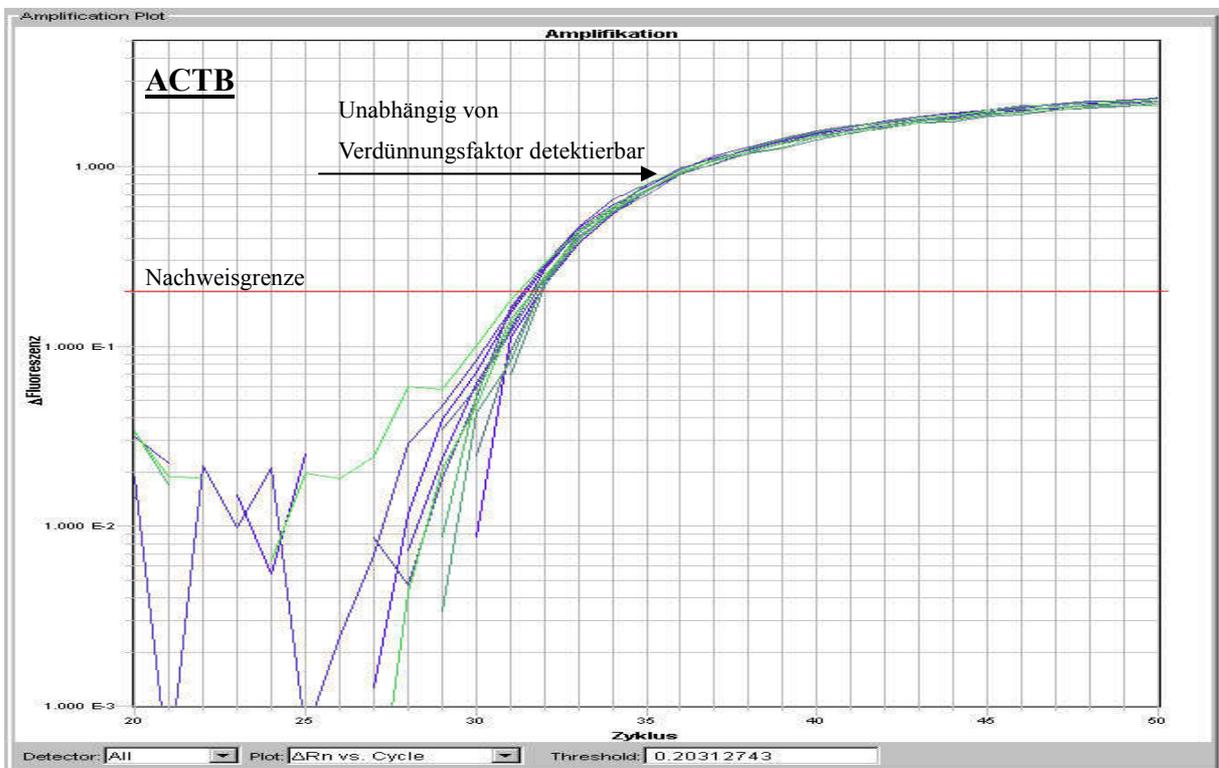


Abb. 15: PCR-Signale der ACTB-Sonde bei unterschiedlichem Grad der Verdünnung

4.2 Tumorspezifische DNA im Serum von Mammakarzinompatientinnen

Mittels PCR wurden die in den Proben enthaltenen DNA-Mengen quantifiziert. In folgender Abbildung sind die Einzelwerte der Quantifizierungs-PCR von Patientenkollektiv und Kontrollgruppe als Streudiagramm dargestellt.

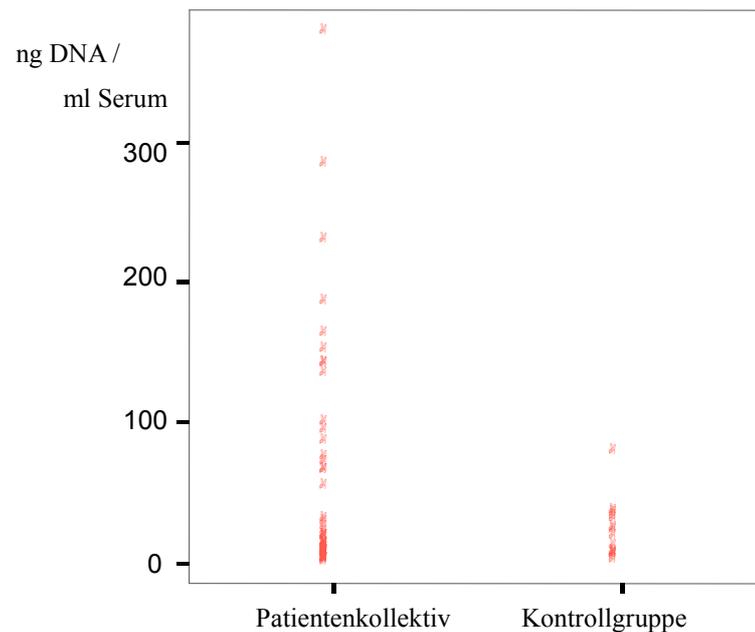


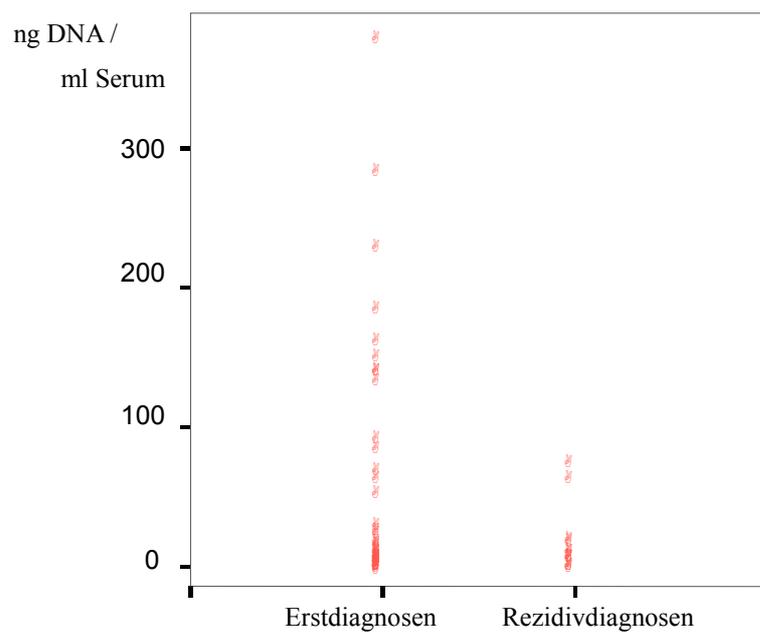
Abb. 16: Streudiagramm Quantifizierungs-PCR von Kontrollgruppe und Patientenkollektiv

Die Vergleichsanalysen der DNA-Mengen zwischen Kontrollpersonen und Mammakarzinompatientinnen zeigten zwar tendenziell erhöhte DNA-Mengen bei den Erkrankten, doch ist dies im Rahmen der Schwankungsbreite nicht signifikant ($p=0,169$).

Tab. 8: Vergleich der Mittelwerte der DNA-Konzentrationen zwischen Patientinnen und Kontrollpersonen

	Patienten (n=56)	Kontrollgruppe (n=15)
Ø (ng/ml Serum)	50,5	22,3
Standardabweichung	77,5	20,3
p	0,169	

Die Quantifizierungsergebnisse der Patientenserum mit Erstdiagnosen im Vergleich zu Rezidivdiagnosen stellen sich wie folgt dar:

**Abb. 17:** Streudiagramm Quantifizierungs-PCR von Erstdiagnosen und Rezidiven

Auch die Analyse der Mittelwerte von Erstdiagnosen und Rezidivfällen zeigt keine signifikanten Unterschiede der ermittelten DNA-Konzentrationen ($p=0,151$).

Tab. 9: Vergleich der Mittelwerte der DNA-Konzentrationen zwischen Erstdiagnosen und Rezidiven

	ED (n=44)	RD (n=12)
ng/ml Serum	57,4	20,9
Standardabweichung	85,6	24,6
p	0,151	

Den Ergebnissen zufolge sind keine signifikant erhöhten DNA-Mengen bei Mammakarzinompatientinnen verglichen mit gesunden Kontrollpersonen nachweisbar. Auch der DNA-Gehalt im Serum von Erstdiagnosepatientinnen unterschied sich nicht signifikant von Rezidivfällen. Weiterhin wurde die DNA-Menge im Serum mit dem Methylierungsgrad der untersuchten Gene, der Präsenz zirkulierender Tumorzellen, dem Rezeptorstatus von ER, PR und ERBB2 sowie der klinischen Parameter pt, pN pM verglichen. Dabei wurde lediglich eine Schwache Relation zum Nodalstatus beobachtet. Ebenso wie in der höheren Altersgruppe wurden hier höhere Mittelwerte beobachtet. Dieser Zusammenhang war jedoch oberhalb der Signifikanzgrenze (T-Test).

4.3 DNA-Methylierungen im Serum von Mammakarzinompatientinnen

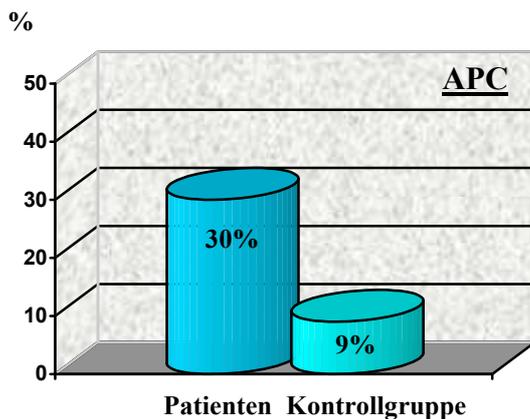
Die DNA-Methylierungen wurden mit Hilfe der MethyLight PCR registriert. Es wurde geprüft, ob Brustkrebspatienten tatsächlich nachweisbare Hypermethylierungen spezifischer Gene aufweisen. Hierzu wurden die Methylierungsmuster der brustkrebsrelevanten Gene ESR1, APC, RASSF1, GSTP1 und CDKN2 bei Mammakarzinompatientinnen und einer unauffälligen Kontrollgruppe (KG) miteinander verglichen.

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass in fast allen untersuchten Genen eine Hypermethylierung bei an Brustkrebs erkrankten Personen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar ist. Als einzige Ausnahme ist das Gen CDKN2 hervorzuheben. Eine Hypermethylierung dieses Gens war wider Erwarten bei keiner Patientin nachweisbar.

4.3.1 APC

Beim APC besteht ein signifikanter Unterschied ($p=0,05$) im Methylierungsmuster der Kontrollpersonen im Vergleich zu den Patientinnen. 30% (25/85) der Brustkrebspatienten weisen eine Hypermethylierung des APC auf, sind also positiv. Bei den Gesunden hingegen sind es nur 9% (2/22).

Tab. 10: Methylierung des APC bei Patienten und KG



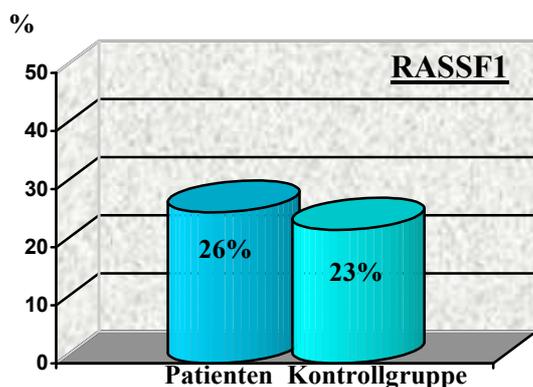
	Patienten	Kontrollgruppe
APC neg	60	20
APC pos	25	2
P	0,050	

Abb. 18: Methylierung des APC bei Patienten und KG

4.3.2 RASSF1

Nicht ganz so offensichtlich ist die Abweichung beim Gen RASSF1. Hier setzen sich die Patienten mit 26% (22/85) positiven Hypermethylierungen nur knapp von der Kontrollgruppe mit 23% (5/22) ab.

Tab. 11: Methylierung des RASSF1 bei Patienten und KG



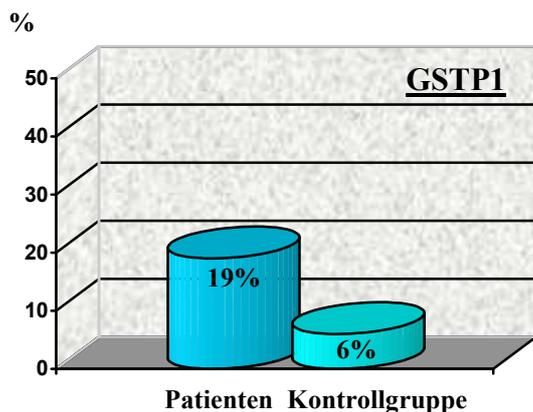
	Patienten	Kontrollgruppe
RASSF1 neg	63	17
RASSF1 pos	22	5
P	0,761	

Abb. 19: Methylierung des RASSF1 bei Patienten und KG

4.3.3 GSTP1

Das GSTP1 weist bei erkrankten Personen ebenfalls eine erhöhte Methylierung auf. Fast 19% (14/76) der Kranken sind positiv, aber nur 6% (1/16) der KG. Der Unterschied ist jedoch nicht wesentlich.

Tab. 12: Methylierung des GSTP1 bei Patienten und KG



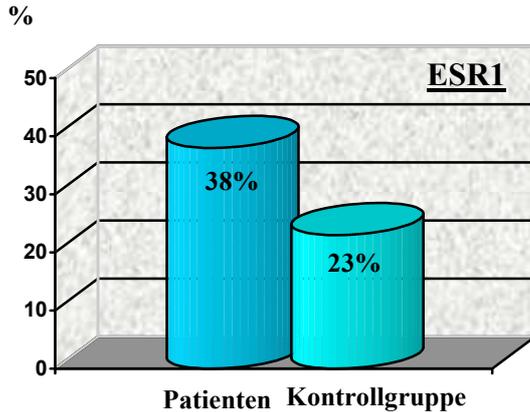
	Patienten	Kontrollgruppe
GSTP1 neg	62	15
GSTP1 pos	14	1
P	0,231	

Abb. 20: Methylierung des GST bei Patienten und KG

4.3.4 ESR1

Die Ergebnisse bestätigen die vermehrte Präsenz von Hypermethylierungen des ESR1 Gens bei Brustkrebspatientinnen im Vergleich zu Gesunden. Bei den Erkrankten wiesen 38% (32/85) erhöhte Methylierungswerte auf, während hingegen der Anteil bei den gesunden Probanden nur knapp 23% (5/22) betrug.

Tab. 13: Methylierung des ESR1 bei Patienten und KG



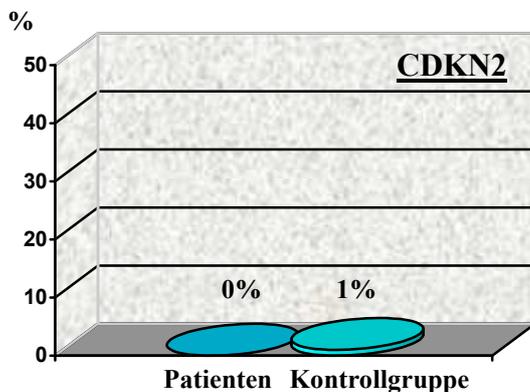
	Patienten	Kontrollgruppe
ESR1 neg	53	17
ESR1 pos	32	5
P	0,190	

Abb. 21: Methylierung des ESR1 bei Patienten und KG

4.3.5 CDKN2

Das Gen CDKN2 stellt einen Sonderfall dar. Bei ausnahmslos allen Mammakarzinompatientinnen war eine Methylierung des Gens nicht nachweisbar. Desgleichen waren, bis auf eine Ausnahme, alle Personen der KG negativ. Eine Hypermethylierung des CDKN2 beim Mammakarzinom konnte in diesem Falle nicht nachgewiesen werden.

Tab. 14: Methylierung des CDKN2 bei Patienten und KG



	Patienten	Kontrollgruppe
CDKN2 neg	25	2
CDKN2 pos	0	1
P	0,003	

Abb. 22: Methylierung des p16 bei Patienten und KG

4.4 Genkombinationen

Studien zufolge existieren prognostische Differenzen je nachdem, ob Methylierungen einzelner oder mehrerer Gene vorhanden sind.

Die schlechteste Prognose weisen Patientinnen mit einer Kombination von methyliertem APC und RASSF1 auf. Eine alleinige Methylierung von APC oder ESR1 sowie die Kombinationen ESR1/APC und ESR1/RASSF1 hingegen gelten als prognostisch weniger signifikant.

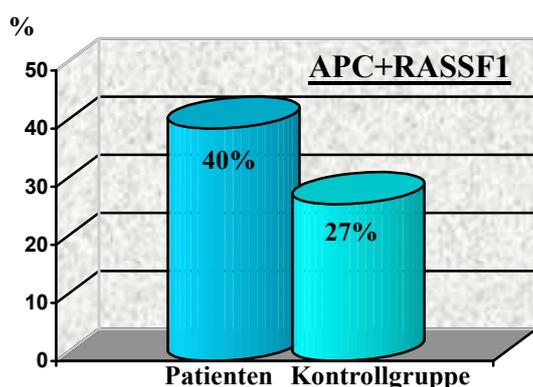
Ferner werden Korrelationen zwischen ESR1 und RASSF1 sowie ESR1 and APC, jedoch eine fehlende Korrelation zwischen RASSF1 und APC, beschrieben (Müller et al. 2003).

4.4.1 Kombination APC+RASSF1

In dieser Studie wiesen etwa 40% (34/85) der Kranken mindestens eine Hypermethylierung bei einem der beiden Gene APC oder RASSF1 oder aber beider Gene gleichzeitig auf. Bei den Gesunden waren es hingegen mit 27% (6/22) nur etwa halb so viele.

Dies bedeutet, dass fast die Hälfte aller Brustkrebspatientinnen eine Hypermethylierung entweder im APC oder im RASSF1 oder aber simultan in beiden Genen zeigt.

Tab. 15: Methylierung von APC oder RASSF1 bei Patienten und KG



	Patienten	Kontrollgruppe
APC+RASSF1 neg	51	16
APC+RASSF1 pos	34	6
P	0,271	

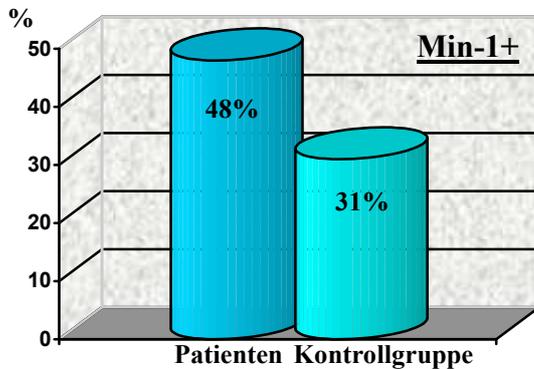
Abb. 23: Methylierung von APC oder RASSF1 bei Patienten und KG

4.4.2 Kombination APC+RASSF1+GSTP1

Eine weitere untersuchte Genkombination besteht aus den Genen APC+RASSF1+GSTP1. Der positive Nachweis mindestens eines methylierten Gens gelingt bei fast der Hälfte aller Patienten (34/51) und nur 31% (5/11) der Kontrollpersonen.

Min-1 steht für mindestens 1 Gen, welches methylierungspositiv im Genkomplex APC/RASSF1/GSTP1 ist. Es konnte ein tendentieller Unterschied festgestellt werden.

Tab. 16: Min-1 bei Patienten und KG

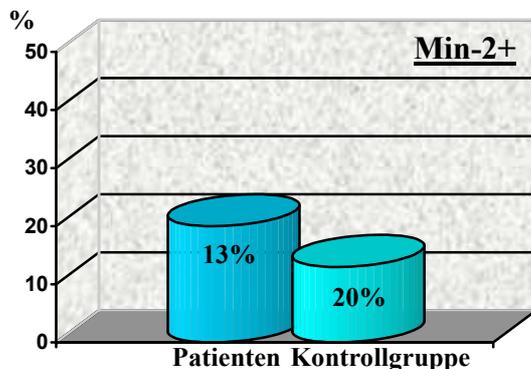


	Patienten	Kontrollgruppe
Min-1-	39	11
Min-1+	36	5
p	0,222	

Abb. 24: Mindestens 1 Gen positiv bei Patienten und KG

Min-2 steht für mindestens 2 Gene, die methylierungspositiv im Genkomplex APC/RASSF1/GSTP1 sind. Hier zeigt sich ebenfalls nur ein tendentieller Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen.

Tab. 17: Min-2 bei Patienten und KG



	Patienten	Kontrollgruppe
Min-2-	60	14
Min-2+	15	2
p	0,485	

Abb. 25: Mindestens 2 Gene positiv bei Patienten und KG

4.5 Korrelation des Methylierungsstatus der vier relevanten Gene

Die in Tabelle 18 dargestellte Kreuztabelle zeigt, dass Zusammenhänge zwischen dem Methylierungsstatus der verschiedenen Genen signifikant $\chi^2 < 0,05$ korrelieren. Dieser Zusammenhang ist wie erwartet am stärksten zwischen APC und RASSF1 ausgeprägt, während GST1 einen zusätzlichen, etwas unabhängigeren Informationsbeitrag liefert.

Tab. 18: Kreuztabelleanalyse der Korrelation des Methylierungsstatus der relevanten Gene.

		APC		RASSF1		GST1	
		neg	pos	neg	pos	neg	pos
ESR1	neg	42	11	44	9	41	7
	pos	18	14	19	13	20	7
		$\chi^2 = 0,024$		$\chi^2 = 0,016$		$\chi^2 = 0,226$	
APC	neg			51	9	44	8
	pos			12	13	17	6
				$\chi^2 = 0,000$		$\chi^2 = 0,024$	
RASSF1	neg					49	7
	pos					12	7
						$\chi^2 = 0,019$	

4.6 Hypermethylierung einzelner Gene und Korrelationen zur Klinik

Klinische Parameter haben eine unterschiedlich hohe Bedeutung in der Diagnosefindung, Therapie und Prognose. Daher ist es von enormer Wichtigkeit, Korrelationen von Methylierungsmustern spezifischer Gene zu den jeweiligen klinischen Parametern aufzudecken und ihre Signifikanz zu überprüfen.

Solche Zusammenhänge von DNA-Hypermethylierungen einzelner Gene mit klinisch-pathologischen Parametern stehen im Zentrum dieser Arbeit.

Zu den experimentellen Parametern gehörten die Tumorgöße, der LK-Befall, der Metastasierungsstand, das histologische Grading, der ER-Status, der PR-Status, der Her-2/neu-Status, der CA 15-3-Status, die histologische Tumordifferenzierung, das Alter und die Frage, ob es sich um Patienten mit Primärtumor oder Rezidivtumor handelt.

4.6.1 Korrelationen mit klinischen Parametern

4.6.1.1 Korrelationen zur Tumorgöße (X² linearer Zusammenhang)

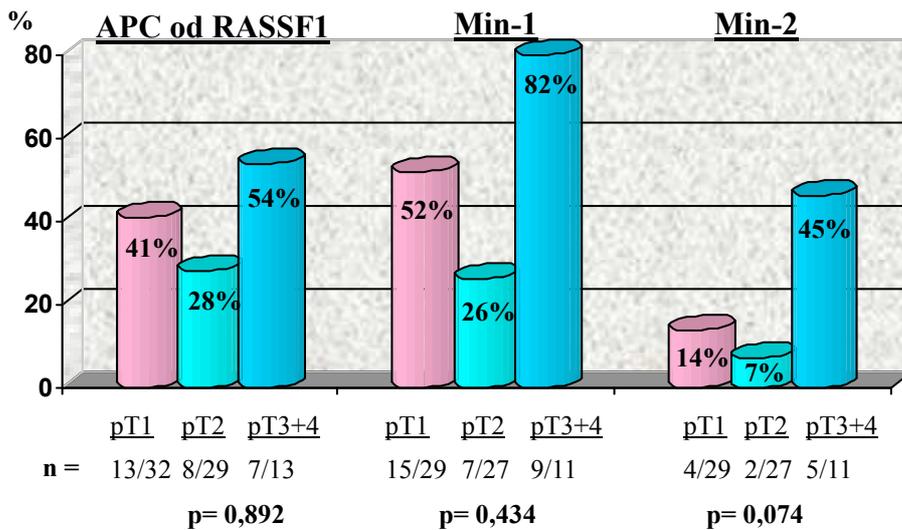
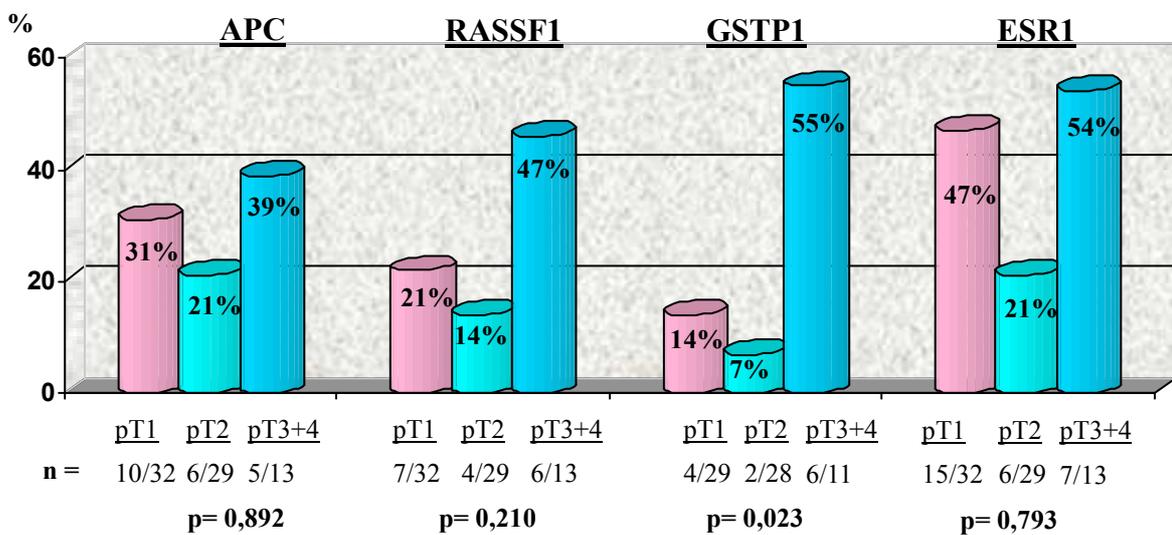


Abb. 26: Korrelationen der Methylierung zur Tumorgöße

Bei der Untersuchung wurden die T-Klassen in drei Kategorien unterteilt: pT1, pT2, pT3+4. Zwischen den Tumoren der Größe pT1 und pT2 lässt sich bei fast allen Genen außer GSTP1 ($p=0,023$) keine eindeutige Differenzierung durch den Methylierungsstatus darstellen. Erst die fortgeschritteneren Tumore der Größe pT3+4 weisen häufiger einen erhöhten Methylierungsstatus auf. Vergleicht man die beiden Klassen T1+T2 vs. T3+T4 so werden verstärkte Zusammenhänge erkennbar, die bei RASSF1 ($p=0,029$), GSTP1 ($p=0,000$), Min-1 ($p=0,010$) und Min-2 ($p=0,004$) die Signifikanzgrenze erreichen.

4.5.1.2 Korrelationen zum Lymphknotenbefall

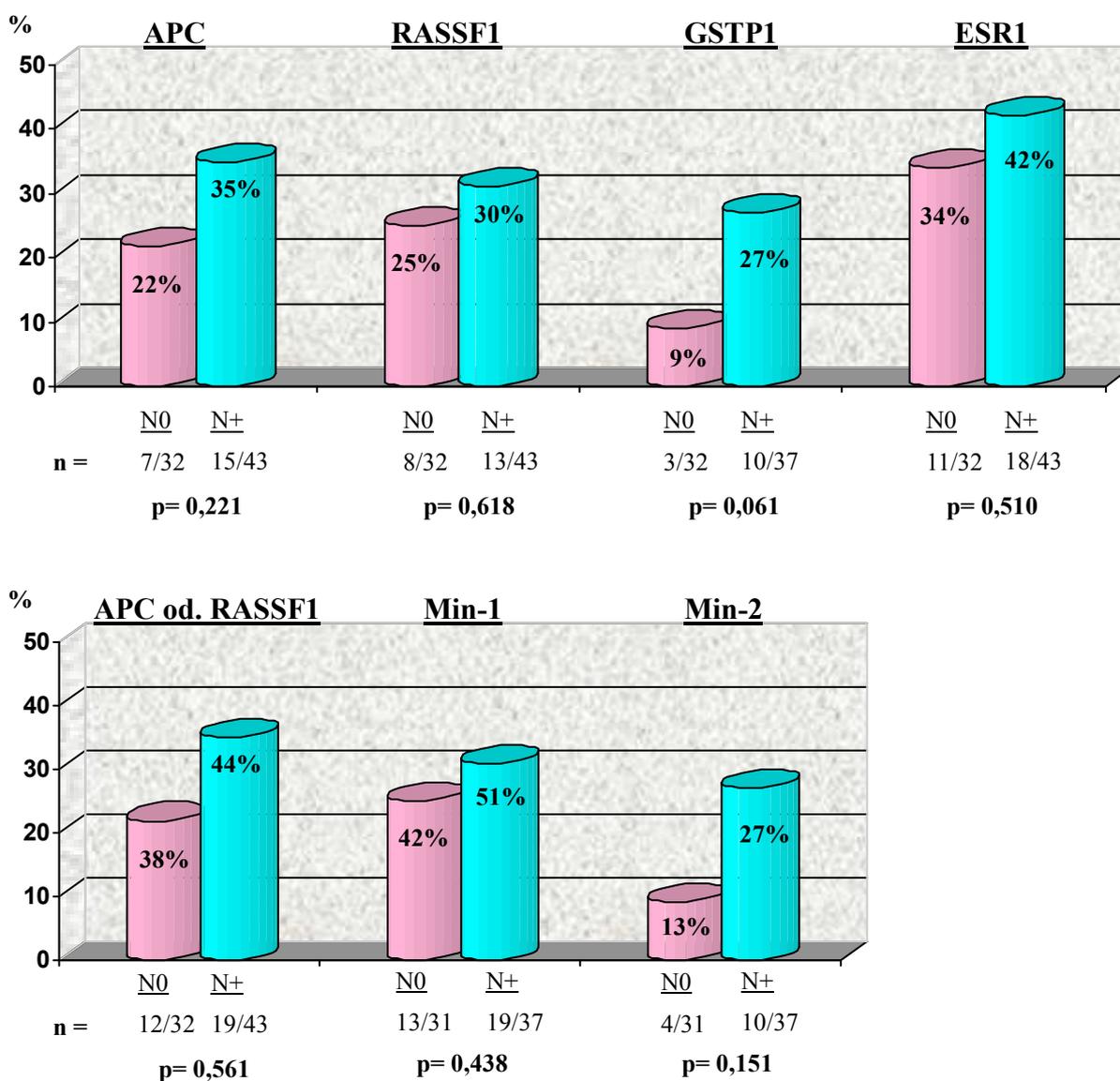


Abb. 27: Korrelation der Methylierung zum Lymphknotenbefall

Patienten ohne jeglichen Nodalbefall gelten als negativ. Patienten mit befallenen LK-Stationen gelten als positiv. Zwischen Methylierungsstatus und Lymphknotenbefall wurden insgesamt überraschend wenige Übereinstimmungen gefunden. Die Signifikanzwerte von APC ($p=0,221$), RASSF1 ($p=0,618$), ESR1 ($p=0,510$) sind unspektakulär.

Lediglich das GSTP1 wies mit einem $p=0,061$ einen eher signifikanten Wert auf.

4.5.1.3 Korrelationen zum Metastasierungsstatus

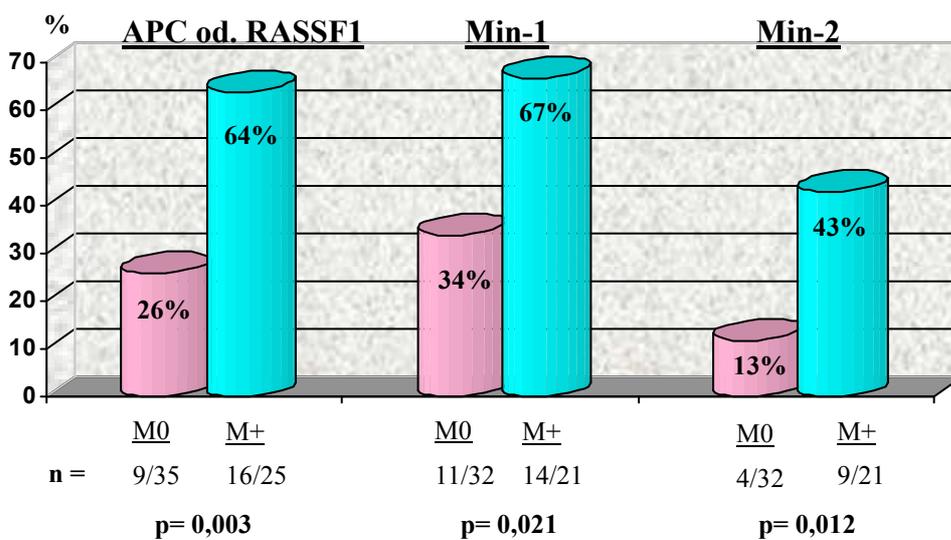
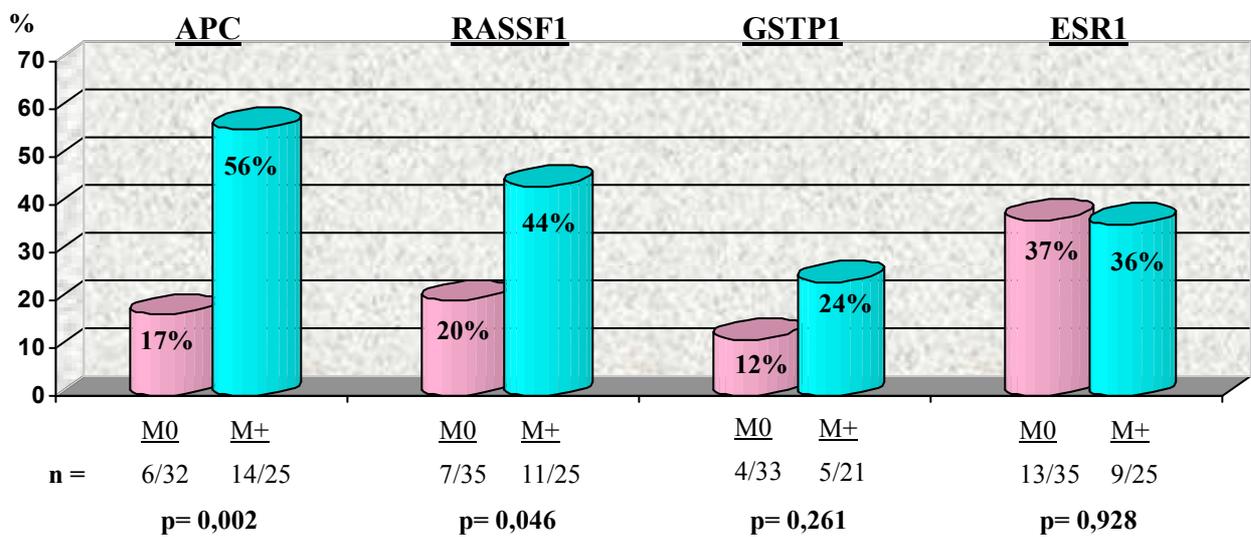


Abb. 28: Korrelation der Methylierungsmuster zum Metastasierungsstatus

Patienten ohne Metastasierung werden als negativ gewertet. Patienten mit vorhandenen Metastasen sind positiv. Die Werte für GSTP1 ($p= 0,261$) und ESR1 ($p= 0,928$) deuten auf keine Korrelation hin. Die Gene APC ($p= 0,002$) und RASSF1 ($p= 0,046$) sowie die dargestellten Genkombinationen hingegen weisen eine hoch markante Korrelation zum Metastasierungsstatus auf.

4.5.1.4 Korrelationen zum Grading (χ^2 bei linearem Zusammenhang)

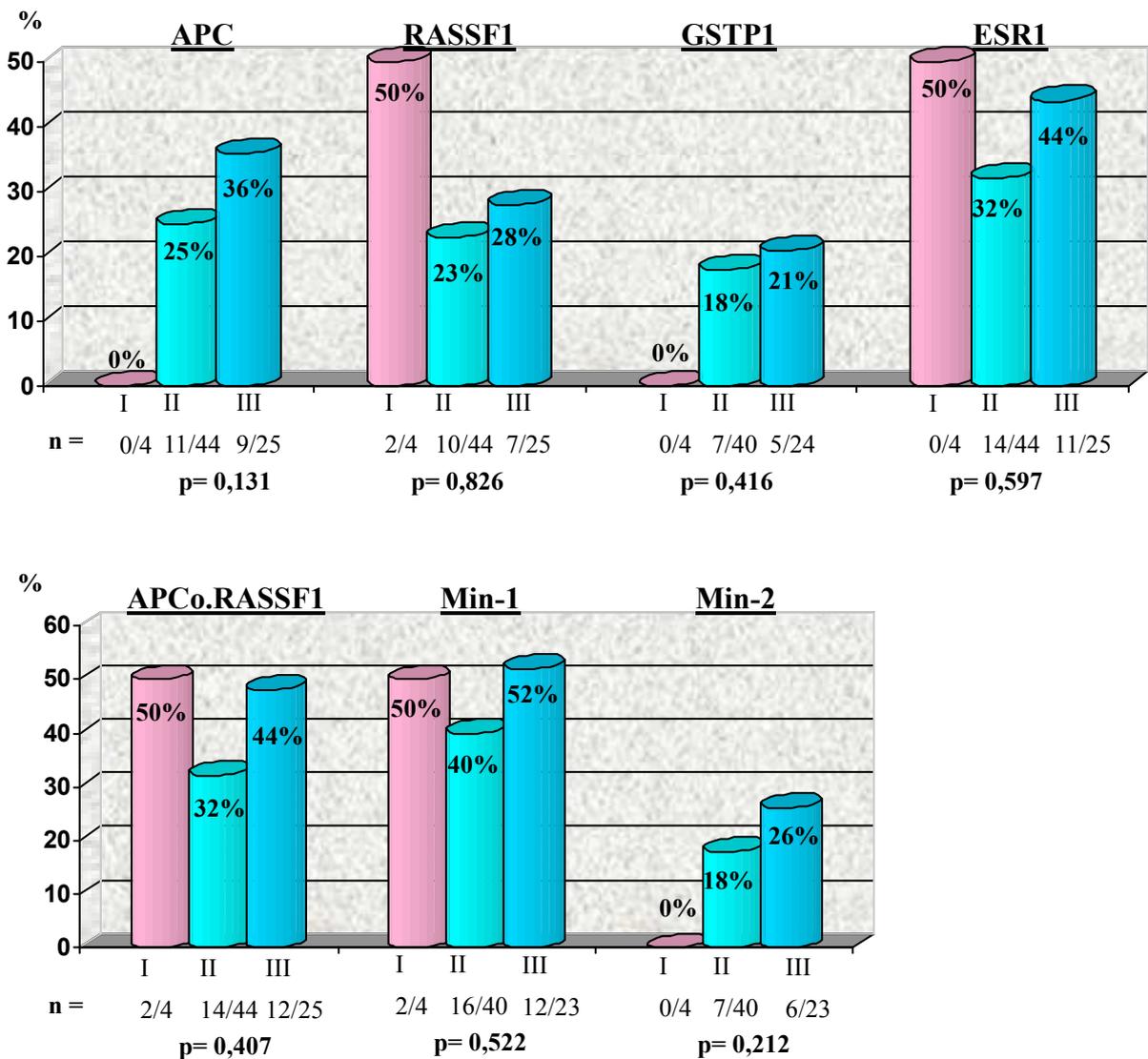


Abb. 29: Korrelation der Methylierungsmuster zum Grading

Beim Grading erfolgte die Unterteilung der Patienten in Grad I, II und III.

Keinem der untersuchten Gene konnte eine wichtige unmittelbare Korrelation zum histologischen Grad des Tumors nachgewiesen werden. Eine Signifikanz von APC, RASSF1, GSTP1 und ESR1 ist den Ergebnissen zufolge nicht gegeben.

4.5.1.5 Korrelationen zum AJCC-Index (*American Joint Committee on Cancer*)

(χ^2 Wert bei linearem Zusammenhang)

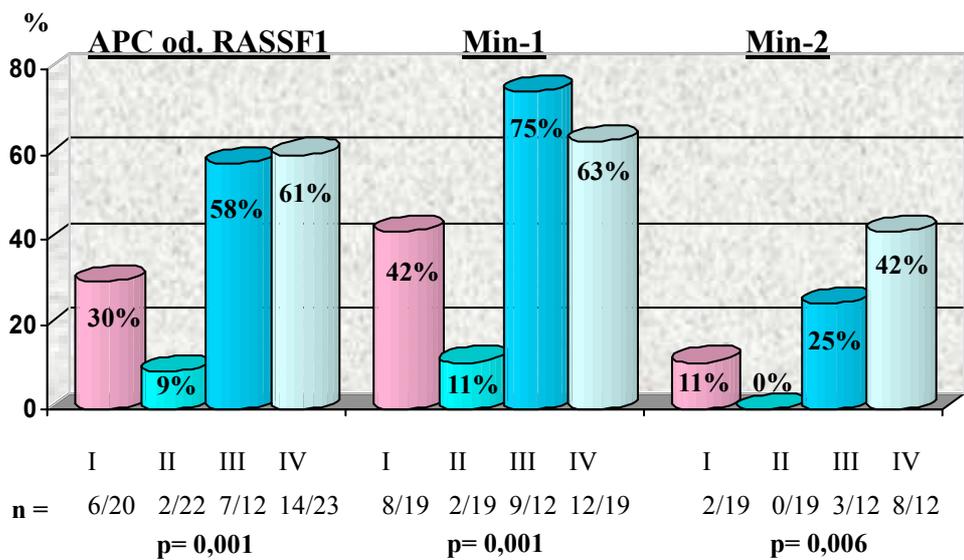
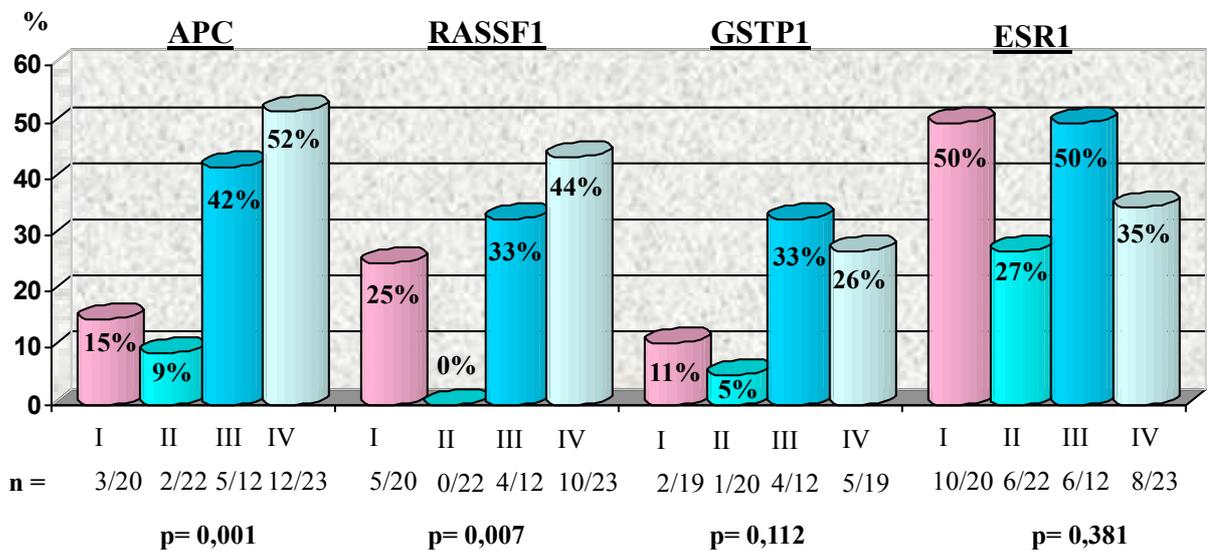


Abb. 30: Korrelation der Methylierungsmuster zum Grading

Als klinischer Parameter, der eine Fusionsgröße zwischen Nodalstatus, Tumorgöße und Metastasierungsgrad darstellt zeigt der AJCC-Status deutliche Zusammenhänge zum Methylierungsstatus, welche sich teilweise auch in der linearen Korrelation gut darstellen lassen. Lediglich der Methylierungsgrad des ESR1 weist keine signifikante Korrelation zum ACJJ Status auf.

4.5.1.6 Korrelationen zum ER-Status

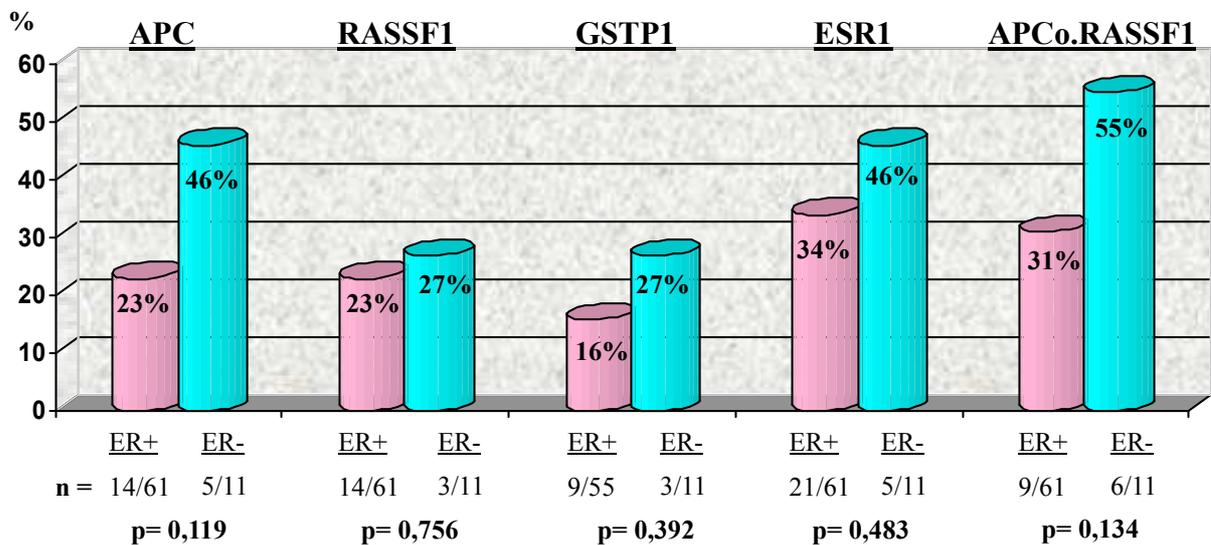


Abb. 31: Korrelation der Methylierungsmuster zum Östrogenrezeptorstatus

Es wurde unterschieden in ER-positive und ER-negative Patienten. Zum ER-Status war bei keinem der Gene eine offensichtliche Korrelation erkennbar. Die Resultate für APC ($p=0,119$), RASSF1 ($p=0,756$), GST ($p=0,396$) und ERS1 ($p=0,483$) deuten auf keine Wechselbeziehung hin. Auch die Genkombinationen Min-1 und Min-2 waren ähnlich wie APCo.RASSF1 ohne Beziehung zum ER-Status.

4.5.1.7 Korrelationen zum PR-Status

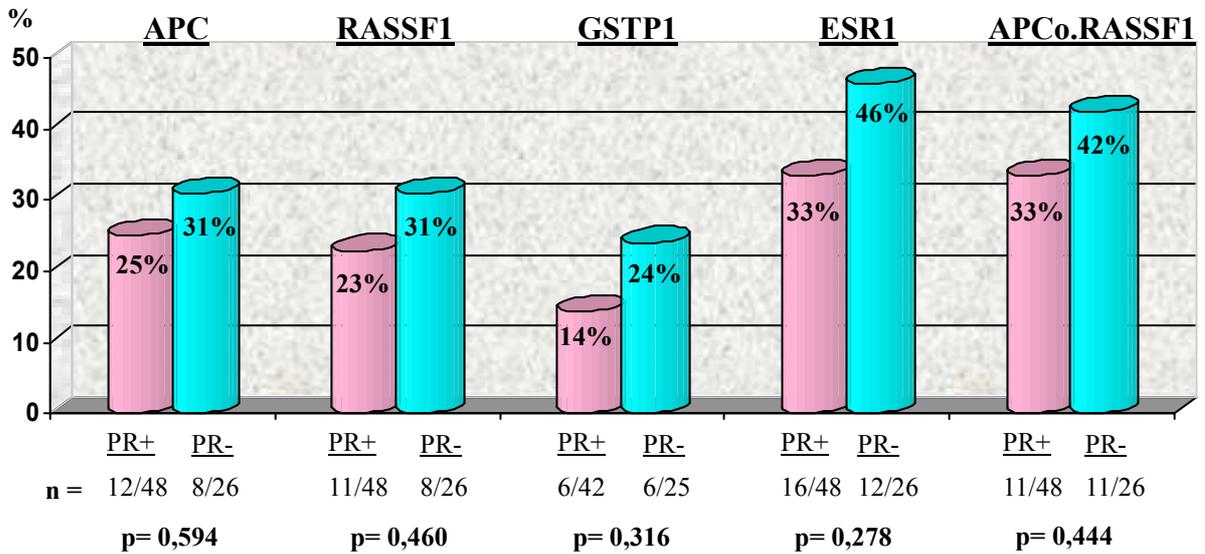


Abb. 32: Korrelation der Methylierungsmuster zum Progesteronrezeptorstatus

Auch beim PR-Status konnte bei keinem Gen eine aussagekräftige Wechselbeziehung zum Methylierungsstatus der DNA festgestellt werden. Die Signifikanzwerte von APC ($p= 0,594$), RASSF1 ($p= 0,460$), GSTP1 ($p= 0,316$) und ESR1 ($p= 0,278$) deuten auf keine Wechselbeziehung hin. Auch die Genkombinationen Min-1 und Min-2 waren ähnlich wie APCo.RASSF1 ohne Beziehung zum PR-Status.

4.5.1.8 Korrelationen zum HER-2/neu-Status

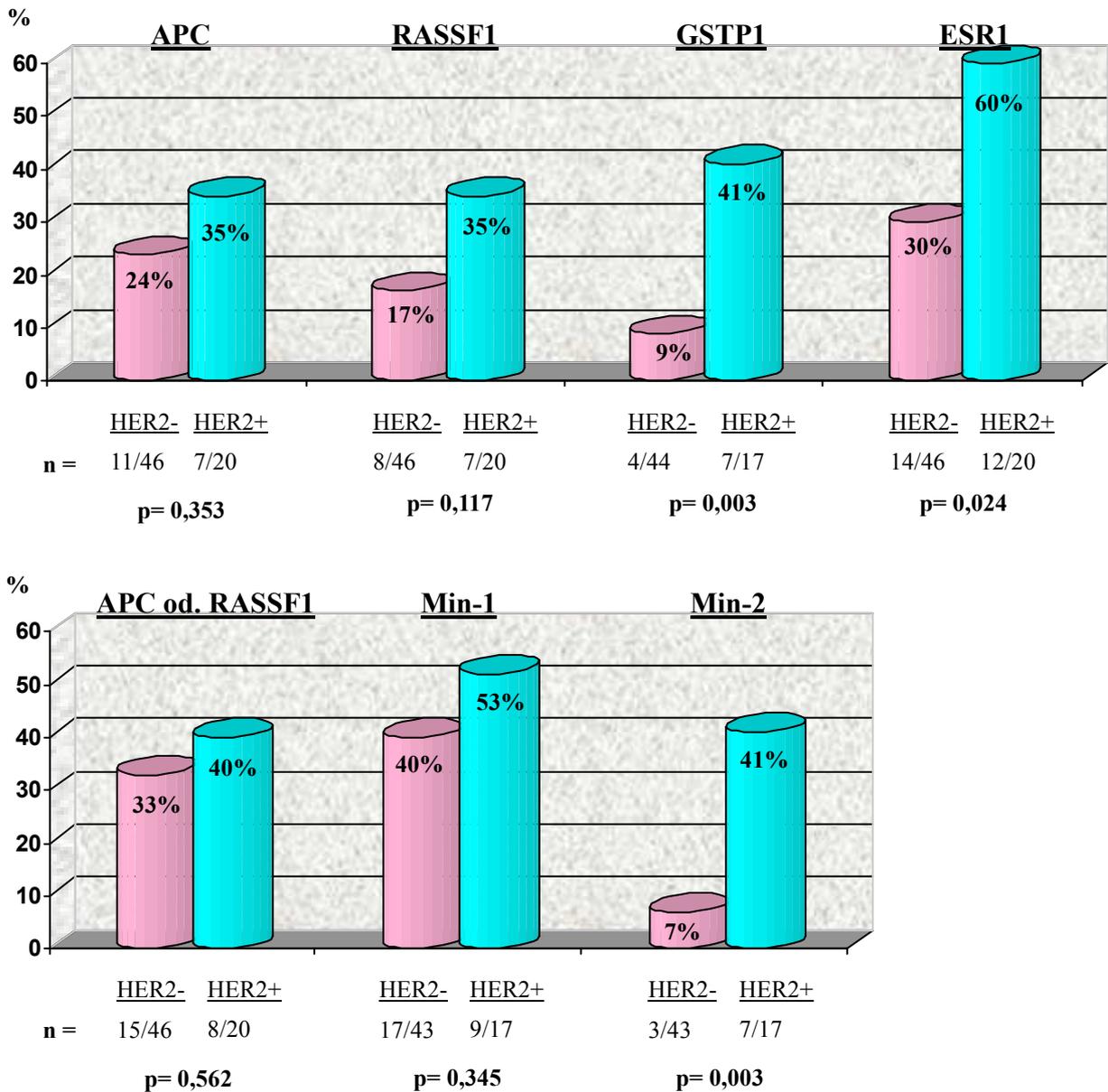


Abb. 33: Korrelation der Methylierungsmuster zum Her-2/neu-Status

Den Genen APC ($p= 0,353$) und RASSF1 ($p= 0,117$) konnten keine signifikanten Korrelationen zum Her-2/neu-Status der Patienten nachgewiesen werden.

Das Gegenteil ist beim GSTP1 und ESR1 der Fall. Die Resultate der vorliegenden Studie bekräftigen eine hochsignifikante Korrelation der Gene GSTP1 ($p= 0,003$) und ESR1 ($p=$

0,024) zum Her-2/neu-Status von Brustkrebspatienten. Auch die stringentere Genkombination Min-2 ist deutlich häufiger bei den prognostisch ungünstigeren Her2+ Tumoren positiv. Der Zusammenhang mit den aggressiveren Her2+ Tumoren ist hier signifikant.

4.5.1.9 Korrelationen zum CA 15-3 Status

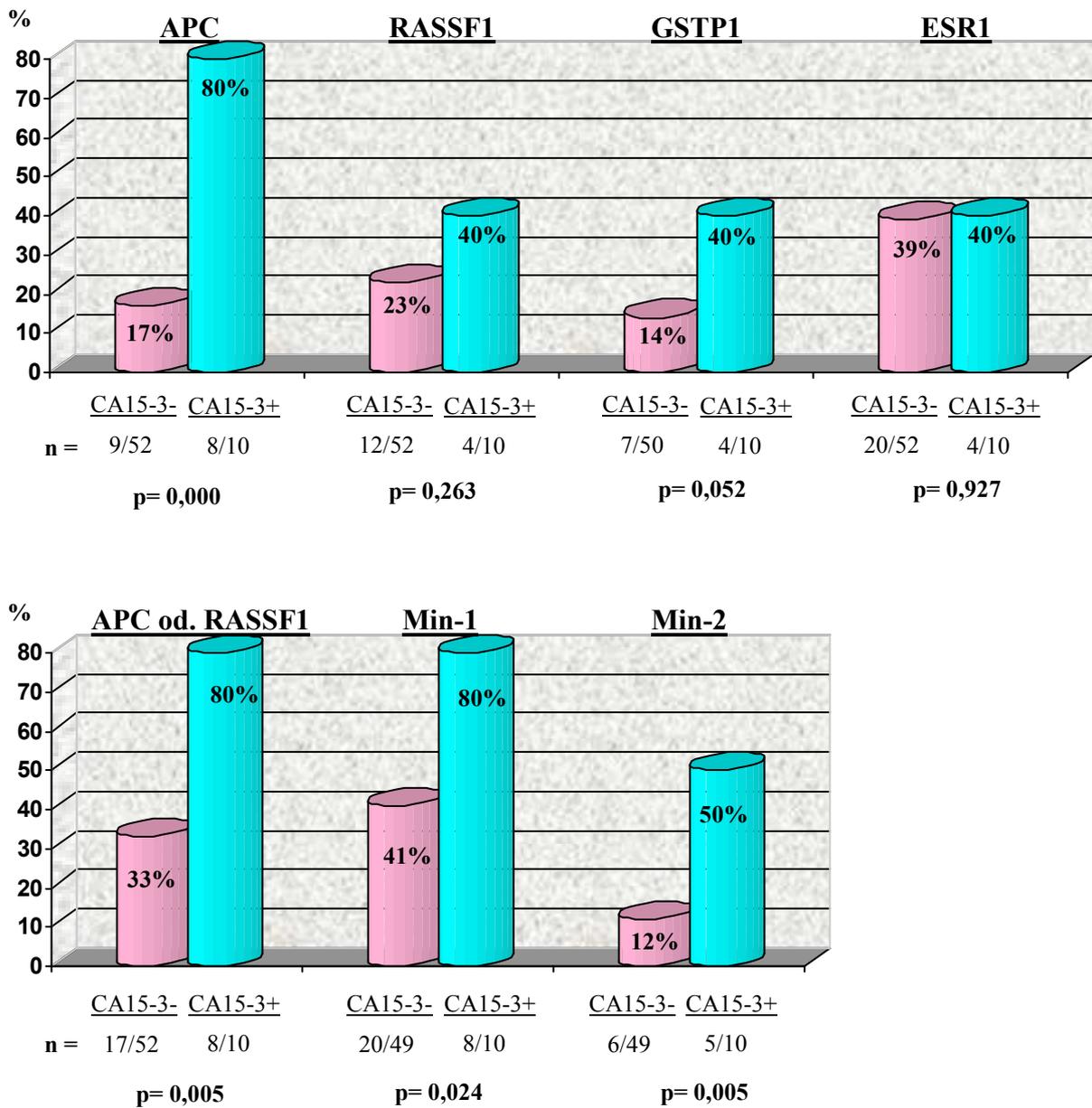


Abb. 34: Korrelation der Methylierungsmuster zum CA 15 – 3 Status

Keine Korrelation zwischen CA 15-3 und Hypermethylierung lässt sich bei den Genen RASSF1 ($p=0,263$) und ESR1 ($p=0,927$) aufzeigen. Der Signifikanzwert für das GSTP1 ($p=0,052$) ist wiederum als eher bedeutsam zu werten. Noch eindrucksvoller präsentiert sich aber das Gen APC mit einem Signifikanzwert von $p=0,000$. Die Korrelation zu des Methylierungsstatus des APC-Gens zum Ca 15-3-Status lässt sich nicht ignorieren. Insgesamt ist CA 15-3 der Parameter, der am deutlichsten mit dem Methylierungsstatus verknüpft ist.

4.5.1.10 Korrelationen zur histologischen Tumorart

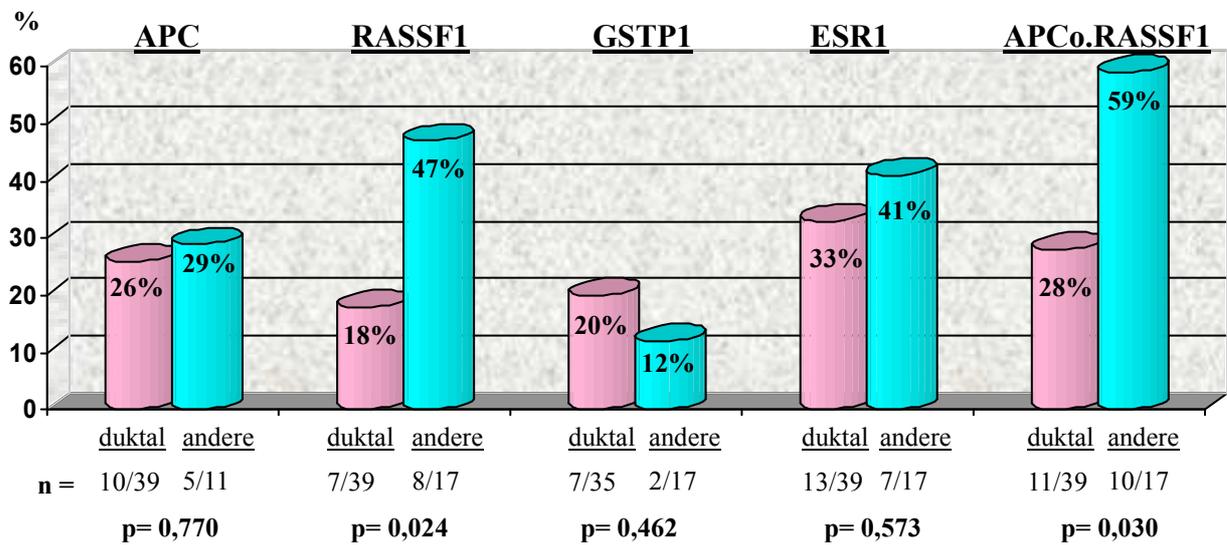


Abb. 35: Korrelation der Methylierungsmuster zur histologischen Tumorart

Es wurde überprüft, ob Korrelationen zu der histologischen Differenzierung des Tumors bestehen. Die Unterscheidung erfolgte zwischen duktalem Mammakarzinom und anderen Arten von Brustkrebs (u.a. muzinöses und lobuläres Mamma-CA).

Während die Werte für APC ($p=0,770$), GSTP1 ($p=0,462$) und ESR1 ($p=0,573$) auf keine Korrelation deuten, weist das RASSF 1-Gen hier mit einem Signifikanzwert von $p=0,024$ eine deutlich messbare Übereinstimmung auf. Die Kombination des RASSF1 mit weiteren Genen führt zu keiner Verbesserung der Signifikanz.

4.5.1.11 Korrelationen zum Alter

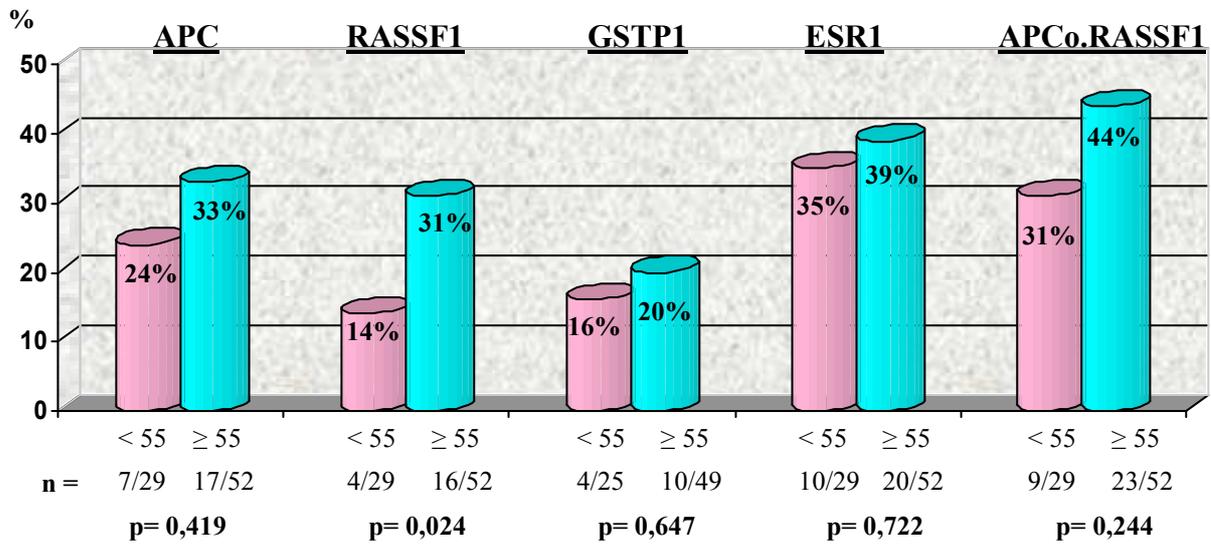


Abb. 36: Korrelation der Methylierungsmuster zum Alter

Müller et al. zufolge weisen ältere Patientinnen häufiger eine Methylierung von RASFE1 auf, während Methylierungen von APC und ESR1 altersunabhängig zu finden sind. Unsere Ergebnisse konnten diese Differenz bestätigen.

Die Patienten wurden gemäß ihrem Alter in zwei Gruppen gegliedert. Die Grenze wurde bei fünfundfünfzig Jahren gezogen.

4.5.1.12 Korrelationen zur Diagnoseart

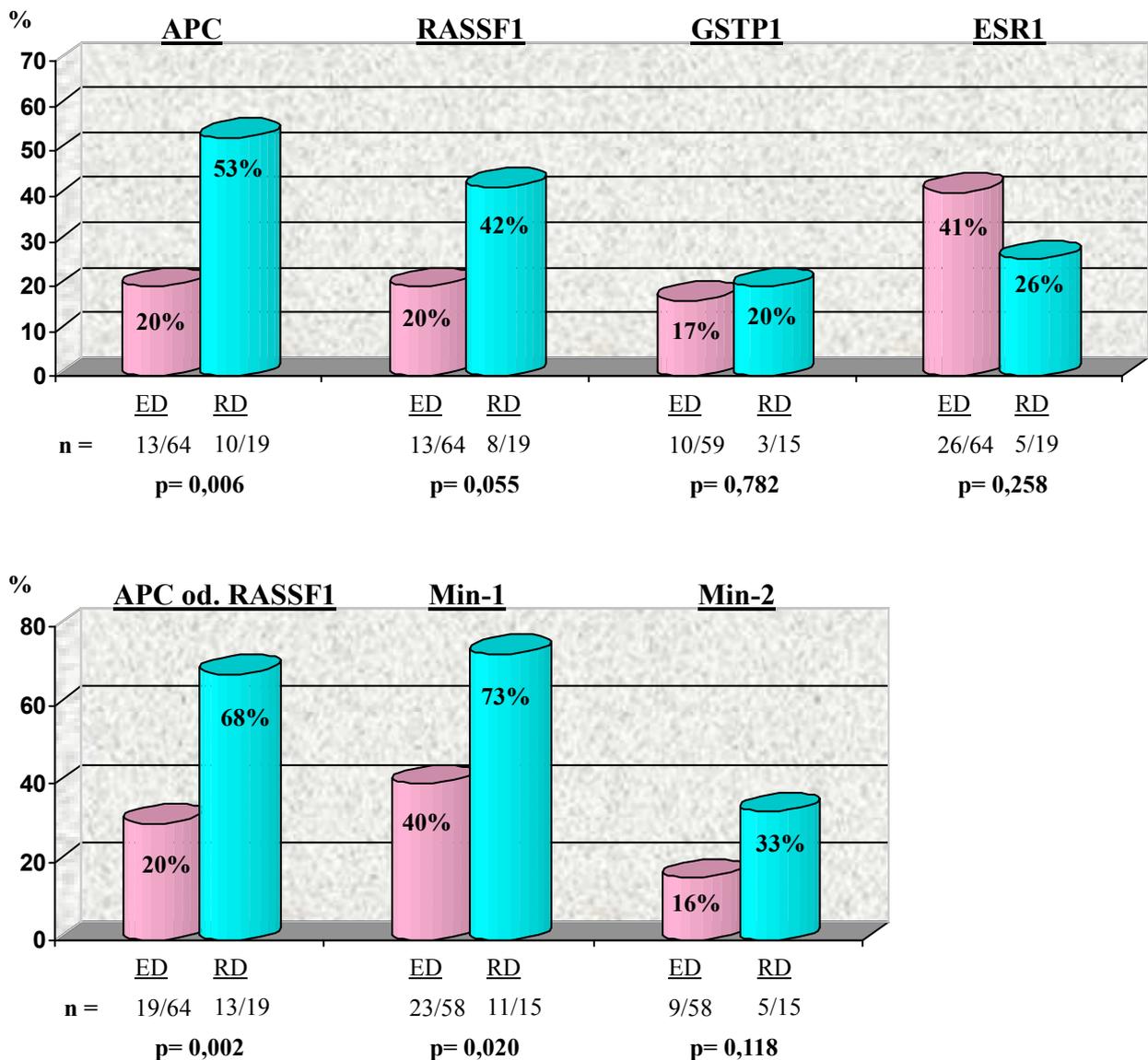


Abb. 37: Korrelation der Methylierungsmuster zur Diagnoseart (Primärtumor (ED) / Rezidiv (RD))

Anders verhält es sich bei der Unterscheidung zwischen Primärtumoren und Patienten mit einem Rezidivtumor. Die Ergebnisse für GSTP1 ($p = 0,782$) und ESR1 ($p = 0,258$) lassen auf keine vorhandenen Korrelationen schließen. Das RASSF 1A Gen $p = 0,055$ und insbesondere die Methylierung des APC-Gens offenbart mit einem Wert von $p = 0,006$ einen sehr signifikant zu wertende Beitrag. Auch die Genkombinationen, welche APC und RASSF1 als Komponenten enthalten sind in der rezidierten Situation häufiger methylierungspositiv eingestuft.

4.6 Zirkulierende Tumorzellen und Hypermethylierung einzelner Gene

Wenn man die Hypermethylierung einzelner Gene mit den positiven Befunden der zirkulierenden Tumorzellen (CTC) vergleicht, ergeben sich teilweise signifikante Korrelationen.

Als CTC+ wurde eine Probe gewertet, falls mindestens GA733.2 oder MUC-1 im Test von Adnagen positiv waren. Die PCR-Produkte der Einzelgene wurden auf einem BioAnalyzer untersucht und ein Grenzwert von mindestens 0,1ng DNA (Peakfläche) für positive Proben festgelegt. CTC- wurden diejenigen Fälle gewertet, die sowohl GA733.2 als auch MUC-1 negativ waren.

4.6.1 Korrelation des APC mit zirkulierenden Tumorzellen

Es bestand eine deutliche Korrelation zwischen einer Hypermethylierung des APC mit dem Vorhandensein von CTCs. 58% der APC-positiven Patientinnen wiesen auch zirkulierende Tumorzellen im Blut auf. Der Signifikanzfaktor betrug $p = 0,013$.

Tab. 19: Korrelation des APC mit CTCs

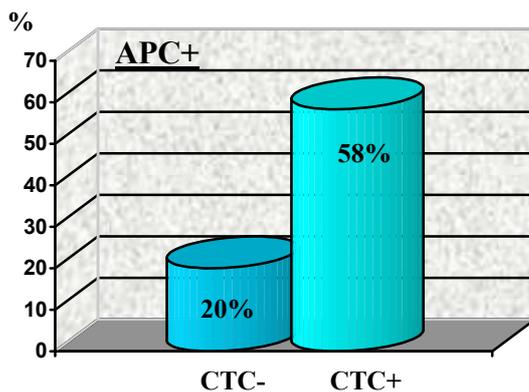


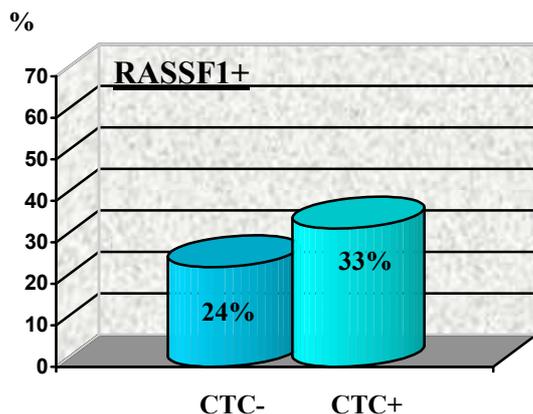
Abb. 38: Korrelation des APC mit CTCs

	CTC-	CTC+
APC-	40	5
APC+	10	7
P	0,013	

4.6.2 Korrelation des RASSF1 mit zirkulierenden Tumorzellen

Im Gegensatz dazu korrelierte das hypermethylierte RASSF1-Gen nicht mit einem positiven CTC-Befund. Die Signifikanz betrug $p=0,488$.

Tab. 20: Korrelation des RASSF1 mit CTCs



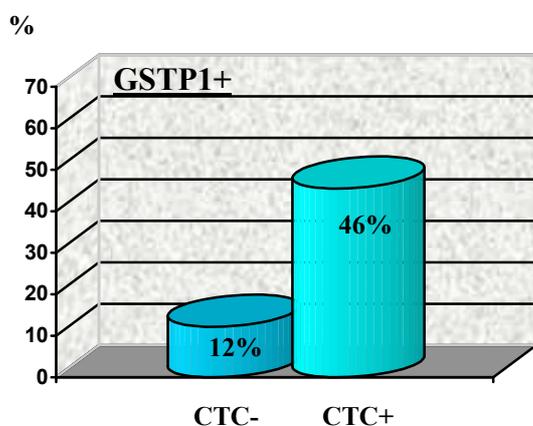
	CTC-	CTC+
RASSF1-	38	8
RASSF1+	12	4
p	0,488	

Abb. 39: Korrelation des RASSF1 mit CTCs

4.6.3 Korrelation des GSTP1 mit zirkulierenden Tumorzellen

Bei fast der Hälfte aller Patientinnen mit einer Hypermethylierung des GSTP1 waren auch CTCs nachweisbar. Die Signifikanz der Korrelation betrug $p=0,022$.

Tab. 21: Korrelation des GSTP1 mit CTCs



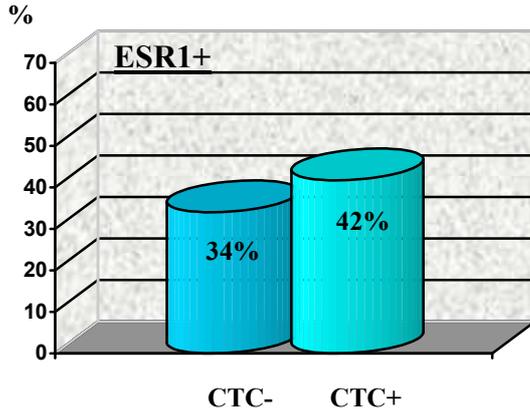
	CTC-	CTC+
GSTP1-	43	6
GSTP1+	6	5
p	0,022	

Abb. 40: Korrelation des GSTP1 mit CTCs

4.6.4 Korrelation des ESR1 mit zirkulierenden Tumorzellen

Der Unterschied zwischen positiven und negativen CTCs bei einer Hypermethylierung des ESR1 war nicht aussagekräftig. Es besteht keine signifikante Korrelation dieser beiden Parameter ($p=0,740$).

Tab. 22: Korrelation des ESR1 mit CTCs



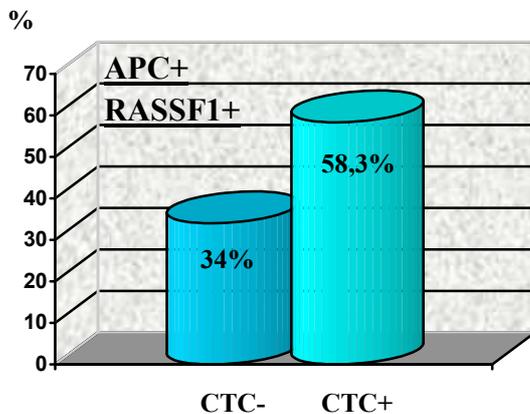
	CTC-	CTC+
ESR1-	33	7
ESR1+	17	5
p	0,740	

Abb. 41: Korrelation des ESR1 mit CTCs

4.6.5 Korrelation der Genkombination von APC und RASSF1 mit zirkulierenden Tumorzellen

Fast 60% der Patientinnen, die eine Hypermethylierung des APC oder RASSF1 Gens aufwiesen, waren auch CTC-positiv. Allerdings zeigten auch fast 40% der Patientinnen CTCs, die keine Hypermethylierung für eines der beiden Gene hatten. Dies deutet auf keine signifikante Korrelation ($p=0,186$) hin.

Tab. 23: Korrelation von APC und RASSF1 mit CTCs



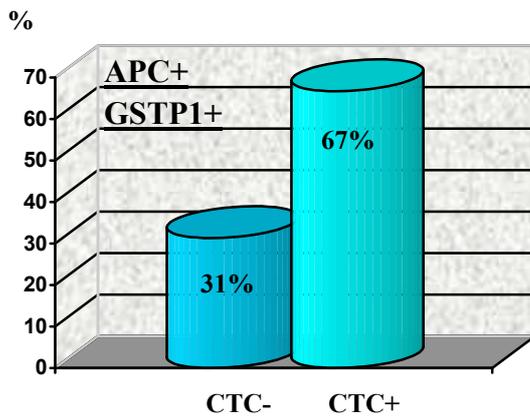
	CTC-	CTC+
APC- und RASSF1-	33	5
APC+ und RASSF1+	17	7
p	0,186	

Abb. 42: Korrelation von APC und RASSF1 mit CTCs

4.6.6 Korrelation der Genkombination von APC und GSTP1 mit zirkulierenden Tumorzellen

Anders verhält es sich bei Patientinnen, deren Gene mindestens für APC oder GSTP1 hypermethyliert vorlagen. Sie zeigten in fast 70% der Fälle ein Vorhandensein von CTCs im Blut. Dies entspricht einer signifikanten Korrelation mit $p=0,044$.

Tab. 24: Korrelation des APC und GSTP1 mit CTCs



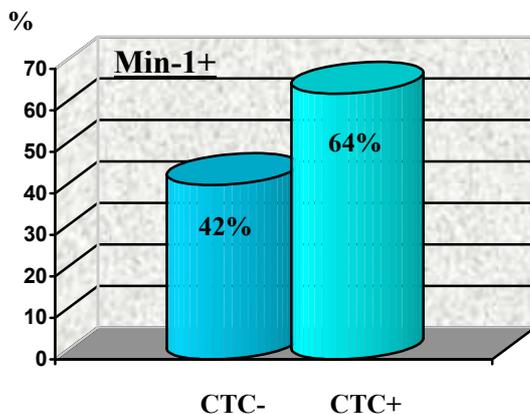
	CTC-	CTC+
APC- und GSTP1-	33	4
APC+ und GSTP1+	15	8
p	0,044	

Abb. 43: Korrelation von APC und GSTP1 mit CTCs

4.6.7 Korrelation der Genkombination Min-1 mit zirkulierenden Tumorzellen

Die Korrelation zwischen positiven CTC und der Genkombination Min1 = Mindestens ein Gen aus dem Komplex (APC, RASSF1, GST1) positiv, war nicht aussagekräftig. Es besteht keine signifikante Korrelation dieser beiden Parameter ($p=0,740$).

Tab. 25: Korrelation der Genkombination Min-1 mit CTCs



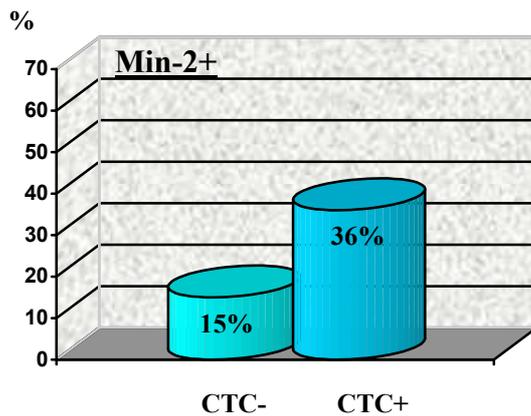
	CTC-	CTC+
Min-1-	28	4
Min-1+	20	7
p	0,187	

Abb. 44: Korrelation der Genkombination Min-1 mit CTCs

4.6.8 Korrelation der Genkombination Min-2 mit zirkulierenden Tumorzellen

Die Korrelation zwischen positiven CTC und der stringenteren Genkombination Min-2 = Mindestens zwei Gene aus dem Komplex (APC, RASSF1, GST1) positiv, war nicht aussagekräftig. Es besteht keine signifikante Korrelation dieser beiden Parameter ($p = 0,094$).

Tab. 26: Korrelation der Genkombination Min-2 mit CTCs



	CTC-	CTC+
Min-2-	41	7
Min-2+	7	4
p	0,094	

Abb. 45: Korrelation der Genkombination Min-2 mit CTCs

5 Diskussion und Ausblick

MethyLight

Während anfänglich die Ursprünge der Karzinogenese primär auf genetischer Ebene eruiert wurden, weiß man heute, dass eine Vielzahl menschlicher Pathologien, insbesondere die Entstehung maligner Neoplasien durch epigenetische Veränderungen wie Hypo- und Hypermethylierungen der CpG-Inseln induziert werden (Wajed et al 2001). Bezogen auf das Mammakarzinom belegen Studien im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen das gehäufte Auftreten methylierter DNA im Serum von Blutkrebspatienten (Müller et al 2003, Van der Auwera et al. 2009). Der dringende Bedarf nach einfach durchzuführenden, aber verlässlichen Detektionsmethoden mit hoher Ausbeute methylierter DNA ist gegeben (Dulaimi et al. 2004).

Aktuell sind verschiedene Systeme in Erprobung. Die verbreitete methylierungsspezifische PCR (MSP) registriert Methylierungen von CpG-Inseln zwar mit vergleichsweise hoher Sensitivität und Spezifität, doch scheitert sie bei der Erfassung einer nur geringen Anzahl von Methylierungen. Diesem Problem begegnet die quantitative Realtime-PCR nach MethyLight mit deutlich höherer Sensitivität. Während MSP auf Endpunktanalysen beruht, basiert MethyLight auf quantitativen zyklischen Messungen der Fluoreszenzsignale in Relation zu exponentiellen Phasen der PCR-Reaktion. Dies erlaubt prinzipiell quantitative Schlüsse bezüglich des Methylierungsgrades in Relation zu Kontrollreaktionen zu ziehen. Der größte Vorteil von MethyLight mag aber auch in seiner schnellen unkomplizierten Durchführbarkeit liegen. Umständliche gelelektrophoretische Separationen oder Hybridisierungen werden im Gegensatz zu anderen Verfahren überflüssig. Die Wahrscheinlichkeit von Probenverunreinigungen und Fehlerraten sinkt dadurch ebenfalls (Eads et al. 2000). Das MethyLight-Assay wird daher als zeitgemäß sinnvollstes Verfahren zur Erfassung von DNA-Methylierungen angeführt (Müller et al. 2003, Agrawal et al. 2007).

In der vorliegenden Studie wurde zunächst eruiert, inwiefern sich das MethyLight-Testverfahren tatsächlich als Detektionsmethode für DNA-Methylierungen eignet. Die Anforderung lag vor allem in der Identifizierung nur minimaler zur Verfügung stehender DNA-Mengen. Die Validierung erfolgte zunächst anhand der Mammakarzinomzelllinien

ZR75-1, MDA231, und SKBR3 im Vergleich zu einer artifiziell komplett methylierten PBL-DNA. Das Gen ACTB, welches nicht spezifisch methyliert vorliegt, wurde als Kontrollgen eingesetzt. Zur Methylierungsdifferenzierung wurden alle Proben zuvor entsprechend der Bisulfitmethode modifiziert. In einer Verdünnungsreihe mit einem definierten Grad der DNA-Methylierung wurde das Detektionslimit bestimmt. Mit einem Grenzwert von mindestens bis zu zwei Zelläquivalenten (16pg DNA) bewies der Test eine hohe Sensitivität. Das MethyLight-Verfahren hat sich prinzipiell als geeignete Methode etabliert, schnell, verlässlich, einfach und nicht invasiv DNA-Methylierungen im Serum von Patienten zu messen. Die quantitative Differenzierung war aber nur eingeschränkt möglich. Dies liegt daran, dass das Auftreten der methylierten DNA ein Ereignis weniger Moleküle ist. So erforderte die Detektion meist etwa 36 bis 40 PCR Zyklen, was kaum im Bereich der quantitativen Dynamik der PCR Reaktion liegt. In Mehrfachbestimmungen konnten wir die Konsistenz der Mehrfachergebnisse nur bei besonders hohen Molekülkonzentrationen reproduzieren, während die Detektion geringer Konzentrationen methylierter DNA stochastischen Schwankungen unterworfen war. Dies hat uns veranlasst in der Auswertung erst mindestens ein deutliches PCR-Signal pro Dreifachbestimmung ($Ct < 40$) oder mindestens zwei schwache Signale als positives Ereignis zu werten. Weitere Interpretationen einer quantitativen Erfassung schienen uns nicht sinnvoll.

DNA-Methylierung bei Mammakarzinompatienten

Unter diesem Aspekt der Betrachtung wurden 86 Mammakarzinomfälle und 23 klinisch unauffällige Probanden anhand ihrer Blutseren untersucht. Die Auswahl der richtigen Gene hierbei ist insofern von Belang, als dass die Methylierung eines Genes bei Karzinompatienten nicht zwangsläufig auch klinische Relevanz zeigt (Müller et al. 2003). Aus diesem Grund wurden für unsere Zwecke die charakteristischen hypermethylierten brustkrebsassoziierten Gene APC, RASSF1, GSTP1, ESR1 und CDKN2 ausgesucht (Dammann 2004, Dulaimi et al. 2004).

Die Resultate der Untersuchungen zeigen übereinstimmend mit den Erwartungen eine erhöhte DNA-Methylierung der Gene der Patientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als besonders signifikant kann unter allen anderen das APC-Gen ($p = 0,050$) gewertet werden. Allerdings ist die Sensitivität auch hier nicht zu 100% gegeben. Insgesamt war zudem die Spezifität der Methode nicht ausreichend differenzierend, da in der Kontrollgruppe ebenfalls

häufig positive Signale beobachtet wurden, wenn auch, wie im Falle des APC-Genes, seltener als im Patientenkollektiv. Alles in allem ist der Anteil falsch-positiver Ereignisse höher als im Kontrollkollektiv von Müller et al.

Das Gen CDKN2 war, obwohl in der Literatur als häufigstes typisches hypermethyliertes Brustkrebsassoziiertes Gen beschrieben (Dahl und Guldberg 2007, Wajed et al. 2001, Widschwendter und Jones 2002), bei ausnahmslos allen Patientinnen im Serum negativ. Natürlich wirft dies zu klärende Fragen auf. Bemerkenswerterweise berichten allerdings Roa et al. 2004 auch über eine bestehende Korrelation zwischen Methylierung von CDKN2 und einer günstigeren Prognose ($p=0,002$) für Brustkrebspatientinnen. Die exakte Rolle dieses Gens sollte noch durch intensiverte Forschung geklärt werden.

Ogleich die Gene APC, RASSF1, GSTP1 und ESR1 auffallend oft im Serum von Mamakarzinompatientinnen nachweisbar waren, sind sie bei alleiniger Verwendung trotz allem nicht spezifisch genug, um konventionelle Screeningmethoden zu ersetzen. So sind zum Beispiel Hypermethylierungen der Gene APC und CDKN2 auch bei diversen Karzinomen des Intestinaltraktes (u.a. Kolorektalkarzinome, Ösophaguskarzinome) beschrieben (Suehiro et al. 2008). Darüber hinaus liegt die Promotorregion des CDKN2-Gens ebenso bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom hypermethyliert vor (Ko et al. 2008). Im Zusammenhang mit Bronchialkarzinomen dagegen wird über Hypermethylierungen sowohl von APC und RASSF1 (Feng et al. 2008) als auch von CDKN2 und ESR1 (Suga et al. 2008) berichtet. GSTP1-Methylierungen hingegen existieren ferner bei Prostatakarzinompatienten (Bryzgunova et al. 2008). Diese Exempel ließen sich weiter fortsetzen und verdeutlichen die mangelnde spezifische Eignung von Genhypermethylierungen als alleinige Tumormarker zum Mammakarzinomscreening, vor allem angesichts des bei uns beobachteten verhältnismäßig hohen Hintergrundes positiver Signale im gesunden Probandenkollektiv.

DNA-Methylierungen in der Diagnostik

Prognostische und prädiktive Faktoren sind als wertvolle Informationsgeber bei Therapie und Prognosebestimmung von Mammakarzinompatienten unentbehrlich. Aus dem Bedürfnis nach besseren Markern heraus sind zahlreiche alternative viel versprechende Parameter in Diskussion. Hierzu gehören unter anderem Genexpressionsprofile, den Zellzyklus regulierende Proteine sowie okkulte Zytokeratin-positive metastatische Zellen im Knochenmark. Allen ist jedoch gemeinsam, dass der Wissensstand um diese Marker noch zu

gering ist. Es bedarf weiterer intensiver Erforschung, die noch viel Zeit in Anspruch nehmen wird, um ihre prognostische Relevanz beurteilen zu können (Payne et al. 2008). Obwohl die generelle prognostische Potenz von DNA-Methylierungen einzelner Gene in der Literatur oft akzentuiert wird, sind kaum Studien veröffentlicht, die die Korrelation spezifischer Gene zu einzelnen klinischen Faktoren differenzierter erforschen.

In dieser Arbeit wurden die Patientenseren daher auf mögliche Korrelationen zwischen DNA-Hypermethylierung der Gene APC, RASSF1A, GSTP1, ESR1 sowie CDKN2 und geläufigen klinischen Markern wie Tumorgröße, Methylierungsstatus, Grading ER-Status, PR-Status, Her-2/neu-Status, Histologie und Alter hin untersucht. In erster Linie wird die Prognose von Brustkrebspatientinnen bei Erstdiagnose bestimmt durch die Tumorgröße und den Zustand der lymphozytären Metastasierung, in erster Linie des axillären Befalls (Müller et al. 2003).

Während bei den analysierten Patientenproben keine Zusammenhänge mit kleineren Tumoren (T1-2) bestanden, existierte ein auffallender Bezug zwischen Methylierung und Karzinomen der Größe T3-4. Diese Resultate stützen die Studienergebnisse von Müller et al. 2003, die ebenfalls über eine gehäufte Methylierung eigens der Gene RASSF1 und ESR1 bei fortgeschrittenen Tumoren berichten.

Neue Erkenntnisse dagegen ließen sich den Bilanzen der vorliegenden Arbeit zufolge bezüglich des Gens GSTP1 gewinnen. Speziell dieses Gen erwies sich als sehr markant für den Faktor Tumorgröße ($p= 0,002$). Das GSTP1 spielt eine wichtige Rolle bei der Detoxifikation hydrophober Elektrophile, zu denen auch diverse Karzinogene gehören. Ein Ausfall des Gens kann demzufolge eine reduzierte Abwehrfunktion von Zellen zur Folge haben, die wiederum in einem erhöhten genomischen Schaden und der Karzinomentstehung resultieren kann. Auch Shinozaki und Team entdeckten ähnliche Zusammenhänge zur Tumorgröße (Shinozaki et al. 2005).

Bezüglich des Nodalbefalls vermochte bei keinem Gen eine überzeugende Korrelation aufgespürt werden. Jedoch ist die Streuung über Lymphbahnen keinesfalls der einzige lebensbedrohende Vorgang. Auch die Metastasierung auf hämatogenem Weg (Skelett, Gehirn, Lunge und Leber) ist entscheidend im Fortschreiten der Krankheit (Müller et al. 2003). Hier zeigten insbesondere Methylierungen der Gene APC ($p= 0,002$) und RASSF1 ($p= 0,046$) eine enge Verknüpfung mit einem positiven Metastasierungsstatus. Interessant ist die Beobachtung, dass weniger der einzelne klinische Faktor des TNM Systems einen

ausgeprägten Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus aufweist, wohl aber der AJCC Index als Kombinationsparameter der TNM Situation. Lediglich die Methylierung des ESR1 Genes war hiervon unabhängig. Da das ESR1 Gen auch die häufigste Unspezifität in der Kontrollgruppe zeigte wurde dieses Gen aus den statistisch untersuchten Genkombinationen ausgeschlossen.

Ähnlich starke Zusammenhänge ergaben sich auch mit dem Biomarker CA 15-3. Der Status des Markers war in 63 Fällen bekannt und bei 15% der Fälle erhöht. Auch in diesem, als aggressivere Subgruppe zu betrachtendem, Kollektiv ist häufiger eine erhöhte Methylierung zu beobachten. Lediglich die Methylierung des ESR1 hat hiermit wieder keinerlei Zusammenhang. Insgesamt ist CA-153 der Laborparameter mit der höchsten Korrelation zu den untersuchten Methylierungsmarkern.

DNA-Methylierungen wurden bisher zwar oft auch in Assoziation zum Hormonrezeptorstatus gebracht, doch ist die Datenlage hierzu nicht eindeutig. Widschwendter und Kollegen vermuteten bereits 2004 eine Interaktion zwischen DNA-Methylierung und der Hormonrezeptor-Biologie von Mammakarzinomzellen (Widschwendter et al. 2004).

Ferner wurde über Zusammenhänge zwischen einer Überexpression des Her-2/neu-Status bei Mammakarzinompatienten und dem Vorliegen von abnormalen Methylierungsmustern berichtet (Fiegl et al. 2006). Unsere Ergebnisse konnten diese These stützen. Zum immunhistochemisch bestimmten Her-2/neu-Status von Brustkrebspatienten bestand eine hochsignifikante Korrelation vor allem der Gene GSTP1 ($p=0,003$) und ESR1 ($p=0,024$). Außer in Relation zur Tumorgröße stellt sich das GSTP1 also zudem im Bezug zum Her-2/neu-Status erneut als überraschend signifikanter Marker heraus. Weitergehende differenziertere Forschung zu den Qualitäten des GSTP1 ist gewiss angebracht. Auch die stringente Genkombination „Min-2“, in welcher wenigstens zwei positive Gene aus dem Komplex (APC, RASSF1 und GSTP1) gefordert werden, zeigt eine starke Korrelation mit dem aggressiveren Her2/neu positiven Tumoren.

Im Gegensatz zum Her-2/neu-Status erwies sich allerdings keines der untersuchten Gene als aussagekräftig bezüglich Grading, ER-Status und PR-Status. Insbesondere dem RASSF1A wird zwar eine Verknüpfung zu ER-positiven Fällen zugeschrieben (Shinozaki et al. 2005), doch dem widersprach die auf unseren Daten basierend berechnete fehlende Korrelation ($p=$

0,756) für RASSF1A zum ER-Status. Obwohl Jhaveri und Morrow 1998 einen engen Zusammenhang zwischen der Hypermethylierung von GSTP1 und einem negativen ER-Status beschrieben, konnten wir dies nicht verifizieren.

Weiterhin wurden Primärtumore und Rezidive verglichen. Auch hier trat das APC ($p= 0,006$) als nützlichster Marker für Differenzierung fortgeschrittener Tumore hervor. Die von Widschwendter empfohlene Kombination des APC- mit dem RASFF1-Gen wurde überprüft und konnte diese Differenzierung noch optimieren.

Die Kontrolle einer eventuell vorhandenen Übereinstimmung zwischen histologischer Tumordifferenzierung und Hypermethylierung ergab des Weiteren eine deutliche Signifikanz des RASSF1 ($p= 0,024$) für duktales Karzinome. In bisherigen Studien wurde, außer beim BRCA1 für duktales Tumoren, nur über einen eher unwesentlichen Zusammenhang der histologischen Differenzierung und der Hypermethylierung spezieller Gene berichtet. Eine zu grobe Differenzierung im Hinblick auf die beachtliche histologische Heterogenität des Mammakarzinoms könnte der Grund dafür sein (Bae et al. 2004).

Überraschenderweise vermochte bei keinem der geprüften Gene eine nennenswerte Verbindung zwischen Methylierungsgrad und dem Alter der Patienten aufgedeckt werden. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, dass Gene, die einen mit dem Alter veränderten Methylierungsstatus aufweisen, gewebsspezifisch sind. Hier liegt sicher ein weiterer Ansatzpunkt für detailliertere zukünftige Forschung (Agrawal et al. 2007).

In ihrer Gesamtbilanz der Untersuchungen zeigen die Resultate, dass bei Brustkrebspatienten DNA-Methylierungen unterschiedlicher Gene durchaus prognostisches Potenzial in sich bergen. Methylierungsprofile von Mammakarzinompatientinnen können wegweisende Informationen über Prognose und den klinischen Verlauf liefern. Ihre Einbeziehung als prognostische Marker bei der Karzinomtherapie scheint hilfreich und sinnvoll.

Bei der Diagnostik sollten Mammakarzinompatienten zudem zusätzlich zu zytologischen und histologischen Untersuchungen, zusätzlich auf DNA-Methylierungen hin getestet werden. Diese Maßnahme verspricht nicht nur eine frühere, sondern auch eine exaktere und differenzierte Diagnostik mit folglich besseren Heilungschancen (Agrawal et al. 2007).

Die spezifischen Einsatzmöglichkeiten der einzelnen Gene sollten jedoch in noch umfangreicheren standardisierteren Studien genauer definiert und voneinander abgegrenzt werden.

Methylierung im Therapiemonitoring

Eine Reduktion bzw. Vergrößerung des Tumors kann durch die Eruierung von Methylierungsmustern verfolgt und das Auftreten von Rezidiven früher erkannt werden (Matuschek et al 2010). Die Bestimmung von DNA-Methylierungsmustern kann darüber hinaus auch Informationen über die Therapiesensitivität geben. Eine Hypermethylierung des ESR1 zum Beispiel soll ein Kennzeichen für gute Tamoxifensensibilität des Tumors sein, während im Gegensatz dazu eine Hypermethylierung des RASSF1A auf ein mögliches Therapieversagen und die Notwendigkeit einer Therapieumstellung hinweisen kann (Paluszczsak und Baer-Dubowska 2006). Ebenso kann durch ihre prädiktive Aussagekraft bereits vor Therapiebeginn die Bestimmung der individuell effektivsten Behandlung erfolgen (Brueckner et al. 2007). Die Erstellung besserer, weil individuellerer Therapiepläne wird ermöglicht (Wajed et al. et al. 2001). Aufgrund des von uns gefundenen Zusammenhanges der Methylierung mit der Tumorprogredienz (AJCC-Status oder Ca15-3 Wert) mag die Methylierung eine Bedeutung in der Verwendung als Verlaufsparemeter haben. Forschungen, die langjährige Krankheitsverläufe analysieren, würden sicher differenziertere Informationen liefern.

Methylierung in der Tumorprävention

Die Ursache für die steigenden Überlebenswahrscheinlichkeiten liegt nicht eindeutig in einer verbesserten Therapie. Vielmehr ist anzunehmen, dass Brustkrebspatientinnen länger leben, weil der Tumor mittlerweile genauer und zu einem früheren Zeitpunkt diagnostiziert und somit operiert beziehungsweise therapiert werden kann (Vainio et al 2002). Der wichtigste Faktor zur Bestimmung der Überlebenszeit und Lebensqualität von Mammakarzinompatienten ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung. Je eher und exakter die Diagnose gestellt wird, umso besser stehen die Chancen für Betroffene (Dulaimi et al. 2004, Wajed et al. 2001).

Ogleich die Mammographie bisher den Goldstandard in der Früherkennung von Brustkrebs darstellt, bleiben durch sie dennoch 20% der Tumore unentdeckt (Vlahou et al., 2003). Bisher

übliche Verfahren der Krebsprävention, wie herkömmliche Tumormarker, radiologische Prozeduren, sowie endoskopische Untersuchungen haben große Schwachstellen. Limitierte Sensibilität, und Spezifität, Kostspieligkeit und mangelnde Patient compliance sind einige Beispiele (Wajed et al. 2001). Es besteht der dringende Bedarf an neuen günstigeren, sensitiveren und spezifischeren Früherkennungsmethoden (DGS 2007).

Ein veränderter Methylierungsstatus stellt einen der allerersten Schritte in der Tumorgenese dar und kann infolgedessen auch als erstes diagnostiziert werden (Cottrell et al. 2004). DNA-Methylierung könnte demnach theoretisch dazu dienen, epigenetische Veränderungen als Krebsfrüherkennungssignal oder sogar schon als prämaligues Signal erkennbar zu machen. Das Screening nach DNA-Methylierungen bei Gesunden käme also als mögliche neue Früherkennungsmethode von Karzinomen in Betracht. Die Methylierung ist zum einen chemisch stabil und relativ einfach zu erfassen (Paluszczak und Baer-Dubowska 2006). Hierfür spricht des Weiteren die hohe Sensitivität. Zum anderen gestaltet sich die Untersuchung angenehmer für den Patienten und wäre bei weitem nicht so kostspielig wie beispielsweise eine Mammografie. (Esteller et al. 2001).

In der Gesamtbilanz ist der Nachweis einer Methylierung jedoch als sichere Screeningmethode nicht spezifisch genug. Die Einordnung einer nachweislich positiven Genhypermethylierung im Serum kann allenfalls als einer von vielen Risikofaktoren für Mammakarzinome erfolgen.

Methylierung als Therapieansatz

Die potenziellen Möglichkeiten der DNA-Methylierungen begrenzen sich nicht nur auf Diagnostik und Therapiemonitoring.

Die Forschung verspricht sich insbesondere von den Aussichten der Gentherapie große Erwartungen. Genetische beziehungsweise epigenetische Veränderungen wie Methylierung stehen hierbei im Mittelpunkt (DGS 2007). Die epigenetische Methylierung von DNA ist ein reversibler Prozess. Kenntnisse über DNA-Methylierungsmuster können helfen, diese epigenetischen Zellveränderungen zu verhindern oder sogar umzukehren (Widschwendter und Jones 2002). Epigenetische Therapien gliedern sich hauptsächlich in zwei Gruppen: demethylierende Agenzien (DNMT-Inhibitoren), wie 5-Aza-Cytidin und 5-Aza-2'-

Deoxycytidin, MG98, NSC303530 sowie NSC401077 sowie Histondeacetylase-Hemmer (HDAC), wie Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) und Valproinsäure. Beide werden gegenwärtig intensiv in klinischen Studien bei Myelodysplastischem Syndrom, Leukämien, Ovarkarzinomen und Bronchialkarzinomen erforscht. Die Ergebnisse sowohl von in vitro- als auch in vivo-Forschungsarbeiten sind sehr vielversprechend (Feng et al. 2007, Agrawal et al. 2007).

Trotz allem ist diese epigenetische Therapie noch nicht ausgereift. Selbst über mögliche Karzinom-induzierende Wirkungen bei einer Umkehrung von DNA-Methylierungen wird berichtet. Da Erfolge aber revolutionär wären, muss dieser Chance unbedingt weiterhin nachgegangen werden (Szyf 2005).

Zebularine, ein weiterer potenter Demethylierer tritt zum Beispiel in vielen Studien als besonders erfolgreiche Substanz hervor. Es überzeugt durch seine Stabilität und orale Verfügbarkeit, aber am meisten durch seine enorme Toxizität gegenüber Karzinomzellen bei gleichzeitig geringer Toxizität normalen Zellen gegenüber (Agrawal et al 2007). Ein besonderes Augenmerk wird dennoch auf die Wirksamkeit der kombinierten Anwendung beider therapeutischer Ansätze gelegt. HDAC und DNA-Methylase-Inhibitoren gelten als hoffnungsvollste Substanzklassen in der Karzinomtherapie (Feng et al. 2007).

Methylierung im Vergleich zu tumorspezifischer DNA im Serum

Bei der stetigen Fahndung nach Lösungen im Kampf gegen das Mammakarzinom stehen DNA-Methylierungen nicht als einziges im Fokus der Wissenschaft. Es werden auch erhöhte Vorkommen von tumorspezifischer DNA im Blut von Brustkrebspatientinnen publiziert (Miyamoto und Ushijima 2005, Müller et al. 2003). Die Analysen unserer Studie konnten diese These leider nicht bekräftigen. Auch ist gemäß dem aktuellen Stand der Literatur die genaue Abstammung dieser DNA bisher nicht geklärt. Neben Karzinomen und absterbenden Karzinomen kommen am wahrscheinlichsten zirkulierende Tumorzellen als Ursprung in Frage (Koyanagi et al. 2006).

Methylierung im Vergleich zu zirkulierenden Tumorzellen

Studien die sich allein auf zirkulierende Tumorzellen konzentrierten, wiesen ein erhöhtes Auftreten bei Brustkrebspatienten nach. Zwischen 50-70% der Patientinnen mit Metastasen

weisen CTCs auf (Hayes und Smerage 2008). Ebenso wirken sich positive Befunde ungünstig auf Verlauf und Prognose aus (Jotsuka et al. 2004). Ferner werden dem positiven Nachweis disseminierter Tumorzellen mögliche prognostische Markereigenschaften zugesprochen (Pantel et al 2002). Ausdrücklich wird auf die Korrelation zu einer Her-2/neu-Überexpression im Tumorgewebe bei Fernmetastasen aufmerksam gemacht. Diesem Anhaltspunkt sollte zukünftige Forschung durchaus nachgehen (Zieglschmid et al. 2007). Der positive Nachweis von CTCs gibt zudem Auskunft über die Therapiesensitivität und sollte bei der Erwägung der optimalen Therapie eingesetzt werden (Hayes und Smerage 2008).

Nichtsdestotrotz gestaltet sich die Erfassung zellfreier tumorspezifische DNA als zeitraubend, schwierig und kostspielig (Koyanagi et al. 2006, Wajed et al. 2001). Auch die Identifizierung von CTCs zeigt trotz neuer immunmagnetischer Verfahren per Multiplex-PCR Defizite in der Sensitivität (Miyamoto und Ushijima 2005).

Korrelationen zwischen DNA-Methylierungen und CTCs

Umso mehr rücken Studien über Korrelationen zwischen dem Vorhandensein CTCs und dem Auftreten methylierter Tumor-DNA in den Focus (Matuschek et al 2010), die Anlass zur Annahme geben, dass die Messung von DNA-Methylierungen eine bessere Alternative zur Bestimmung zirkulierender Tumorzellen darstellt. Der Unterschied liegt vor allem in der Sensitivität, besonders bei nur gering zur Verfügung stehender DNA-Mengen (Koyanagi et al. 2006). Die Ergebnisse einer parallelen Studie im Institut für Onkologische Chemie zeigt insgesamt nur einen vergleichsweise geringen positiven Anteil von Patienten mit zirkulierenden Tumorzellen CTC+ (19% 12/63), trotz des verhältnismäßig hohen Anteils fortgeschrittener Tumore im Kollektiv. Die Ergebnisse unserer Analysen offenbarten eine deutlich signifikante Assoziation der Methylierung von APC ($p=0,013$) und dem Auftreten von CTCs (MUC1/GA733.2). Ebenso relevant war die Korrelation bezogen auf das hypermethylierte GSTP1 ($p=0,022$). Den Genen RASSF1 und ESR1 konnten jedoch keine wesentlichen Beziehungen zu dem Auftreten von CTCs nachgewiesen werden. Die Signifikanzfaktoren lagen bei $p=0,488$ (RASSF1A) und $p=0,740$ (ESR1). Aktuell wurde eine in Studiendesign und Größe des Patientkollektives vergleichbare Studie von Van der Auwera et al. 2009 veröffentlicht. Allerdings wurden hier zirkulierende Tumorzellen durch das Veridexverfahren bestimmt welches immunomagnetische Separation mit immunfluoreszenzmikroskopischer Detektion kombiniert und welches derzeit als einzige

Methode eine FDA Zulassung erhalten hat. Wohl auch Aufgrund des noch größeren Anteils metastasierender Tumore ist die Detektionsrate für CTC+ Tumore hier bei 27/78 noch höher. Der Anteil positiver Methylierungsereignisse lag hier in der gleichen Größenordnung wie in unserer Studie: RASSF1 35% vs. 26 %; APC 29% vs 30% und ESR1 20% vs 38%; GSTP1 wurde von Van der Auwera nicht untersucht. Interessanterweise findet sich bei keiner gesunden Kontrollperson der gleichzeitige Nachweis mehrerer methylierter Gene. Zudem konnten auch Van der Auwera et al. nur geringe Zusammenhänge des Methylierungsstatus mit den Rezeptoren beobachten. Die dort beobachtete positive Korrelation des ER-Status mit der RASSF1A Methylierung, die auch Feng et al. 2007 und Sunami et al. 2008 bestätigen, war bei uns nicht gegeben. Dafür finden Van der Auwera et al. keinen Zusammenhang der Methylierung mit dem Her2neu Status. Hier lieferte allerdings in unseren Händen eben das GSTP1 die beste positive Korrelation bei häufigerer Methylierung im aggressiveren Tumortyp. Insgesamt ist das GSTP1 ein Gen das von Van der Auwera nicht mituntersucht wurde, unserer Ansicht nach jedoch ein guter Kandidat für die Differenzierung fortgeschrittener Mammatumoren sein kann. Hinzu kommt die gute Spezifität dieses Methylierungsmarkers bei seltenen positiven Ereignissen im Kontrollkollektiv. Die Arbeit von Van der Auwera et al. ist neben unserer die bisher einzige Arbeit, in der zirkulierende Tumorzellen mit der DNA Methylierung beim Mammakarzinom verglichen werden. Auch Van der Auwera et al. beobachten eine signifikante Korrelation zwischen CTC+ und methylierter DNA-Marker. In 45% der Fälle lag beim gleichzeitigen Auftreten von CTCs mindestens eines der untersuchten Gene methyliert vor. Umgekehrt konnte bei Patientinnen ohne DNA-Methylierung auch in 78% der Fälle kein positiver CTC-Befund nachgewiesen werden. Die höchste Korrelation bestand zwischen CTC+ und RASFF1A ($p < 0,001$), welche bei uns nur tendenziell und ohne Signifikanz beobachtet werden kann. Übereinstimmend mit Van der Auwera beobachten wir eine positive Korrelation der CTC+ mit der APC Methylierung und fehlende Korrelation mit der ESR1 Methylierung. Die gute Korrelation des GSTP1 Genes mit dem Auftreten von CTC+ stellt unabhängig nocheinmal den originären Wert dieses Parameters heraus.

6 Fazit

Kenntnisse über den DNA-Methylierungsstatus von Mammakarzinompatienten werden zunehmend umfangreicher. Zusammenfassend konnte in dieser Studie die einträgliche Tauglichkeit des MethyLight-Tests zur Identifizierung abnormaler DNA-Methylierung verifiziert werden.

Die Nachweisgrenze des Tests liegt bei 16 pg DNA, was etwa 2 Zelläquivalenten entspricht. Somit lassen sich bereits geringe Mengen DNA effektiv analysieren.

Anhand der Serumproben von 86 Brustkrebspatientinnen und 23 Kontrollpersonen konnte gezeigt werden, dass beim Mammakarzinom abnormal erhöhte Methylierungen, vor allem des Gens APC ($p= 0,05$) auftreten. Im Gegensatz dazu wurden alle Patienten und Kontrollpersonen (bis auf eine) negativ auf eine Methylierung des Gens CDKN2 getestet.

Positiv zum Lymphknotenbefall korrelierte neben dem Gen ESR1 ($p= 0,046$) insbesondere das Gen GSTP1 ($p= 0,002$). Dahingegen weisen APC ($p= 0,002$) und RASSF1 ($p= 0,046$) einen deutlichen Zusammenhang zu bestehenden Metastasen auf. Neben ESR1 ($p= 0,024$), zeigt vor allem das GSTP1 ($p= 0,003$) eine deutliche Wechselbeziehung zum Her-2/neu-Status. Eine Korrelation indessen zum Grading, ER-Status sowie PR-Status konnte keinem der untersuchten brustkrebsassoziierten Gene nachgewiesen werden. Eindrucksvoll ist die Hypermethylierung des APC ($p= 0,000$) bei CA 15-3 positiven Patientinnen. Im Hinblick auf die histologische Art des Tumors stellt sich das RASSF1 Gen ($p= 0,024$) als markant für duktale Karzinome heraus. Überraschenderweise gab es keinerlei Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Alter der Patientinnen. Anders verhält es sich bei der Unterscheidung zwischen Primärtumoren und Rezidiven. Während das RASSF1 ($p= 0,055$) nur als tendenziell signifikant gewertet werden kann, offenbart das APC Gen ($p= 0,006$) eine hohe Korrelation zu Patientinnen mit Rezidivtumor.

Ein erhöhtes Vorkommen tumorassoziierter DNA im Blut von Brustkrebspatientinnen im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte nicht festgestellt werden. Die Methylierung des RASSF1 ($p= 0,488$) stand in keinem Zusammenhang mit dem Vorkommen von CTCs. Allerdings bestanden Korrelationen zwischen dem Auftreten von CTCs und Hypermethylierungen der Gene GSTP1 ($p= 0,022$), und APC ($p= 0,013$).

DNA-Methylierungen sind ein derzeit intensiv erforschter Ansatzpunkt in der Karzinombekämpfung – und das auf so unterschiedlichen Ebenen. Sie erscheinen gleich aus mehreren Gründen so attraktiv als Tumormarker: 1.) ist DNA im Blut stabil, einfach und bereits in geringen Mengen mit geeigneten Methoden wie der MethyLight_PCR detektierbar; 2.) Der regelmäßig positive Nachweis bei Karzinompatienten ist verglichen mit dem Vorkommen bei Gesunden signifikant erhöht; 3.) Generell besteht eine hohe Konkordanz zwischen epigenetischen Veränderungen in Proben von Primärtumoren und im Blut von Karzinompatienten; 4.) DNA-Methylierungen sind nicht beschränkt auf Patienten mit Metastasen, sondern finden sich ebenso bei Patienten in erst sehr frühen Tumorstadien (Van der Auwera et al. 2009). Insgesamt wird ihr Einsatz in Prävention, Diagnostik, Therapiemonitoring und sogar Therapie vielversprechend gepriesen. Doch zeigen die Resultate unserer Studie, dass dieser verstiegene Enthusiasmus zunächst etwas gebremst werden muss.

Auch sind noch kritischere und gründlichere Forschungsarbeiten und langjährige klinische Studien notwendig. Die einzelnen Gene sollten noch exakter voneinander in ihren charakteristischen Merkmalen untersucht werden, maximale Spezifitäten bezüglich prognostischem und prädiktivem Wert aufgespürt werden. Ferner sollte eine deutliche Abgrenzung von DNA-Methylierungsmustern beim Mammakarzinom im Vergleich zu anderen Tumorentitäten erfolgen.

Wenn auch sehr selten finden sich DNA-Methylierungen auch bei gesunden Probanden. Über das Auftreten von Methylierungen in gesundem Gewebe und im Blut von Rauchern wurde bereits früher berichtet. Dieser Nachweis ist entweder als Marker für ein sehr frühes eventuell noch nicht ausgebrochenes Tumorleiden oder aber als Marker für die stattgefundene Exposition gegenüber Karzinogenen zu interpretieren; möglicherweise auch beides (Van der Auwera et al. 2009). Tatsächlich wird das alleinige Potenzial von Methylierungsnachweisen als Screeningmethode und in der Primärdiagnostik des Mammakarzinoms überschätzt.

DNA-Hypermethylierungen werden weiterhin im Fokus der modernen Wissenschaft liegen. Neben der regionalen Hypermethylierung von Promoterregionen der Gene, sollte ungeachtet dessen die Bedeutung der globalen Hypomethylierung von DNA in Hinblick auf ihre Karzinomrelevanz zukünftig stärker erforscht werden (Paluszczak und Baer-Dubowska 2006).

Natürlich muss zudem der Option der Tumorthherapie durch Methylierungsumkehrung und Histondeacetylierung intensiver nachgegangen werden. Es liegen zu diesem Thema noch zu begrenzte Kenntnisse vor. Nichtsdestoweniger rechtfertigt allein die Chance einer effektiven Therapiemöglichkeit weitere Forschungsbestrebungen in diese Richtung.

Vielmehr haben nachweisbare DNA-Methylierungen im Serum von Brustkrebspatienten jedoch ihren Stellenwert als Verlaufsparemeter im Therapiemonitoring und in der Früherkennung von Metastasen oder dem Auftreten eines subklinischen Rezidivs. Insgesamt bestätigen unsere Ergebnisse die Bedeutung der DNA-Methylierung speziell in der Hinsicht auf ihren prognostischen und prädiktiven Wert bei der Verlaufsbeurteilung von Mammakarzinom-patientinnen. Insbesondere der gleichzeitige Nachweis multipler Gen-Methylierungen sollte Beachtung finden. Darüber hinaus sollte zukünftige Brustkrebsforschung vor allem auf die Korrelationen zwischen zirkulierenden Tumorzellen und DNA-Methylierungen ein besonderes Augenmerk legen.

Die Betrachtung beider Aspekte in Korrelation eröffnet eventuell eher Erfolg versprechendere Forschungsfelder für die Zukunft.

LITERATURVERZEICHNIS

Agrawal A, Murphy RF, Agrawal DK (2007): DNA Methylation in breast and colorectal cancers. *Modern Pathology* 20: 711 – 721

Bae YK, Brown A, Garrett E, Bornman D, Fackler MJ, Sukumar S, Herman JG, Gabrielson E (2004): Hypermethylation in Histologically Distinct of Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 5998 – 6005

Bloom HJG, Richardson WW (1957): Histologic Grading and Prognosis in Breast Cancer. *Br. J. Cancer* 15: 359 – 377

Brueckner B, Kuck D, Lyko F (2007): DNA Methyltransferase Inhibitors for Cancer Therapy. *Cancer Journal* 13 / 1: 17 – 22

Bryzgunova OE, Morozkin ES, Yarmoschuk SV, Vlassov VV, Laktionov PP (2008): Methylation-specific sequencing of GSTP1 gene promoter in circulating/extracellular DNA from blood and urine of healthy donors and prostate cancer patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1137: 222 – 5

Caldeira JR, Prando EC, Quevedo FC, Neto FA, Rainho CA, Rogatto SR (2006): CDH1 promoter hypermethylation and E-cadherin protein expression in infiltrating breast cancer. *BMC Cancer*: 6 : 48

Chen EI, Yates JR, (2006): Maspin and tumor metastasis. *IUBMB Life.* 58 / 1: 25 – 9

Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, Mooney SH, Kluth A, Olek A, Schwope I, Tetzner R, Ziebarth H, Berlin K (2004): A real – time PCR assay for DNA – methylation using methylation – specific blockers. *Nucleic Acids Research* 32/1 (e10): 1 – 8

Cunnick GH, Jiang WG, Gomez KF, Mansel RE (2002): Lymphangiogenesis and breast cancer metastasis. *Histol Histopathol.* 17 /3: 863 – 70

Dahl C, Guldberg P (2007): A ligation assay for multiplex analysis of CpG methylation using bisulfite – treated DNA. *Nucleic Acids Research* 35/21 (e144): 1-8

Dulaimi E, Hillinck J, De Caceres II, Al – Saleem T, Cairns P (2004): Tumor Suppressor Gene Promotor Hypermethylation in Serum of Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 10: 6189 – 6193

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW (2000): MethyLight: a high-throughout assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 28 / 8: e32

Emens LA (2008): Cancer vaccines: on the threshold of success. *Expert opinion on emerging drugs* 13/2: 295 – 308

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG (2001): A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Research* 61: 3225 – 3229

Feng W, Shen L, Wen S, Rosen DG, Jelinek J, Hu X, Huan S, Huang M, Liu J, Sahin AS, Hunt KK, Bast Jr RC, Shen Y, Issa JPJ, Yu Y (2007): Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Research* 9 / 4: R 57

Feng Q, Hawes SE, Stern JE, Wiens L, Lu H, Dong ZM, Jordan CD, Kiviat NB, Vesselle H (2008): DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(3): 645 – 54

Fiegl H, Millinger S, Goebel G, Müller-Holzner E, Marth C, Laird PW, Widschwendter M (2006): Breast cancer DNA methylation profiles in cancer cells and tumor stroma: association with HER-2/neu status in primary breast cancer. *Cancer Research* 66 / 1: 29 – 33

Frommer M, McDonald LE, Millar DS Collins CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5 – methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 / 5: 1827 – 1831

Gassmann P, Enns A, Heier J (2004): Role of tumor cell adhesion and migration in organ – specific metastasis formation. *Onkologie* 27 / 6: 577 – 82

Hayes DF, Smerage J (2008): Is there a role for circulating tumor cells in the management of breast cancer? *Clin Cancer Res.* 14 / 12: 3646 – 50

Hemminki K, Ji J, Försti A (2007): Risks for Familial and Contralateral Breast Cancer Interact Multiplicatively and Cause a High Risk. *Cancer Research* 67: 868 – 870

Hellebrekers DM, Griffioen AW, van Engeland M (2007): Dual Targeting of Epigenetic Therapy in Cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1775 / 1: 76 – 91

Hesson LB, Cooper WN, Latif F (2007): The role of RASSF1A methylation in cancer. *Dis. Markers* 23 / 1 – 2:73 – 87

Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Jänicke F, Sauter G, Simon R (2007): Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nature genetics.* 39 / 5: 655 – 60

Jablonska E, Lamb MJ (2002): The Changing Concept of Epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences* 981: 82 – 96

Jotsuka T. et al. (2004): Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery* 135/4: 419 – 26

Jhaveri MS, Morrow CS (1998): Methylation-mediated regulation of the glutathione S-transferase P1 gene in human breast cancer cells. *Gene* (03/27) 210 /1: 1 – 7

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 14-3-3sigma in serum of sporadic breast cancer patients. *Onkologie* 30(1-2): 14 – 9

Karpf AR (2007): Epigenomic reactivation screening to identify genes silenced by DNA hypermethylation in human cancer. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 3: 231 – 41

Knudson AG (1971): Mutation and Cancer. Statistical Study of Retinoblastoma. *National Academy of Sciences* 68 / 4: 820 – 823

Ko E, Kim Y, Kim SJ, Joh JW, Song S, Park CK, Park J, Kim DH (2008): Promoter hypermethylation of the p16 gene is associated with poor prognosis in recurrent early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(9): 2260 – 7

Koyanagi K, Mori T, O'Day SJ, Martinez SR, Wang HJ, Hoon DSB (2006): Association of Circulating Tumor Cells with Serum Tumor-related Methylated DNA in Peripheral Blood of Melanoma Patients. *Cancer Research* 66/12: 6111 – 6117

Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, Dobrovic A (2008): Sensitive Melting Analysis after Real Time-Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res.* 36/7: e42

Lee (2007): GSTP1 promoter hypermethylation is an early event in breast carcinogenesis. *Virchows Archiv.* 450/6: 637 – 42

Li S, Rong M, Iacopetta B (2006): DNA hypermethylation in breast cancer and its association with clinicopathological features. *Cancer Lett.* 237(2): 272 – 80

Liu Z, Yang L, Cui DX, Liu BL, Zhang XB, Ma WF, Zhang Q (2007): Methylation status and protein expression of adenomatous polyposis coli (APC) gene in breast cancer. *Chinese Journal of Cancer (Ai Zheng)* 26/6: 586 – 90

Liu MC, Choong DY, Hooi CS, Williams LH, Campbell IG (2007): Genetic and epigenetic analysis of the TIMP-3 gene in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 247/1: 91 – 7

Lower EE, Glass E, Blau R, Harman S (2008): HER-2/neu expression in primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* Feb 14

Matuschek C, Bölke E, Lammering G, Gerber PA, Peiper M, Budach W, Taskin H, Prisack HB, Schieren G, Orth K, Bojar H (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(7): 277 – 86

Million Women Study Collaborators (2003): Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *The Lancet* 362: 419 – 427

Mirza S, Sharma G, Prasad CP, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R (2007): Promoter hypermethylation of TMS1, BRCA1, ERalpha and PRB in serum and tumor DNA of invasive ductal breast carcinoma patients. *Life Sci.* 81(4): 280 – 7

Mittendorf EA, Holmes JP, Ponniah S, Peoples GE (2008): The E75 HER2/neu peptide vaccine. *Cancer Immunology Immunotherapy*

Miyamoto K, Ushijima T (2005): Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Japanese journal of clinical oncology* 35/6: 293 – 301

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 Research* 63: 7641 – 7645

Okegawa T, Nutahara K, Higashihara E (2010): Association of circulating tumor cells with tumor-related methylated DNA in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Int J Urol.* 17(5): 466 – 75

Oliveira AM, Ross JS, Fletcher JA (2005): Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol.* 124 Suppl: 16 – 28

Paluszczak J, Baer-Dubowska W (2006): Epigenetic diagnostics of cancer – the Application of DNA methylation markers. *J Appl Genet.* 47(4): 635 – 375

Patel H. et al. (2002): Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer." *Ann Surg* 235/2: 226 – 3

Parrella P, Poeta ML, Gallo AP, Prencipe M, Scintu M, Apicella A, Rossiello R, Liguoro G, Seripa D, Gravina C, Rabitti C, Rinaldi M, Nicol T, Tommasi S, Paradiso A, Schittulli F, Altomare V, Fazio VM (2004): Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. *Clinical Cancer Research*. 10 (16): 5349 – 54

Prasad CP, Mirza S, Sharma G, Prashad R, DattaGupta S, Rath G, Ralhan R (2008): Epigenetic alterations of CDH1 and APC genes: relationship with activation of Wnt/beta-catenin pathway in invasive ductal carcinoma of breast. *Life Sci*. 83/9-10 :318 – 25

Rønneberg JA, Tost J, Solvang HK, Alnaes GI, Johansen FE, Brendeford EM, Yakhini Z, Gut IG, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Gabrielsen OS, Kristensen VN (2008): GSTP1 promoter haplotypes affect DNA methylation levels and promoter activity in breast carcinomas. *Cancer Res*. 68(14): 5562 – 71

Roa JC, Anabalon L, Tapia O, Martínez J, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Roa I. (2004): Promoter methylation profile in breast cancer. *Rev Med Chil*. 132 / 9:1069 – 77

Robert Koch Institut (2006): Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. Hrsg.: Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 5. Aufl. Saarbrücken. 52 – 55

Schindler JF (2004): BRCA1 / BRCA2 Mutationen. Auch bei Männern ist das familiäre Krebsrisiko drastisch erhöht. *andrologien.info* 2: 36 – 38

Schinzaki M, Hoon DSB, Giuliano AE, Hansen NM, Wang HJ Turner R, Taback B (2004): Distinct Hypermethylation Profile of Primary Breast Cancer Is Associated with Sentinel Lymph Node Metastasis. *Clinical Cancer Research* 11: 2156 – 2162

Schnakenberg E, Krasemann E, Kleeberg UR (2006): Nachweis zirkulierender Tumorzellen für die Prognose, Diagnostik und Therapie unter besonderer Berücksichtigung des Mammakarzinoms. *Deutsche Zeitschrift für Onkologie* 3 8: 123 – 128

Semmes OJ (2003): A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. *Clinical Breast Cancer*. Aug. 4 / 3: 203 – 9

Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R (2006): Detection of RASSF1A and RARBeta hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. *Epigenetics* 1/2: 88 – 93

Singal R, Ginder GD (1999): Blood: DNA -Methylation. 93 / 12: 4059 – 70

Sinha S, Chunder N, Mukherjee N, Alam N, Roy A, Roychoudhury S, Kumar Panda C (2008): Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2008 Apr;15/4: 1070 – 80

Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR (2008): Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 14(9): 2560 – 9

Suga Y, Miyajima K, Oikawa T, Maeda J, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Uchida O, Tsuboi M, Hirano T, Kato H, Ikeda N (2008): Quantitative p16 and ESR1 methylation in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 20(5): 1137 – 42

Szyf M (2005): DNA Methylation and Demthylation as Targets for Anticancer Therapy. *Biochemistry* 70 / 5: 533 – 549

Tapia T, Smalley SV, Kohen P, Muñoz A, Solis LM, Corvalan A, Faundez P, Devoto L, Camus M, Alvarez M, Carvallo P (2008): Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. *Epigenetics*. 3: 157 – 63

Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM (2002): European Network of Cancer Registries. International Agency for Research on Cancer: Cancer Fact Sheets. *Breast Cancer in Europe* 2: 1 – 4

Van der Auwera I, Elst HJ, Van Laere SJ, Maes H, Huget P, Van Dam P, Van Maerck EA, Vermeulen PB, Dirix LY (2009): The presence of circulating total DNA and methylated genes is associated with circulating tumor cells in blood from breast cancer patients. *British Journal of Cancer* 100: 1277 – 1286

Vainio H (2002): IARC (International Agency for Research on Cancer): Handbook of Cancer Prevention. Breast Cancer Screening 7: 144 – 179

Vlahou A, Laronga C, Wilson L, Gregory B, Fournier K, McGaughey D, Perry RR, Wright GL Jr, Semmes OJ (2003): A novel approach toward development of a rapid blood test for breast cancer. Clin Breast Cancer 4(3): 203 – 9

Wajed SA, Laird P, DeMeester TR (2001): DNA Methylation: An Alternative Pathway to Cancer. Annals of Surgery 234 / 1: 10 – 20

Wei M, Xu J, Dignam J, Nanda R, Sveen L, Fackenthal J, Grushko TA, Olopade OI (2008): Estrogen receptor alpha, BRCA1, and FANCF promoter methylation occur in distinct subsets of sporadic breast cancers. Breast Cancer Res Treat. 111(1): 113 – 20

Widschwendter M, Jones PA (2002): DNA methylation an breast carcinogenesis. Oncogene 21: 5462 – 5482

Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, Marth C, Muller-Holzner E, Jones PA, Laird PW (2004): Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. Cancer Research 64: 3807 – 3813

Widschwendter A, Gatringer C, Ivarsson L, Fiegl H, Schneitter A, Ramoni A, Müller HM, Wiedemair A, Jerabek S, Müller-Holzner E, Goebel G, Marth C, Widschwendter M (2004): Analysis of aberrant DNA methylation and human papillomavirus DNA in cervicovaginal specimens to detect invasive cervical cancer and its precursors. Clin Cancer Research 10/10: 3396 – 400

Wittekind CH, Hutter R, Greene FL, Klimpfinger M, Sobin LH (2005): TNM Atlas. Illustrated Guide to the Classification of Malignant Tumors 5th edition

Zhang JJ, Ouyang T, Wan WH, Xu GW, Deng GR (2007): Detection and significance of APC gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. Ai.Zheng. 2007 (26): 44 – 47

Zieglschmid V, Hollmann C, Gutierrez B, Krehan A, Kaul S, Böcher O (2007): Heterogeneous expression of tumor-associated genes in disseminated breast cancer cells. Anticancer Research 27 / 4A: 1769 – 76

Zugmaier G, Knabbe C, Aigner A (2003): Das Mammakarzinom-Risikofaktoren, Prognose und medikamentöse Therapie. Die Medizinische Welt 54 / 4: 96 – 0

INTERNETVERZEICHNIS

Dammann H (2004): Isolation, Charakterisierung und Funktion des Ras Assoziationsdomänen Familie 1 Gens aus dem Tumorsuppressionslocus 3p21.3 mit besonderer Berücksichtigung seiner epigenetischen Inaktivierung in humanen Tumoren

http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=974107239&dok_nam=abstract&dok_ext=htm&filename=974107239.htm [08.04.2008]

DGS (2007): Brustkrebsstudien – Forschung für Betroffene. Deutsche Gesellschaft für Senologie (DGS), Brustzentrum Tübingen. http://www.brustkrebs-studien.de/ratgeber_brustkrebs.html [18.08.2007]

Deutsche Krebshilfe (2004):

http://www.innovations-report.de/html/berichte/medizin_gesundheit/bericht-27826.html [11.06.2008]

Epigenomics (2007): MethyLight. <http://www.epigenomics.de/de/wissenschaft-und-technik/amplifikation/> [19.09.2007]

Gratchev A (2008): Analysis of DNA methylation using bisulphite sequencing. Methods.info. http://www.methods.info/Methods/DNA_methylation/Bisulphite_sequencing.html [15.07.2007]

Kemper G (2007): Fakten und Zahlen zu Brustkrebs. <http://www.bcaction.de/03info/fakten.htm> [19.07.2007]

Tsuruma T, Iwayama Y, Ohmura T, Katsuramaki T, Hata F, Furuhashi T, Yamaguchi K, Kimura Y, Torigoe T, Toyota N, Yagihashi A, Hirohashi Y, Asanuma H, Shimozawa K, Okazaki M, Mizushima Y, Nomura N, Sato N, Hirata K (2008): Clinical and immunological evaluation of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine in phase I clinical study for patients with advanced or recurrent breast cancer. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=18471305> [19.06.2008]

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abb. 1: Übersicht Risikofaktoren Brustkrebs</i>	3
<i>Abb. 2: Two – Hit – Theorie (nach Schindler 2004)</i>	12
<i>Abb. 3: Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin (Wajed et al. et al. 2001)</i>	13
<i>Abb. 4: Die Rolle der DNA-Methylierung bei der Entstehung von Krebs (Wajed et al. et al. 2001)</i>	15
<i>Abb. 5: Klinische Relevanz der DNA-Methylierung</i>	21
<i>Abb. 6: Entstehungsprozess von Metastasen</i>	25
<i>Abb. 7: Mögliche Quellen im Blut zirkulierender tumorspezifischer DNA</i>	26
<i>Abb. 8: Prinzip TaqMan Sonden (Epigenomics 2007):</i>	28
<i>Abb. 9: Validierung mittels Zelllinien</i>	38
<i>Abb. 10: Validierung mittels artifiziell methylierter DNA</i>	38
<i>Abb. 11: Untersuchung der Patienten-DNA aus Serum</i>	39
<i>Abb. 12: DNA-Standardkurve</i>	44
<i>Abb. 13: Bisulfit Modifikation (nach Gratchev 2008)</i>	45
<i>Abb. 14: PCR-Signale der RASSF 1-Sonde bei unterschiedlichem Grad der Verdünnung</i>	54
<i>Abb. 15: PCR-Signale der ACTB-Sonde bei unterschiedlichem Grad der Verdünnung</i>	54
<i>Abb. 18: Methylierung des APC bei Patienten und KG</i>	58
<i>Abb. 19: Methylierung des RASSF1 bei Patienten und KG</i>	59
<i>Abb. 20: Methylierung des GST bei Patienten und KG</i>	59
<i>Abb. 21: Methylierung des ESRI bei Patienten und KG</i>	60
<i>Abb. 22: Methylierung des p16 bei Patienten und KG</i>	60
<i>Abb. 23: Methylierung von APC oder RASSF1 bei Patienten und KG</i>	61
<i>Abb. 24: Mindestens 1 Gen positiv bei Patienten und KG</i>	62
<i>Abb. 25: Mindestens 2 Gene positiv bei Patienten und KG</i>	62
<i>Abb. 26: Korrelationen der Methylierung zur TumorgroÙe</i>	64
<i>Abb. 27: Korrelation der Methylierung zum Lymphknotenbefall</i>	65
<i>Abb. 28: Korrelation der Methylierungsmuster zum Metastasierungsstatus</i>	66
<i>Abb. 29: Korrelation der Methylierungsmuster zum Grading</i>	67
<i>Abb. 30: Korrelation der Methylierungsmuster zum Grading</i>	68
<i>Abb. 31: Korrelation der Methylierungsmuster zum Östrogenrezeptorstatus</i>	69
<i>Abb. 32: Korrelation der Methylierungsmuster zum Progesteronrezeptorstatus</i>	70
<i>Abb. 33: Korrelation der Methylierungsmuster zum Her-2/neu-Status</i>	71
<i>Abb. 34: Korrelation der Methylierungsmuster zum CA 15 – 3 Status</i>	72
<i>Abb. 35: Korrelation der Methylierungsmuster zur histologischen Tumorart</i>	73
<i>Abb. 36: Korrelation der Methylierungsmuster zum Alter</i>	74
<i>Abb. 37: Korrelation der Methylierungsmuster zur Diagnoseart (Primärtumor (ED) / Rezidiv (RD))</i>	75
<i>Abb. 38: Korrelation des APC mit CTCs</i>	76
<i>Abb. 39: Korrelation des RASSF1 mit CTCs</i>	77
<i>Abb. 40: Korrelation des GSTP1 mit CTCs</i>	77

<i>Abb. 41: Korrelation des ESRI mit CTCs</i>	78
<i>Abb. 42: Korrelation von APC und RASSF1 mit CTCs</i>	78
<i>Abb. 43: Korrelation von APC und GSTP1 mit CTCs</i>	79
<i>Abb. 44: Korrelation der Genkombination Min-1 mit CTCs</i>	79
<i>Abb. 45: Korrelation der Genkombination Min-2 mit CTCs</i>	80

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Brustkrebs assoziierte Gene mit irregulärem Methylierungsstatus	17
Tab. 2: Staging des Patientenkollektivs	32
Tab. 3: AJCC-Klassifizierung	33
Tab. 4: Grading (Differenzierungsgrad)	34
Tab. 5: Angewandte Schemata der Chemotherapie	35
Tab. 6: Verwendete Primersequenzen und Sonde (vgl. Widschwendter et al. 2004)	48
Tab. 7: Methylierungsnachweis anhand von Zelllinien und SssI-methylierter PBL-DNA.	52
Tab. 8: Vergleich der Mittelwerte der DNA-Konzentrationen zwischen Patientinnen und Kontrollpersonen	56
Tab. 9: Vergleich der Mittelwerte der DNA-Konzentrationen zwischen Erstdiagnosen und Rezidiven	57
Tab. 10: Methylierung des APC bei Patienten und KG	58
Tab. 11: Methylierung des RASSF1 bei Patienten und KG	59
Tab. 12: Methylierung des GSTP1 bei Patienten und KG	59
Tab. 13: Methylierung des ESR1 bei Patienten und KG	60
Tab. 14: Methylierung des CDKN2 bei Patienten und KG	60
Tab. 15: Methylierung von APC oder RASSF1 bei Patienten und KG	61
Tab. 16: Min-1 bei Patienten und KG	62
Tab. 17: Min-2 bei Patienten und KG	62
Tab. 18: Kreuztabellenanalyse der Korrelation des Methylierungsstatus der relevanten Gene.	63
Tab. 19: Korrelation des APC mit CTCs	76
Tab. 20: Korrelation des RASSF1 mit CTCs	77
Tab. 21: Korrelation des GSTP1 mit CTCs	77
Tab. 22: Korrelation des ESR1 mit CTCs	78
Tab. 23: Korrelation von APC und RASSF1 mit CTCs	78
Tab. 24: Korrelation des APC und GSTP1 mit CTCs	79
Tab. 25: Korrelation der Genkombination Min-1 mit CTCs	79
Tab. 26: Korrelation der Genkombination Min-2 mit CTCs	80

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
A	Ateria / Arterie
Abb	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
APC	adenomatous polyposis coli / Brustkrebsassoziiertes Tumorsuppressorgen
AVE – Puffer	RNase freies Wasser + 0,04 % Natriumazid
BRCA1	Breast Cancer 1 Gene / Brustkrebsassoziiertes Tumorsuppressorgen 1
BRCA2	Breast Cancer 2 Gene / Brustkrebsassoziiertes Tumorsuppressorgen 2
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
^{5m} C	5-Methylcytosin
ca	circa
Ca 15-3	Cancer Antigen 15-3 / Mucin 1 / MUC 1 (Tumormarker)
CDH – 1	E – Cadherin / Brustkrebsassoziiertes Tumorsuppressorgen
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A ,(Syn.: p16) / Brustkrebsassoziiertes Tumorsuppressorgen
c-erbB2	cellular avian erythroblastosis homologue B2
–CH ₃	Methylgruppe
CIS	Carcinoma In Situ
CO ₂	Kohlendioxid
CTCs	circulating tumorcells / zirkulierende Tumorzellen
DAP – Kinase	death – associated protein kinase / Brustkrebsassoziiertes Tumorsuppressorgen
DNA	Desoxyribonucleinacid / Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DTC	dissaminated tumor cells / disseminierte Tumorzellen
ED	Erstdiagnose

EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ER-Status	Estrogenreceptor-Status / Östrogenrezeptor-Status
EtOH	Ethanol
Fa	Firma
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanin
GA 733-2	Tumorassoziertes Antigen (epitheliale Gewebe)
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GSTP1	Gluthation-S-Transferase pi 1 Gen
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HDAC	Histon-Deacetylase
Her-2/neu	human epidermal growth receptor 2
HHUD	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
HNPCC	Hereditäres Non-Polypöses Kolorektal Karzinom
ipsi	ipsilateral (seitengleich)
JÜR	Überlebensrate von Krebspatienten in Jahren
l	Liter
LK	Lymphknoten
m	Meter
m	milli (10 ⁻³)
M	Mol / Molar
max	maximal
MDB	Methyl-CpG binding domain / Meythylierungsspezifische Bindungsstelle
Min / min	Minute(n)
mind	mindestens
MRT	Magnet-Resonanz-Tomografie / Kernspintomografie

M-Status	Mestastasierungs-Status / Status der Fernmetastasierung
MUC1	Tumorassoziertes Antigen (epitheliale Gewebe)
NaOH	Natriumhydroxid
N-Status	Nodal-Status / Status des Lymphknotenbefalls
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction / Polymerase Kettenreaktion
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate Buffered Saline / Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PR-Status	Progesteronrezeptor-Status
RASSF1A	RAS association domain family protein 1A / Brustkrebsassoziertes Tumorsuppressorgen
RD	Rezidivdiagnose
RT-PCR	Realtime Polymerase Chain Reaction / Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonucleinacid / Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur (15-25 °C)
s	Sekunde(n)
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences / Statistikprogramm
Tab	Tabelle
TE-Puffer	Tris – HCl + EDTA
TIMP-3	Tissue inhibitor MP-3 / Brustkrebsassoziertes Tumorsuppressorgen
TRD	transcriptional repression domain
TSA	Trichostatin A / Histondeacetylase-Hemmer
T-Status	Tumorstatus / Status des Primärtumors
U	Units
u/o	und / oder
x	-fach
μ	mikro (10 ⁻⁶)

LEBENS LAUF

ANGABEN ZUR PERSON

Name	Handan Sürmen (geb. Taskin)
Geburtsdatum	01.05.1980
Geburtsort	Mülheim an der Ruhr
Staatsangehörigkeit	deutsch
Sprachen	Deutsch, Türkisch, Englisch großes Latinum, Französisch, Spanisch

BERUFSPRAXIS

10/2009 – heute	Assistenzärztin der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Städtischen Kliniken Köln (<i>Krankenhaus Merheim/Klinikum der Universität Witten/Herdecke</i>)
10/2008 – 10/2009	Assistenzärztin der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin und Palliativmedizin (<i>Klinikum Aschaffenburg/ Lehrkrankenhaus der Universität Würzburg</i>)

PRAKTISCHES JAHR

02/2007	Approbation als Ärztin
10/2005 – 09/2006	Praktisches Jahr (<i>Ev. Krankenhaus Mülheim an der Ruhr</i>) <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Tertial</u> Anästhesie / Intensivmedizin / Schmerztherapie 2. <u>Tertial</u> Innere Medizin / Kardiologie 3. <u>Tertial</u> Chirurgie / Gefäßchirurgie

STUDIUM

04/2000 – 11/ 2006	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf (<i>HHUD</i>)
11/2006	III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005	II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/2003	I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2002	Ärztliche Vorprüfung

FAMULATUREN & PRAKTIKA

25.07.2000 – 25.08.2000	Pflegepraktikum (<i>Universitätsklinik Düsseldorf</i>) Institut für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
10.08.2001 – 01.10.2001	Pflegepraktikum Poliklinik Staatliches Krankenhaus Manyas (<i>Türkei</i>)
05.08.2002 – 05.09.2002	Famulatur Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie (<i>HHU Düsseldorf</i>)
21.02.2003 – 24.03.2003	Famulatur Kinderonkologische Station (<i>HHU Düsseldorf</i>)
15.09.2003 – 28.09.2003	Hospitation im Krankenhaus Josefinum (<i>Augsburg</i>) Abteilung Frauenheilkunde und Geburtshilfe
24.02.2004 – 10.03.2004	Famulatur Innere Medizin/Schwerpunkt Tropenmedizin Gemeinschaftspraxis Dres. Rieke/Rieke (<i>Düsseldorf</i>)
14.02.2005 – 24.03.2005	Famulatur Institut für Onkologische Chemie (<i>HHU Düsseldorf</i>)

SCHULBILDUNG

1996 – 1999	Luisenschule – Gymnasium an den Buchen (<i>Mülheim/Ruhr</i>) <u>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife</u>
1990 – 1996	Otto-Pankok-Gymnasium (<i>Mülheim/Ruhr</i>)
1986 – 1990	Erich-Kästner Grundschule (<i>Mülheim/Ruhr</i>)

Stockstadt, 01.12.2010

(Handan Sürmen)

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen Personen, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben, meinen Dank bekunden.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Professor Dr. med. H. Bojar für die freundliche Überlassung des Themas, welche diese Arbeit erst ermöglicht hat. Die wissenschaftliche Betreuung, sein fortwährendes Interesse an der Studie und das Vertrauen in mein selbstständiges Arbeiten waren mir eine große Hilfe und Motivation.

Ein immens großer Dank gilt meinem verlässlichen Betreuer Herrn Dr. H.B. Prisack für die jahrelange enge und kompetente Zusammenarbeit. Er stand mir stets in allen Fragen hilfreich mit Anregungen und Ratschlägen zur Seite. Insbesondere bin ich ihm für seine Mühen bei der Durchsicht meines Manuskripts und konstruktive Kritik äußerst dankbar.

Des Weiteren sei allen Mitarbeitern des Instituts für Onkologische Chemie, insbesondere für die Hilfen im Labor, aufrichtig gedankt.

Für den Zugriff auf die Patientendaten und die Blutseren sowie die darüber hinausgehende Kooperation danke ich herzlich PD Dr. med. E. Bölke und seinen Mitarbeitern der Klinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie der Universitätsklinik Düsseldorf.

Ein besonderes Dankeschön gilt den untersuchten Patientinnen und gesunden Probanden bei der selbstlosen Mitwirkung in dieser Studie durch die Einwilligung zur Verwendung ihrer Blutproben und Daten.

Meinen lieben Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht und mich immer unterstützt haben. Meinem Ehemann Cahit Sürmen danke ich für inspirierende Diskussionen und geduldige Unterstützung...

...und zu guter Letzt danke ich meinen beiden Kindern Batu und Ela für ihr unvergleichlich Energie spendendes Lachen.

Ebenso sei all denen gedankt, die hier namentlich keine Erwähnung finden, aber zur Vollendung dieser Arbeit beigetragen haben.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Handan Sürmen, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter oder der Inanspruchnahme eines Promotionsberaters und nur mit den angegebenen Quellen angefertigt habe.

Ich erkläre, dass die Dissertation bisher noch keiner Universität oder Hochschule vorgelegt wurde.

Stockstadt, den 01.12.2010

(Handan Sürmen)