

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Tanja Fehm

**Detektion therapierelevanter onkogener Mutationen in zirkulierender
Tumor-DNA (ctDNA) aus dem peripheren Blut von Patientinnen mit
metastasiertem Mammakarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Pauline Sophie Schmidt

2026

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. med. Tanja Fehm

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Guido Reifenberger

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung der Frau dar. Mit 75-80 % ist die Mehrheit der Tumoren hormonrezeptorpositiv (HR-positiv), sodass als Standardtherapie eine zielgerichtete endokrine Therapie (ET), häufig mittels Aromataseinhibitoren (AI), eingesetzt wird. Initial zeigt diese in der Regel eine gute Wirksamkeit, jedoch entwickelt ein Großteil der Patientinnen im Laufe der Erkrankung eine sekundäre Resistenz, welche mit einem Therapieversagen und einer ungünstigeren Prognose einhergeht. Als Hauptmechanismus werden aktivierende Mutationen im *ESR1*-Gen angesehen, die eine konstitutive Liganden-unabhängige Aktivität des Östrogenrezeptors α (ER α) zur Folge haben und die Wirkung antiöstrogener Therapien erheblich reduzieren. Studien haben gezeigt, dass der Nachweis von *ESR1*-Mutationen als prädiktiver Biomarker dienen kann, um zielgerichtete Behandlungsstrategien einzusetzen. Da eine traditionelle Gewebebiopsie invasiv und meist nur eingeschränkt wiederholbar ist, gewinnt die *Liquid Biopsy* (LB) in diesem Zusammenhang zunehmend an Bedeutung. Durch die Analyse von tumorspezifischen Merkmalen im Blut, wie z.B. der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA), ermöglicht die LB eine nicht-invasive, wiederholbare Probenentnahme und bildet die genetische Heterogenität des Tumors teilweise besser ab als eine einzelne Gewebebiopsie.

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Etablierung einer Methode zum Nachweis von *ESR1*-Mutationen in der ctDNA aus Blutplasma von Patientinnen mit ER-positivem/HER2-negativem (ER+/HER2-) metastasierten Brustkrebs (MBC). Dazu wurde das sensitive Verfahren der *droplet digital PCR* (ddPCR) eingesetzt und ein Multiplex-Assay zur Detektion von Mutationen in zwei Hotspots im *ESR1*-Gen (E380Q, L536P, Y537C, Y537N, Y537S und D538G) angewendet. Initial erfolgte die Extraktion von ctDNA aus Blutplasma von 78 Probandinnen mit ER+/HER2- MBC der PRAEGNANT-Studie (NCT02338167).

Bei etwa einem Drittel der Patientinnen wurde mindestens eine *ESR1*-Mutation nachgewiesen. Der detektierte *ESR1*-Mutationsstatus entspricht der in der Literatur berichteten Mutationsrate. In der Aufarbeitung der klinischen Daten zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Korrelationen zwischen einem positiven *ESR1*-Mutationsstatus und den erhobenen klinisch-pathologischen Faktoren.

Es wurde ein Multiplex-ddPCR-Assay zur Detektion von *ESR1*-Mutationen in ctDNA etabliert, das für den klinischen Einsatz als Screening-Verfahren genutzt werden könnte. Insbesondere der Einsatz von LB zur Detektion von Biomarkern und zum Therapiemonitoring, wie durch die Zulassung von Elacestrant auf Basis vom *ESR1*-Mutationsnachweis in ctDNA belegt, erweist sich als sehr vielversprechend. Für statistisch signifikante Aussagen und ein tieferes Verständnis der Resistenzmechanismen sind jedoch größere Patientinnenkohorten, die Untersuchung weiterer Biomaterialien (z.B. Tumorgewebe, zirkulierende Tumorzellen (CTC)) und die Differenzierung einzelner *ESR1*-Mutationstypen in zukünftigen Studien erforderlich.

Summary

Breast cancer is the most common cancer in women. Approximately 75-80 % of tumours are hormone receptor-positive (HR-positive). As a result, targeted endocrine therapy (ET), often using aromatase inhibitors (AI), is used as standard therapy. Initially, this usually shows good efficacy, however most patients develop secondary resistance during the course of the disease, which is associated with treatment failure and a less favourable prognosis. The key mechanism is considered to be activating mutations in the *ESR1* gene, which result in constitutive ligand-independent activity of the estrogen receptor α (ER α) and significantly reduce the effect of anti-estrogen therapies. Studies have demonstrated that the detection of *ESR1* mutations can serve as a predictive biomarker to utilise targeted treatment strategies. As a traditional tissue biopsy is invasive and usually only repeatable to a limited extent, liquid biopsy (LB) is gaining increasing importance. By analysing tumour-specific components in the blood, such as circulating tumour DNA (ctDNA), LB enables non-invasive, repeatable sampling and in some cases better reflects the genetic heterogeneity of the tumour than a single tissue biopsy.

The aim of this doctoral thesis was to establish a method for detecting *ESR1* mutations in the ctDNA from blood plasma of patients with ER-positive/HER2-negative (ER+/HER2-) metastatic breast cancer (MBC). For this purpose, the sensitive method of droplet digital PCR (ddPCR) was used and a multiplex assay was applied to detect mutations in two hotspots in the *ESR1* gene (E380Q, L536P, Y537C, Y537N, Y537S and D538G). Initially, ctDNA was extracted from the blood plasma of 78 patients with ER+/HER2- MBC from the PRAEGNANT study (NCT02338167).

At least one *ESR1* mutation was detected in about one third of the patients. The detected *ESR1* mutation status corresponds to the mutation rate reported in the literature. However, the analysis of the clinical data showed no statistically significant correlations between a positive *ESR1* mutation status and the clinical-pathological factors recorded.

A multiplex ddPCR assay for the detection of *ESR1* mutations in ctDNA was successfully established, which could be used for clinical application as a screening method. In particular, the use of LB for the detection of biomarkers and for therapy monitoring, as demonstrated by the authorisation of Elacestrant on the basis of *ESR1* mutation detection in ctDNA, is proving to be very promising. However, for statistically significant statements and a deeper understanding of the resistance mechanisms, larger patient cohorts, the examination of further biomaterials (e.g. tumour tissue, circulating tumour cells (CTC)) and the differentiation of individual *ESR1* mutation types are required in future studies.

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>Amino acid</i> , Aminosäure
AGO	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie
AI	Aromataseinhibitor
AKT1	AKT Serin/Threonin-Kinase 1
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BC	<i>Breast cancer</i> , Brustkrebs
BEAMing	<i>Beads, emulsion, amplification, and magnetics</i>
BET	Brusterhaltende Therapie
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
bp	Basenpaar
<i>BRCA1/2</i>	<i>BReast CAancer Gene 1/2</i>
CDK4/6-Inhibitor	Cyclin-abhängige Kinase 4/6-Inhibitor
cfDNA	<i>Circulating cell-free DNA</i>
CNV	<i>Copy number variation</i>
CTC	<i>Circulating tumor cell</i>
ctDNA	<i>Circulating tumor DNA</i>
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddPCR	<i>Droplet digital PCR</i>
DFS	<i>Disease free survival</i>
DGGG	Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
DKG	Deutsche Krebsgesellschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNGS	<i>Digital next-generation sequencing</i>
EAT	Erweiterte adjuvante endokrine Therapie
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , Europäische Arzneimittelagentur
ER	<i>Estrogen receptor</i> , Östrogenrezeptor
<i>ERBB2-Gen</i>	<i>V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
<i>ESR1</i>	<i>Estrogen receptor 1</i>
ET	Endokrine Therapie
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fw	<i>Forward</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing-Hormon</i>
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HR	Hormonrezeptor
Ki-67	Kiel-Antigen Nr. 67
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i>

LB	<i>Liquid Biopsy</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
MAF	<i>Mutant allele frequency</i>
MBC	<i>Metastatic breast cancer</i>
miRNA	<i>MicroRNA</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
NSCLC	<i>Non-small-cell lung cancer</i> , nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NTD	N-terminale Domäne
OS	<i>Overall survival</i> , Gesamtüberleben
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFS	<i>Progression-free survival</i> , Progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin homolog</i>
rv	<i>Reverse</i>
SERD	<i>Selective estrogen receptor degrader</i>
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulator</i>
SNLE	Sentinel-Lymphonodektomie
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Prognostische und prädiktive Faktoren	2
1.1.4	Das metastasierte Mammakarzinom	3
1.2	Östrogenrezeptoren	4
1.2.1	Aufbau und Funktion	4
1.3	Therapie des Mammakarzinoms	5
1.3.1	Endokrine Therapie	6
1.3.2	Endokrine Therapie des HR-positiven/HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinoms	7
1.4	Endokrine Resistenz	9
1.4.1	Resistenzmechanismen	9
1.4.2	<i>ESR1</i> -Mutationen	10
1.5	Liquid Biopsy	12
1.6	Zirkulierende Tumor-DNA	14
1.7	Droplet Digital PCR	15
1.8	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Patientinnenkollektiv	20
2.1.2	Zelllinien und Nukleinsäuren	20
2.1.3	Puffer	21
2.1.4	Kits	21
2.1.5	Allgemeines Labormaterial und Geräte	21
2.1.6	Primer und Oligonukleotide	22
2.1.7	Droplet Digital PCR	22
2.1.8	Software	23

2.2	Methoden	23
2.2.1	Blutentnahme	23
2.2.2	Extraktion von cfDNA aus Plasma	24
2.2.3	<i>Droplet Digital PCR</i>	25
2.2.4	Bestimmung einer Leerwertgrenze und Nachweisgrenze	32
2.2.5	Auswertung <i>QuantaSoft</i> -Software	32
2.2.6	Statistik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Etablierung eines ddPCR-Assays zur Detektion von <i>ESR1</i> -Mutationen in ctDNA	35
3.2	Patientinnenkollektiv	36
3.2.1	Altersverteilung	36
3.2.2	Klinisch-pathologische Daten zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme	37
3.3	Detektion von <i>ESR1</i> -Mutationen	39
3.3.1	Leerwertgrenze und Nachweisgrenze	39
3.3.2	Nachweis von <i>ESR1</i> -Mutationen	40
3.3.3	Ergebnisse der ddPCR	46
3.4	Korrelation des <i>ESR1</i> -Mutationsstatus mit klinisch-pathologischen Faktoren	47
3.5	Kaplan-Meier Überlebenskurven	49
3.5.1	Gesamtüberleben	49
3.5.2	Progressionsfreies Überleben	50
4	Diskussion	52
4.1	<i>ESR1</i> -Mutationsstatus	52
4.2	Fragestellungen zur Methodik	52
4.2.1	<i>ESR1</i> -Mutationsnachweis in ctDNA	52
4.2.2	ddPCR vs. NGS	57
4.2.3	Optimierung des Multiplex-ddPCR-Assays	58
4.3	Diskussion der Ergebnisse	60
4.3.1	<i>ESR1</i> -Mutationsstatus	60

4.3.2	Polyklonalität.....	60
4.3.3	Diskussion der Korrelation des <i>ESR1</i> -Mutationsstatus mit klinisch-pathologischen Faktoren.....	62
4.4	Limitationen der Arbeit	65
4.5	Schlussbetrachtung und Ausblick	66
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	68
5.1	Tabellenverzeichnis	68
5.2	Abbildungsverzeichnis	68
5.3	Literaturverzeichnis.....	70
6	Anhang.....	79

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist mit über 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr die häufigste bösartige Krebserkrankung der Frau in Deutschland. Es stellt damit einen Anteil von knapp einem Drittel aller jährlich erstmalig diagnostizierten Krebserkrankungen bei Frauen dar. Jede achte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Das Lebenszeitrisko beträgt somit über 12 %.

Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Ein Drittel der Patientinnen erkrankt jedoch schon im Alter von unter 55 Jahren. Nur 1 % aller Neuerkrankungen betrifft Männer. (1)

Während zum Zeitpunkt der Diagnose bei etwa 6 % der Patientinnen bereits eine Metastasierung vorliegt, entwickeln weitere 20-30 % im Laufe der Erkrankung Metastasen (2). Bei Vorliegen einer Fernmetastasierung ist die Erkrankung nicht mehr heilbar (3, 4).

Im Jahr 2020 starben in Deutschland etwa 18.400 Frauen an den Folgen einer Brustkrebserkrankung. Dies ist ein Anteil von 17,6 % aller Krebssterbefälle bei Frauen und somit ist Brustkrebs die am häufigsten zum Tode führende Krebserkrankung. (1)

Während die Inzidenz von Brustkrebserkrankungen steigt, zeigt sich die Mortalitätsrate seit Ende der 1990er Jahre jedoch rückläufig. Dies ist auf die Einführung von Früherkennungsmaßnahmen und die weiterentwickelten diagnostischen und operativen Verfahren sowie auf Fortschritte in der Therapie zurückzuführen. (1)

1.1.2 Ätiologie

Die Entstehung des Mammakarzinoms ist sehr komplex und bis heute nicht vollständig verstanden. Die Genese der Erkrankung wird auf eine Kombination von genetischen Einflüssen, Umwelt- und Lebensstilfaktoren zurückgeführt. Zu den wesentlichen Risikofaktoren zählen das weibliche Geschlecht, ein hohes Alter, der hormonelle Status und eine genetische Prädisposition. (1)

Eine Exposition gegenüber Östrogenen und anderen Hormonen wird mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert. Eine frühe Menarche, späte Menopause, Kinderlosigkeit und eine Hormonersatztherapie erhöhen das Erkrankungsrisiko. (1)

Zu den bekanntesten genetischen Risikofaktoren zählen Mutationen in den *BRCA1*- und *BRCA2*-Genen (*breast cancer gene* 1/2), welche jedoch nur in 5 % aller Brustkrebsfälle als Ursache für die Erkrankung gelten. Bei Auftreten der beiden Mutationen erhöht sich das kumulative Erkrankungsrisiko bis zur Vollendung des 70. Lebensjahres jedoch drastisch auf 80-90 %. (5)

Lebensstilfaktoren wie Übergewicht nach den Wechseljahren, Alkoholkonsum und Rauchen werden ebenfalls mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht, während regelmäßige körperliche Aktivität das Risiko senkt (1).

1.1.3 Prognostische und prädiktive Faktoren

Es konnten verschiedene Marker identifiziert und etabliert werden, die bei der Einschätzung des Krankheitsverlaufes helfen können. Zu unterscheiden sind prognostische und prädiktive Faktoren. Prognostische Faktoren dienen der Vorhersage des wahrscheinlichen Krankheitsverlaufs einer Patientin unabhängig der folgenden Therapie. Zu prädiktiven Faktoren zählen Marker, die zur Vorhersage eines wahrscheinlichen Therapieeffekts beitragen. (4)

Zu den klassischen, prognostisch relevanten Faktoren beim Mammakarzinom gehören die Tumorgroße, der Lymphknotenstatus, der histologische Typ, das Grading, das Alter der Patientin, ein Einbruch in Lymph- und/oder Blutgefäße, der Hormonrezeptorstatus (HR-Status) sowie der *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2)-Status und der Proliferationsmarker Ki-67 (Kiel-Antigen Nr. 67) (4).

In der Vergangenheit wurde die Prognose einer Brustkrebserkrankung lediglich anhand von Tumorgroße und Lymphknotenstatus gestellt. Heute ist bekannt, dass die Tumorbilogie, insbesondere die Expression von Rezeptoren, die entscheidenden Merkmale für prognostische Aussagen liefert. Wie in Tabelle 1 aufgeführt, lässt sich das Mammakarzinom mit Hilfe immunhistochemischer Methoden vereinfacht in die von Perou et al. definierten molekularen Subtypen unterteilen (6). Diese Klassifizierung ermöglicht es, HR-positiv (luminal) von nicht-luminalen HER2-positiven und triple-negativen Brustkrebsarten (*triple negative breast cancer*, TNBC) zu unterscheiden. In der Klinik findet diese Einteilung Anwendung bei Therapieentscheidungen und einer ersten Prognoseeinschätzung.

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms modifiziert nach Perou et al. (6)

Tumor-Subtyp	ER/PR-Status	HER2-Status	Proliferationsrate Ki-67
Luminal A	Positiv	Negativ	Niedrig
Luminal B	Positiv	Negativ	Hoch
Luminal B	Positiv	Positiv	Jeder Wert
HER2-positiv	Negativ	Positiv	Jeder Wert
Triple-negativ	Negativ	Negativ	Jeder Wert

Abkürzungen: ER – Östrogenrezeptor; PR – Progesteronrezeptor; HER2 – *Human epidermal growth factor receptor 2*; Ki-67 – Kiel-Antigen Nr. 67

Der HR-Status und der HER2-Status gelten sowohl als Prognosefaktoren als auch als prädiktive Marker. Der HR-Status umfasst die Expression von Östrogenrezeptoren (ER) und Progesteronrezeptoren (PR). Für die Bewertung von ER- bzw. PR-Positivität sind mindestens 1 % positive Tumorzellkerne in der immunhistochemischen Analyse erforderlich. HR-Positivität signalisiert beispielsweise zunächst eine günstige Prognose und stellt den wichtigsten prädiktiven Faktor bezüglich des Ansprechens auf eine endokrine Therapie (ET) beim Mammakarzinom dar. (4)

Mit 75-80 % ist die Mehrheit aller Mammakarzinome HR-positiv und somit vom luminalen Subtyp (7). In diesen Fällen werden die Hormonrezeptoren als Hauptfaktor

in der Regulation des Tumorwachstums angesehen. Die zielgerichtete ET ist seit vielen Jahren die empfohlene Erstlinientherapie. Obwohl bei einer großen Mehrheit der Patientinnen zunächst ein Therapieerfolg zu beobachten ist, tritt in den meisten Fällen im Laufe der Behandlung eine sekundäre Resistenz auf. Diese führt in der Regel zu einem Fortschreiten der Erkrankung, da die Wirksamkeit der Therapie reduziert wird (8-10).

Für den metastasierten Brustkrebs (*metastatic breast cancer*, MBC) gibt es weitere prognostische und prädiktive Faktoren. Seit wenigen Jahren werden zirkulierende Tumorzellen (*circulating tumor cells*, CTCs) und zirkulierende Tumor-DNA (*circulating tumor DNA*, ctDNA) aus dem peripheren Blut für prognostische Vorhersagen sowie als Marker zum Erkennen eines Therapieansprechens bzw. einer frühen Therapieresistenz genutzt (4, 11). Als prädiktive Faktoren werden CTCs und ctDNA derzeit noch im Rahmen von Studien evaluiert (4, 12).

Als weitere prädiktive Faktoren für das MBC gelten die erneute Bestimmung des ER- und PR-Status in Bezug auf das Ansprechen auf ET, das Vorliegen einer Phosphoinositid-3-Kinase (*PIK3CA*)-Mutation für eine mögliche Therapie mit dem PI3K-Inhibitor Alpelisib sowie HER2-Positivität für eine Anti-HER2-Therapie. Außerdem ist bei Vorliegen einer PD-L1-Positivität eine Therapie mit Checkpoint-Inhibitoren und bei einer *gBRCA1/2*-Mutation eine Therapie mit Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren indiziert. Des Weiteren begünstigt ein Ansprechen auf eine vorherige Chemotherapie ein erneutes Ansprechen. (4)

1.1.4 Das metastasierte Mammakarzinom

Während bei 20-30 % der Patientinnen trotz stadiengerechter Therapie im Laufe der Erkrankung sekundär Metastasen auftreten, bestehen diese in etwa 6 % der Fälle bereits primär bei Diagnosestellung (2). Eine Fernmetastasierung liegt vor, sobald Tumorzellen lymphogen oder hämatogen über die axillären Lymphknoten hinaus streuen und Tochtergeschwülste an anderen Lokalisationen bilden (13). Sie manifestieren sich am häufigsten im Knochen (65 %), in der Lunge (65 %), in der Leber (60 %) und im zentralen Nervensystem (ZNS) (20 %) (3, 14, 15). Untersuchungen haben gezeigt, dass die unterschiedlichen Mammakarzinom-Subtypen mit typischen Verteilungsmustern der Metastasen assoziiert sind. Während Tumoren vom luminalen Subtyp häufig ossäre Metastasen bilden, neigen TNBC zu einer Metastasierung in die Lunge, ins ZNS und in periphere Lymphknoten. Bei HER2-positiven Tumoren treten oft ZNS-, Leber- und Lungenmetastasen auf (16).

Trotz großer Fortschritte in den Therapiemöglichkeiten, ist bei Vorliegen einer Fernmetastasierung kein kurativer Behandlungsansatz mehr möglich (3, 4). Als Therapieziele stehen eine Verlängerung des Überlebens und der Erhalt der Lebensqualität im Vordergrund (13). Schwerpunkt aktueller Forschung ist die Suche nach neuen potenten Zielstrukturen, um eine zielgerichtete Therapie des MBC zu ermöglichen.

Während die 5-Jahres-Überlebensrate bei einem lokalisierten Befund noch bei rund 90 % liegt, sinkt sie in der metastasierten Situation auf etwa 25 % (1-3). Die mittlere Überlebensrate beträgt 20-28 Monate, variiert jedoch je nach Tumorbiologie und Form der Metastasierung. Luminale Tumoren weisen im Vergleich zum HER2-positiven

Subtyp ein deutlich längeres Überleben auf. Beim metastasierten TNBC fällt das Überleben am kürzesten aus, da im Gegensatz zu den anderen Subtypen eine zielgerichtete Therapie nur für besondere Subgruppen in Frage kommt (4, 15, 16).

Studien haben gezeigt, dass die Eigenschaften der Fernmetastasen sowohl genotypisch als auch phänotypisch von denen des Primärtumors abweichen können. So kann es beispielsweise zu Veränderungen prädiktiver Faktoren wie dem ER-, PR- oder HER2-Status kommen, welche einen Therapiewechsel nötig machen können (4, 17). Ein sogenannter *Rezeptor-Switch*, eine Diskordanz der Rezeptoren zwischen Primärtumor und Metastase, wird in 10-40 % der Fälle berichtet (18). Des Weiteren können, wie bereits erwähnt, therapierelevante Mutationen auftreten. Daher wird bei neu aufgetretenen Metastasen eine histologische Sicherung mit immunhistochemischer Charakterisierung des Metastasengewebes empfohlen, um die Therapie anpassen zu können (4). Je nach Lokalisation der Metastase kann sich die Gewinnung der Biopsie jedoch sehr kompliziert gestalten oder sogar unmöglich sein. Zudem ist sie stets mit den Risiken eines invasiven Eingriffs verbunden. In diesem Zusammenhang stellt die sogenannte *Liquid Biopsy* (LB) ein nützliches Verfahren zur nicht-invasiven Diagnostik dar (19). Mittels einfacher Blutentnahmen lassen sich tumorspezifische Merkmale im Blut analysieren. Die LB eignet sich somit optimal für die Suche nach und für den Einsatz von prognostischen und prädiktiven Markern. In Kapitel 1.5 *Liquid Biopsy* wird das Verfahren ausführlich beschrieben.

1.2 Östrogenrezeptoren

1.2.1 Aufbau und Funktion

Östrogenrezeptoren (ER) gehören zur Familie der nukleären Steroidrezeptoren. Es werden die zwei Subtypen Östrogenrezeptor α (ER α) und β (ER β) unterschieden, die jeweils von den Genen *ESR1* auf Chromosom 6 und *ESR2* auf Chromosom 14 transkribiert werden (20). Die beiden Rezeptoren ähneln sich zwar in ihrer Struktur, unterscheiden sich jedoch in der Lokalisation ihrer Expression, was auf eine Gewebespezifität hindeutet. Während ER α hauptsächlich im Gewebe der Brustdrüse, des Uterus und der Leber exprimiert wird, findet sich ER β vorwiegend in den Ovarien und in der Prostata (21, 22).

Das *ESR1*-Gen besitzt acht kodierende Exons. Der Aufbau des *ESR1*-Gens wird in Abbildung 1a schematisch dargestellt. Abbildung 1b zeigt den schematischen Aufbau des ER α . Der ER α besteht aus einer N-terminalen Domäne (NTD), einer zentralen DNA-Bindungsdomäne (DBD), einer *Hinge*-Domäne (Scharnierdomäne) und einer C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD). Hinzu kommen zwei Transaktivierungsdomänen (AF): eine Liganden-unabhängige AF-1, welche einen Teil der NTD darstellt, und eine Liganden-abhängige AF-2 innerhalb der LBD (23, 24).

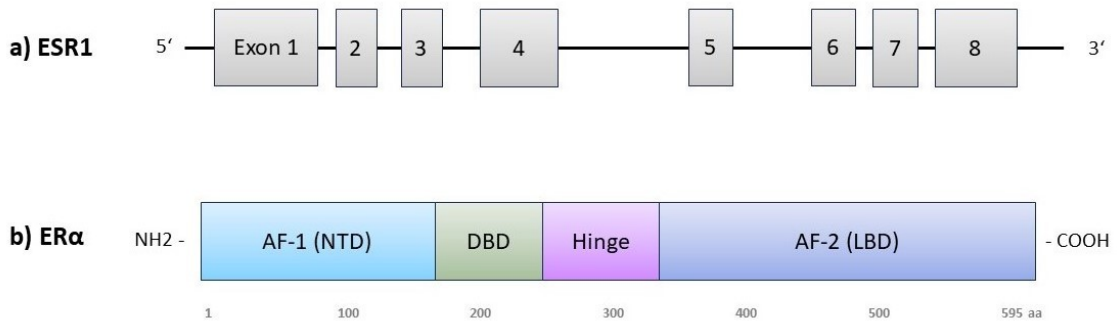


Abb. 1: Schematischer Aufbau des *ESR1*-Gens (a) und des Östrogenrezeptors α (*ERα*) (b)

a) Schema des *ESR1*-Gens mit acht kodierenden Exons; b) Schema des *ERα* bestehend aus vier Untereinheiten. Modifiziert nach Patel und Jeselsohn (24).

Abkürzungen: aa – engl. *amino acid*, Aminosäure; AF-1 – Transaktivierungsdomäne 1; AF-2 – Transaktivierungsdomäne 2; DBD – DNA-Bindungsdomäne; *ERα* – Östrogenrezeptor α; LBD – Ligandenbindungsdomäne; NTD – N-terminale Domäne

Die Östrogenrezeptoren fungieren als Transkriptionsfaktoren und regulieren die Expression bestimmter Zielgene. Diese spielen eine Rolle bei Wachstum, Stoffwechsel, sexueller Entwicklung und anderen reproduktiven Funktionen (25). Nach Bindung des Östrogens am intrazellulären *ERα* erfolgt eine Konformationsänderung der Helix 12 in eine Agonistenkonformation und der Transkriptionsapparat wird aktiviert (21, 23).

Etwa 75 % der Mammakarzinome sind ER-positiv (ER+) (7). In diesen Fällen stellt der *ERα* den Hauptfaktor in der Regulation des Tumorstwachstums dar und eine zielgerichtete ET ist die Therapie der Wahl (4). Wie bereits erwähnt, wird in den meisten Fällen zunächst ein Therapieerfolg erzielt. Im Laufe der langjährigen Behandlung kommt es jedoch häufig zu einer sekundären Therapieresistenz, welche durch zahlreiche Mechanismen ausgelöst werden kann. Als häufigste Ursache gelten Mutationen im *ESR1*-Gen (26) (siehe Kapitel 1.4.2 *ESR1*-Mutationen).

1.3 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms ist multidisziplinär und wird individuell dem Risikoprofil der Patientin angepasst. Prinzipiell muss zwischen der Therapie des primären und des MBC unterschieden werden, da sehr unterschiedliche Therapieziele verfolgt werden. Bei Erstdiagnose eines primären Mammakarzinoms wird ein kurativer Therapieansatz angestrebt. Im Gegensatz dazu besteht beim MBC keine Aussicht auf Heilung, sodass die Therapieziele aus einer Verlängerung des Lebens und einem Erhalt der Lebensqualität bestehen (13).

Die Behandlung eines primären Mammakarzinoms umfasst in der Regel eine operative Therapie, ggf. gefolgt von einer anschließenden Strahlentherapie, und eine systemische Therapie (z.B. Chemotherapie, Immuntherapie, zielgerichtete Antikörper-Therapie, ET). Als wichtigste Faktoren zur Entscheidung über die Notwendigkeit und Wahl der adjuvanten Therapie gelten Tumorgöße, Lymphknotenstatus, Grading, HR-Status, HER2-Status, Menopausenstatus und Alter der Patientin. Nach der

immunhistochemischen Subtypisierung des Tumorgewebes ist bei allen Patientinnen mit HR-positivem Mammakarzinom eine endokrine Therapie indiziert (13).

Beim MBC ist nicht nur die Gewebeuntersuchung des Primärtumors von Bedeutung, sondern auch die molekularbiologische und immunhistochemische Analyse des Metastasengewebes. Genetische und phänotypische Veränderungen im Vergleich zum Primärtumor können nämlich therapeutische Konsequenzen erforderlich machen. (4, 17)

1.3.1 Endokrine Therapie

Das endokrin sensitive Mammakarzinom stellt eine Indikation für eine ET dar. Das Prinzip der Therapie beruht auf der Reduktion des frei im Körper verfügbaren Östrogens. Folglich wird dem hormonsensitiven Tumor der Wachstumsstimulus entzogen (13). Es stehen verschiedene Wirkstoffgruppen zur Verfügung: selektive ER-Modulatoren (*selective estrogen receptor modulator*, SERM) und ER-Degrader (*selective estrogen receptor degrader*, SERD), die in den ER-Signalweg eingreifen, oder östrogendeprivierende Therapeutika. Bei Letzteren handelt es sich um Aromataseinhibitoren (AI), welche die Aromatisierung in der Östrogensynthese hemmen, oder *Gonadotropin-Releasing-Hormon-Analoga* (GnRH-A). GnRH-As führen durch eine Herunterregulierung der GnRH-Rezeptoren im Hypophysenvorderlappen zu einer Ovarialsuppression und folglich zu einer Senkung des Östrogenspiegels. (27)

In der langjährigen Erfahrung mit adjuvanter ET konnte eine signifikante Reduktion der Rezidivwahrscheinlichkeit um ca. 40 % und der Sterbewahrscheinlichkeit um ca. 30 % nachgewiesen werden (13, 28, 29). Eine adjuvante ET sollte für mindestens fünf Jahre erfolgen. Danach ist die Fortführung der Therapie als sogenannte erweiterte adjuvante endokrine Therapie (EAT) unter Berücksichtigung des Rezidivrisikos, der therapieassoziierten Nebenwirkungen und des aktuellen Menopausenstatus neu zu evaluieren (13, 28, 30).

Prämenopausal

Die Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) empfiehlt für prämenopausale Patientinnen eine adjuvante ET mit dem SERM Tamoxifen in einer täglichen Dosis von 20 mg per os. für mindestens fünf Jahre (4, 13). Tamoxifen blockiert den ER der hormonsensitiven Tumorzellen und verhindert das Andocken des körpereigenen Östrogens, welches einen Wachstumsreiz auslösen würde (31).

Bei einem erhöhten Rezidivrisiko wird eine zusätzliche Ovarialsuppression entweder durch die Gabe eines GnRH-A oder durch eine beidseitige Ovariectomie empfohlen (4, 32, 33). GnRH-As sind wie körpereigenes GnRH aufgebaut und besetzen GnRH-Rezeptoren an der Hypophyse. Dort bewirken sie im Gegensatz zum GnRH jedoch keine Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) und des Follikelstimulierenden Hormons (FSH), sondern einen Abbau der GnRH-Rezeptoren durch eine Dauerstimulation. In der Folge kommt die Östrogenproduktion in den Ovarien zum Erliegen (34).

Allgemein kann eine prämenopausale Patientin unter Ovarialsuppression analog zur postmenopausalen Patientin behandelt werden. Unter Ovarialsuppression ist dann auch eine adjuvante ET mit AI möglich. (4)

Postmenopausal

Die adjuvante ET eines endokrin sensitiven Mammakarzinoms in der postmenopausalen Situation sollte laut AGO aus einem AI allein oder nach 2-3 Jahren in Sequenz mit Tamoxifen bestehen (4, 13).

Trotz der postmenopausal beendeten Östrogenproduktion in den Eierstöcken wird eine geringe Menge Östrogen weiterhin im Muskel-, Fett- und Brustdrüsengewebe produziert, welches durch das Enzym Aromatase in die aktive Form transformiert wird. Als binden die Aromatase und verhindern somit die Umwandlung von androgenen Vorstufen zu aktiv wirksamen Östrogenen. Es werden nicht-steroidale, z.B. Anastrozol und Letrozol, von steroidalen AIs, wie Exemestan, durch unterschiedliche Molekülstrukturen differenziert. (27, 35)

1.3.2 Endokrine Therapie des HR-positiven/HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinoms

Auch in der metastasierten Situation ist bei HR-positiven/HER2-negativen (HR+/HER2-) Tumoren eine ET als Erstlinientherapie einer Chemotherapie vorzuziehen (4). In der RIGHT Choice-Studie (NCT03839823) wurde gezeigt, dass dies ebenso für Patientinnen mit hohem Remissionsdruck durch stark symptomatische Metastasierung gilt. Die Studie ergab ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben (*Progression-free survival*, PFS) bei der Therapie mit Ribociclib, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinase 4/6 (CDK 4/6-Inhibitor), plus ET (Letrozol oder Anastrozol plus GnRH-A Goserelin) im Vergleich zur kombinierten Chemotherapie (36).

Bei Ansprechen auf die ET wird empfohlen, diese bis zur Progression einzunehmen und erst nach Ausschöpfung aller endokrinen Therapiemöglichkeiten zu einer Chemotherapie zu wechseln (13, 37, 38).

In der metastasierten Situation stehen neben Tamoxifen, den AIs und GnRH-As eine Reihe weiterer Therapeutika zur Verfügung.

Die Therapie prä- und postmenopausaler Patientinnen sollte aus einer Kombination eines AIs oder dem SERD Fulvestrant und einem CDK 4/6-Inhibitor bestehen. Fulvestrant ist nur im metastasierten Stadium zugelassen und eignet sich insbesondere nach einer Vorbehandlung mit einem AI. (4, 13)

CDK 4/6-Inhibitoren hemmen eine über Östrogenrezeptoren aktivierte Signalkaskade. Es kommt zur Inhibition des Zellzyklus und zur Apoptose von Tumorzellen. CDK 4/6-Inhibitoren bergen die Möglichkeit, durch ET ausgelöste Resistenzen zu verhindern oder hinauszuzögern (39). In den letzten Jahren konnte in zahlreichen Phase-III-Studien ein verlängertes PFS in Folge der Therapie mit einem AI bzw. Fulvestrant in Kombination mit einem der CDK 4/6-Inhibitoren im Vergleich zur AI-/Fulvestrant-Monotherapie gezeigt werden (Ribociclib (MONALEESA-2 (NCT01958021)/-3 (NCT02422615)/ -7 (NCT02278120)), Palbociclib (PALOMA-2 (NCT01740427)/-3 (NCT01942135)) und Abemaciclib (MONARCH-2 (NCT02107703)/-3 (NCT02246621)) (13). Für die Therapie mit Ribociclib und Abemaciclib liegen

mittlerweile auch positive Daten bezüglich des Gesamtüberlebens (*overall survival*, OS) vor (40).

Nach Versagen einer endokrinen Behandlung mit einem nicht-steroidalen AI und CDK 4/6-Inhibitoren stellt der steroidale AI Exemestan in Kombination mit dem mTOR-Inhibitor (*mechanistic target of rapamycin*-Inhibitor) Everolimus eine weitere Therapieoption dar (4, 13). In der BOLERO-Studie (NCT01007942) konnte eine Verlängerung des PFS gezeigt werden (41).

Darüber hinaus stehen den Patientinnen bei Vorliegen bestimmter Mutationen zielgerichtete Therapeutika zur Verfügung, die eine individuelle Therapie ermöglichen. Beim Nachweis einer *PIK3CA*-Mutation und einer bestehenden endokrinen Resistenz wird eine Kombinationstherapie mit dem PI3K-Inhibitor Inavolisib plus Palbociclib und Fulvestrant empfohlen (INAVO120-Studie, NCT04191499) (4, 42). Bei *PIK3CA*-, *AKT1* (*AKT* Serin/Threonin-Kinase 1)- und *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*)-Alterationen wurde in der CAPItello-291-Studie (NCT04305496) eine gute Wirksamkeit des AKT-Inhibitors Capivasertib in Kombination mit Fulvestrant nachgewiesen (4, 43, 44). Als weitere Kombinationstherapie bei einem *PIK3CA*-Mutationsnachweis steht Alpelisib und Fulvestrant zur Verfügung. Diese weist jedoch ein höheres Nebenwirkungsprofil auf, was zu einer höheren Abbruchrate im Vergleich zu den beiden anderen genannten Therapien führt. (4, 42, 45)

Außerdem steht seit dem Frühjahr 2023 mit dem oralen SERD Elacestrant ein weiteres Medikament zur Behandlung eines fortgeschrittenen ER+/HER2- Mammakarzinoms zur Verfügung. Elacestrant baut den ER α dosisabhängig ab und hemmt die Östradiol-abhängige Gentranskription und das Tumorstadium. In der Phase-III-Studie EMERALD (NCT03778931) konnte im Behandlungsarm mit Elacestrant als Monotherapie eine relative Risikoreduktion für einen Progress oder Tod von 30 % für die gesamte Kohorte im Vergleich zur endokrinen Standardtherapie (Fulvestrant-, Anastrozol-, Letrozol- oder Exemestan-Monotherapie) erreicht werden. In der Gruppe mit nachgewiesener *ESR1*-Mutation lag die Risikoreduktion sogar bei 45 %. (46, 47) In einer Subgruppen-Analyse wurde außerdem festgestellt, dass die Dauer der vorangegangenen Behandlung mit CDK 4/6-Inhibitoren positiv mit einem längeren PFS unter Elacestrant im Vergleich zur Standardtherapie korreliert. Insbesondere bei Patientinnen mit *ESR1*-Mutationen, die vor der Randomisierung in der EMERALD-Studie mindestens 12 Monate lang mit CDK 4/6-Inhibitoren behandelt wurden, ergab sich eine signifikante Verbesserung des PFS. Unter Elacestrant-Therapie betrug es 8,6 Monate im Vergleich zu 1,9 Monaten unter Standardtherapie, was einer Risikoreduktion bezüglich des Fortschreitens der Erkrankung oder Tod von 59 % entspricht (HR=0,41; 95%-KI: 0,26-0,63). (48) Mit Elacestrant steht eine neue orale Therapieoption für das fortgeschrittene Erkrankungsstadium zur Verfügung, die insbesondere für Patientinnen mit partieller endokriner Resistenz durch *ESR1*-Mutationen nach vorangegangener endokriner Behandlung eine signifikante Verbesserung des PFS darstellt (46, 47). Im September 2023 erhielt Elacestrant die Zulassung in Europa (49).

Im September 2025 folgte die Zulassung durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) für einen weiteren SERD, Imlunestrant (50). In der Phase-III-Studie EMBER-3 (NCT04975308) zeigte Imlunestrant im Vergleich zur Standardtherapie eine signifikante Verlängerung des PFS bei Patientinnen mit fortgeschrittenem ER+/HER2-

Mammakarzinom mit *ESR1*-Mutationen (medianes PFS 5,5 vs. 3,8 Monate; HR=0,62; 95%-KI: 0,46-0,82; $p = 0,0008$) (50, 51). Eine Zulassung in Europa wird erwartet. Darüber hinaus befinden sich weitere orale SERDs in fortgeschrittener klinischer Entwicklung (51).

Abschließend ist zu betonen, dass in den vergangenen Jahren zahlreiche Medikamente eine Zulassung erhalten haben, die Therapiekonzepte sich dynamisch weiterentwickeln und die Therapien individueller an die Bedürfnisse der Patientinnen angepasst werden können. Dennoch treten häufig starke Nebenwirkungen auf, die stets ernst zu nehmen sind, da sie einen erheblichen Einfluss auf die Therapieadhärenz und folglich auf den Therapieerfolg haben (13, 34). Bei Als handelt es sich häufig um muskuloskelettale Beschwerden wie Arthralgien, Myalgien und durch den Knochendichteverlust bedingte osteoporotische Frakturen. Eine Tamoxifen-Behandlung erhöht das Risiko für klimakterische Beschwerden, thromboembolische Ereignisse und Endometriumkarzinome (35). Die neuen oralen SERDs weisen insgesamt ein günstiges Nebenwirkungsprofil auf, wobei Übelkeit, Fatigue und gastrointestinale Symptome am häufigsten auftreten (51).

1.4 Endokrine Resistenz

1.4.1 Resistenzmechanismen

Endokrine Resistenz stellt eine große Herausforderung bei der Behandlung vom HR-positiven Mammakarzinom dar, sodass bei etwa der Hälfte der Patientinnen im Laufe der Behandlung die ET versagt (9, 10).

Endokrine Resistenz ist multifaktoriell bedingt. Als Hauptmechanismus werden aktivierende Mutationen im *ESR1*-Gen angesehen. Weitere Resistenzmechanismen werden zunehmend aufgedeckt. Bisher wurden zusätzliche Veränderungen der ER-Signalübertragung, z.B. ein *ESR1*-Expressionsverlust sowie Amplifikation oder Translokation des *ESR1*-Gens identifiziert. Zu weiteren Resistenz-auslösenden Mechanismen zählen eine veränderte Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Zellzyklusregulatoren sowie Veränderungen im PI3K-, AKT1- und mTOR-Signalweg. Außerdem können eine Regulierung von ER-Koaktivatoren/Korepressoren und Stresssignalisierung mit veränderter Autophagie sowie Veränderungen in der Mikroumgebung des Tumors mit Erlangen von *epithelial-mesenchymal transition*-Merkmale (EMT, epithelial-mesenchymaler Übergang) Gründe für eine Resistenz sein. Des Weiteren zeigten sich *ESR1*-Fusionen. Sie treten zwar selten auf, führen jedoch durch einen LBD-Verlust zu einer vollständigen Resistenz gegenüber Therapien, die auf die LBD von *ESR1* abzielen wie SERMs oder SERDs. (9, 10, 52-57)

Um endokrine Resistenz überwinden zu können, müssen weitere Studien zum vollständigen Verständnis von Resistenzmechanismen und untereinander bestehenden Wechselwirkungen durchgeführt werden.

In der klinischen Praxis wird von der Kommission Mamma der AGO zwischen einer primären und sekundären (erworbenen) endokrinen Resistenz unterschieden (4). In der Tabelle 2 werden die jeweiligen Kriterien genannt.

Tabelle 2: Definition primäre und sekundäre Resistenz nach AGO-Leitlinie (4)

Primäre endokrine Resistenz:
- Rezidiv innerhalb der ersten zwei Jahre unter einer adjuvanten ET - Progress innerhalb der ersten 6 Monate unter einer laufenden endokrinen Erstlinientherapie beim metastasierten Mammakarzinom
Sekundäre (erworbene) endokrine Resistenz:
- Rezidiv unter einer adjuvanten ET, aber erst nach den ersten 2 Jahren oder innerhalb 12 Monate nach abgeschlossener adjuvanter ET - Progression $\geq$ 6 Monate nach Initiierung einer ET in der metastasierten Situation

Abkürzungen: ET – endokrine Therapie

1.4.2 *ESR1*-Mutationen

Schon im Jahr 1997 wurden die ersten aktivierenden *ESR1*-Mutationen in der kodierenden Sequenz der LBD identifiziert. Diese bewirken durch eine Konformationsänderung der ER α -Struktur, ähnlich der Aktivierung durch Östrogen-Bindung, eine konstitutive, Östrogen-unabhängige Rezeptoraktivität und einen Affinitätsverlust gegenüber selektiver ET (26, 58, 59).

Während diese Mutationen nur in unter 1 % der behandlungsnaiven Primärtumoren auftreten (10, 26, 58, 60), werden sie bei bis zur Hälfte der Fälle in Metastasengewebe nachgewiesen (10). Beim MBC, der zuvor mit mindestens einer ET behandelt wurde, liegt die Prävalenz bei 11-39 %. Es hat sich gezeigt, dass insbesondere Als eine endokrine Resistenz auslösen können. (60-62) Allerdings spielt der Zeitpunkt der AI-Therapie eine entscheidende Rolle. Bei Beginn einer Behandlung mit AI erst in der metastasierten Situation zeigte sich in verschiedenen Studien eine signifikant höhere Prävalenz als im adjuvanten Setting. (54, 60, 63) Die beschriebenen Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Mutationen entweder durch klonale Selektion seltener resistenter Tumorzellen oder unter dem Selektionsdruck der ET im Verlauf der Erkrankung erworben werden (10, 61).

Die beschriebenen Punktmutationen sind in der LBD typischerweise an zwei Hotspot-Positionen lokalisiert: in Exon 5 Codon 380 (E380Q) und in Exon 8 Codons 536, 537 und 538 (L536P, Y537C, Y537N, Y537S und D538G) (64-67). In vielen Fällen finden sich auch polyklonale *ESR1*-Veränderungen (54, 55, 68, 69).

In Studien konnte gezeigt werden, dass das Vorliegen von *ESR1*-Mutationen in ctDNA mit einem kürzeren OS assoziiert ist (54).

Von besonderer Relevanz ist die Tatsache, dass SERDs eine signifikante Aktivität auf mutierte ER beibehalten (65). In Abbildung 2 wird schematisch die Wirkungsweise von Östradiol sowie der Als und SERDs auf den Wildtyp (WT)-ER α und mutierten ER α dargestellt.

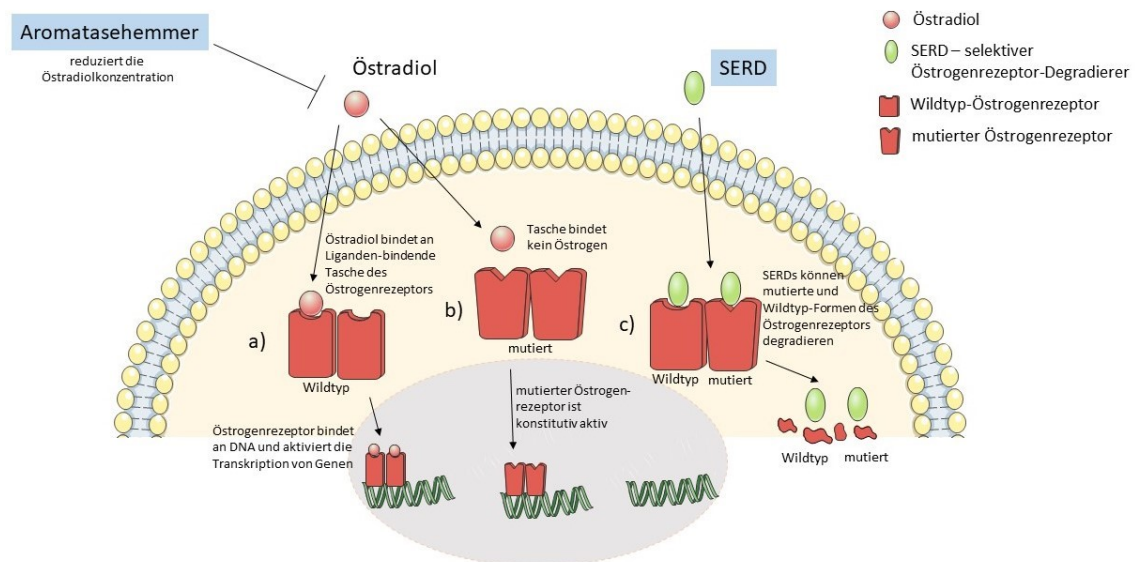


Abb. 2: Schematischer Überblick der Wirkungsweise von Östradiol, Aromatasehemmern und SERDs auf den Östrogenrezeptor α im Zusammenhang mit *ESR1*-Mutationen

a) Östradiol bindet intrazellulär an den Wildtyp-Östrogenrezeptor, welcher durch Bindung an die DNA die Transkription aktiviert. b) Mutierter Östrogenrezeptor ist Liganden-unabhängig konstitutiv aktiv. c) SERDs behalten teilweise ihre Funktion und können mutierte und Wildtyp-Östrogenrezeptoren degradieren. Modifiziert nach Müller et al. (70).

Abkürzungen: SERD – selektiver Östrogenrezeptor-Degrader

Der Erhalt der Wirksamkeit von SERDs auf mutierte ERs weist darauf hin, dass *ESR1*-Mutationen als prädiktiver Biomarker für die Behandlung von ER-positivem MBC genutzt werden könnten (66, 67). In zahlreichen Studien wurde die Eignung von *ESR1*-Mutationen als prognostische und prädiktive Biomarker analysiert. In den Studien SoFEA (NCT00253422) und EFACT (NCT00065325) wurde beispielsweise gezeigt, dass bei Vorliegen von *ESR1*-Mutationen ein längeres PFS durch die Behandlung mit dem SERD Fulvestrant als mit einer AI-Therapie erzielt wird (66, 71). Auch die bereits erwähnte EMERALD-Studie zeigte das Potential des *ESR1*-Mutationsstatus als prädiktiven Biomarker. Der neue orale SERD Elacestrant bewirkte als Zweit-/Drittlinientherapie beim ER+/HER2- MBC im Vergleich zur endokrinen Standardtherapie eine signifikante Verbesserung des PFS in der gesamten Kohorte und insbesondere in der Gruppe der Probandinnen mit *ESR1*-Mutationen (46).

Neben Elacestrant werden stetig weitere zielgerichtete Medikamente zugelassen, deren Einsatz auf dem Nachweis spezifischer Mutationen beim fortgeschrittenen MBC basiert. Hierzu zählen die PI3K-Inhibitoren Alpelisib und Inavolisib sowie der AKT-Inhibitor Capivasertib, deren Anwendung beim Nachweis einer *PIK3CA*-Mutation bzw. bei *PIK3CA*-, *AKT1*- und *PTEN*-Alterationen im Tumorgewebe oder in der ctDNA indiziert ist (42-45).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass eine modifizierte ET, die gezielt auf mutiertes MBC ausgerichtet ist, insbesondere in fortgeschrittenen und mehrfach vorbehandelten Krankheitsstadien von großem Nutzen sein kann. Trotz dieser Fortschritte bleiben Herausforderungen bei der klinischen Anwendung von *ESR1*-Mutationen als Biomarker für endokrine Resistenz bestehen. Ein wichtiger Faktor ist das Fehlen

standardisierter Testmethoden für *ESR1*-Mutationen und andere Mutationen, was zu inkonsistenten Ergebnissen und Schwierigkeiten beim Vergleich von Daten zwischen Studien führen kann. Darüber hinaus ist die klinische Bedeutung verschiedener *ESR1*-Veränderungen und ihre Reaktion auf verschiedene endokrine Therapien noch nicht vollständig verstanden.

1.5 Liquid Biopsy

Im Laufe einer Brustkrebserkrankung können sich die phäno- und genotypischen, therapierelevanten Tumoreigenschaften unter dem Einfluss multipler Therapien verändern (72, 73). So können neben der Änderung des HR- und HER2-Status neue onkogene Mutationen, z.B. im *ESR1*-Gen oder im PI3K-Signalweg, auftreten, die zu Resistenzen gegenüber spezifischen Therapien führen (74-76). Aus diesem Grund erfolgt bei Progress üblicherweise eine Gewebebiopsie, um die aktuellen therapierelevanten Charakteristika eines Rezidivs oder einer detektierten Metastase zu identifizieren. Die Therapie wird anschließend individuell neu justiert, um möglichst neben einem verlängerten OS auch eine Verbesserung der Lebensqualität zu erreichen. Die Gewebegewinnung stellt jedoch häufig ein Problem dar, da es sich um einen invasiven Eingriff handelt. Diese sind stets mit einem Komplikationsrisiko verbunden. Zudem ist die Gewebeentnahme oft aufgrund von Verschlechterungen des Allgemeinzustandes der Patientinnen oder Unzugänglichkeit des Rezidivs nicht wiederholbar (11, 77).

In diesem Kontext spielt die sogenannte *Liquid Biopsy* (LB) eine zunehmend wichtige Rolle. Das Verfahren wurde vor ca. 15 Jahren zur Detektion von CTCs von den Forschenden Alix-Panabières und Pantel entwickelt (78, 79). Das Prinzip der LB beschreibt die Entnahme und Untersuchung von Analyten aus Körperflüssigkeiten, meistens aus Blut. Es kann jedoch auch Urin, Liquor, Speichel, Sputum oder Knochenmarkaspirat verwendet werden (19). Bei den Analyten im peripheren Blut kann es sich um CTCs, zirkulierende zellfreie DNA (*Circulating cell-free DNA*, cfDNA) bzw. ctDNA, *MicroRNA* (miRNA) und extrazelluläre Vesikel, wie z.B. Exosomen, handeln (78, 80).

Die LB bietet den Vorteil, die genetische Heterogenität eines Tumors abzubilden, da sie sich im Gegensatz zur Gewebebiopsie nicht nur auf ein begrenztes Tumoreal beschränkt. So können multiple und nicht lokalisierbare Metastasenherde detektiert werden. Des Weiteren sind serielle Probenentnahmen in Form einfacher Blutentnahmen möglich, sodass der Blick auf den Tumor nicht auf einen Zeitpunkt beschränkt ist. Zusätzlich führt die geringe Invasivität zu einer hohen Akzeptanz bei den Patientinnen und Patienten (11, 81-83).

Seit einigen Jahren ist die LB zentraler Forschungsbestandteil für die personalisierte, zielgerichtete Krebstherapie und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, mit dem Ziel, prädiktive und prognostische Tumormarker zu etablieren. In Abbildung 3 wird das Prinzip der LB schematisch dargestellt.

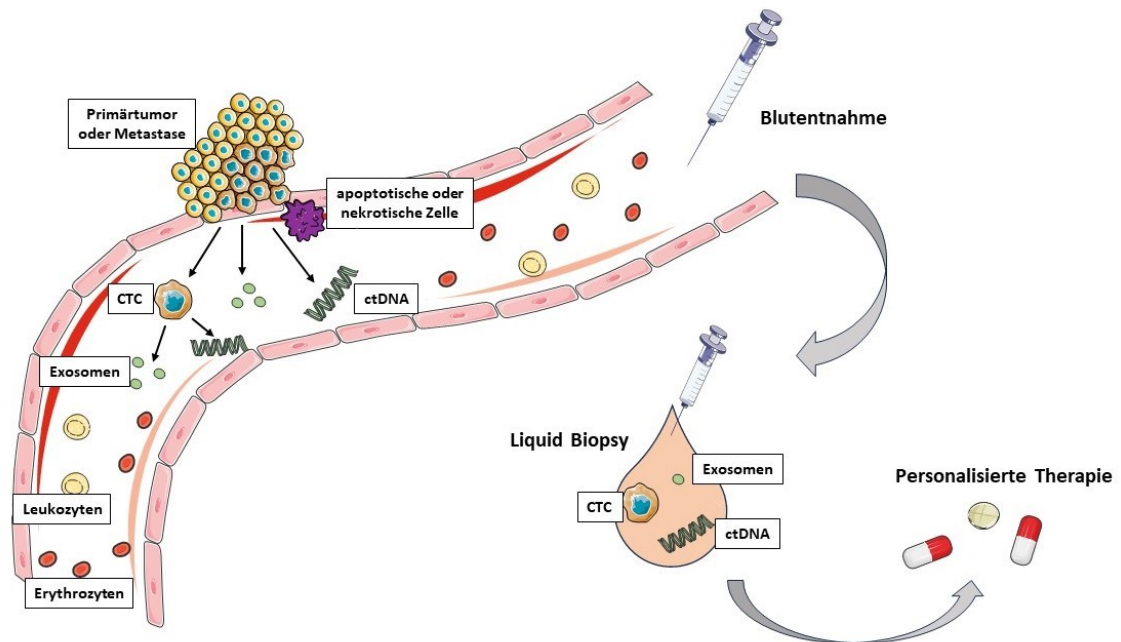


Abb. 3: Das Prinzip der Liquid Biopsy mit dem Ziel der personalisierten Therapie

Tumorzellen des Primärtumors oder der Metastase gelangen in den Blutstrom (*circulating tumor cells*, CTCs) und sezernieren *circulating tumor DNA* (ctDNA) und Exosomen. Apoptotische oder nekrotische Zellen geben ctDNA in das Blut ab. Exosomen können direkt von gesunden oder Tumorzellen freigesetzt werden. Die *Liquid Biopsy* (LB) umfasst die Blutabnahme und die Untersuchung dieser verschiedenen Analyten im Blut oder auch anderen Körperflüssigkeiten, die als Biomarker für die personalisierte Therapie verwendet werden können. Modifiziert nach Alix-Panabières et al. (84).

Abkürzungen: CTC – *circulating tumor cell*; ctDNA – *circulating tumor DNA*; LB – *Liquid Biopsy*

Die Ergebnisse der Phase-III-Studie SOLAR-1 (NCT02437318) verdeutlichten beispielweise die Relevanz der LB für das Therapiemanagement beim MBC. Es wurde gezeigt, dass Patientinnen mit detektierten *PIK3CA*-Mutationen im Tumorgewebe oder in der ctDNA ein verlängertes PFS durch die Behandlung mit dem PI3KCA-Inhibitor Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant erreichen. (85-87) Im Jahr 2019 wurde Alpelisib von der FDA zugelassen. 2020 folgte die Zulassung in Deutschland durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM). Dies ist die erste Medikamentenzulassung in der BC-Therapie auf Basis einer LB-Analyse (85). Eine weitere Zulassung in diesem Rahmen erfolgte 2023 für den SERD Elacestrant basierend auf dem Nachweis einer *ESR1*-Mutation in der ctDNA (46, 49). 2025 folgten die Zulassungen für den PI3K-Inhibitor Inavolisib bei *PIK3CA*-Mutationen (88), für den AKT-Inhibitor Capivasertib bei *PIK3CA*-, *AKT1*- und *PTEN*-Alterationen (89) sowie für den SERD Imlunestrant beim Nachweis von *ESR1*-Mutationen (50).

1.6 Zirkulierende Tumor-DNA

Bei zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) handelt es sich um kurze DNA-Fragmente, die von Tumoren (Primärtumoren, Metastasen oder isolierten Tumorzellen) freigesetzt werden und frei im Blut und anderen Körperflüssigkeiten zirkulieren (11, 80).

Davon zu unterscheiden ist die übergeordnete Bezeichnung der cfDNA, welche die Gesamtheit zellfreier DNA-Fragmente beschreibt (11). Die kurzen DNA-Fragmente werden kontinuierlich durch verschiedene Mechanismen wie Apoptose, Nekrose, Phagozytose oder aktive Sekretion von gesunden Zellen sowie erkrankten Zellen, wie im Falle der ctDNA, in den Blutkreislauf abgegeben (90).

In der nicht-invasiven Pränataldiagnostik wird fetale cfDNA aus dem Blut der Mutter als Material zur Untersuchung auf fetale Aneuploidie genutzt. In diesem Rahmen wurde zufällig durch einen Mutationsnachweis in der maternalen cfDNA ein Tumorleiden einer werdenden Mutter erkannt. Seitdem wurden Nachweismethoden zu diagnostischen Zwecken weiterentwickelt und die LB erlangte einen hohen Stellenwert in der Forschung zu tumorgenetischer Diagnostik (91, 92).

Es ist bekannt, dass Prozesse wie Inflammation, autoimmune Geschehen oder Tumorleiden den cfDNA-Spiegel im Blut ansteigen lassen können (93). Dennoch handelt es sich um sehr kleine DNA-Fragmente, welche nur in geringen Mengen im Blut auftreten (ca. 13 ng/ml im gesunden Menschen, 180 ng/ml in späteren Krebsstadien). Ein Problem beim Einsatz von ctDNA für Untersuchungen auf tumorgenetische Mutationen ist außerdem deren geringer Anteil an der cfDNA, der deutlich unter 1 % liegen kann (92, 94). Aus diesem Grund bedarf es sehr sensibler Nachweismethoden für die Analyse der LB und der darin enthaltenen ctDNA-Fragmenten (78, 95). Hierzu bieten sich digitale PCR-Systeme (dPCR) wie *beads, emulsion, amplification, and magnetics digital PCR* (BEAMing) (96), *droplet digital PCR* (ddPCR) (97) oder *digital next-generation sequencing* (dNGS) (98) an. Mit BEAMing und ddPCR lassen sich nur wenige Gene gleichzeitig untersuchen, sodass sich diese Methoden zum Nachweis schon bekannter Mutationen anbieten. Mit dNGS-Methoden lässt sich das gesamte Genom analysieren (78, 92).

Aktuelle Studien richten ihren Fokus insbesondere auf spezifische Nachweismethoden der ctDNA, um die prognostische Relevanz sowie den Nutzen für Therapiemonitoring und -interventionen zu evaluieren.

Sowohl in der nicht-metastasierten als auch in der metastasierten Situation wird von einer hohen prognostischen Relevanz von ctDNA ausgegangen, wobei dies noch nicht abschließend bestätigt wurde (11). Verschiedene Untersuchungen zeigten jedoch, dass der ctDNA-Spiegel mit dem OS von Brustkrebspatientinnen korreliert (99-101). Des Weiteren wurden in einer Reihe von Studien zum MBC die ctDNA-Spiegel vor und während einer neuen Therapie gemessen und signifikante Unterschiede je nach Medikamentengruppen und Ansprechen auf die Therapie verzeichnet (102, 103). Diese Beobachtung gibt den Hinweis, dass die ctDNA-Dynamik als Parameter im Therapiemonitoring genutzt werden könnte (11, 104).

Ergänzend könnte die Bestimmung der ctDNA beim nicht-metastasierten Mammakarzinom in der Nachsorge genutzt werden, da bei ctDNA-Positivität von einem erhöhten Rezidivrisiko ausgegangen wird (105).

Wie in den Kapiteln 1.4.2 *ESR1-Mutationen* und 1.5 *Liquid Biopsy* bereits erwähnt, ist

die LB-basierte Therapieintervention beim Nachweis von somatischen Mutationen in der ctDNA von entscheidender klinischer Bedeutung. Dies ist inzwischen das wichtigste, in die Klinik implementierte Einsatzgebiet von ctDNA. Die Mutationen dienen als Indikationsgrundlage für zielgerichtete Therapien in der metastasierten Situation und stehen im Mittelpunkt zahlreicher weiterer Studien (11, 46, 49, 88, 89, 106).

1.7 Droplet Digital PCR

Die digitale Polymerasekettenreaktion (*digital polymerase chain reaction*, dPCR) stellt nach der klassischen PCR und der quantitativen Echtzeit-PCR (*Real-Time-PCR*, qPCR) die dritte Generation der PCR-Analyse dar (107, 108). Während lange Zeit die qPCR das Standardverfahren zur Detektion seltener Mutationen und Kopienzahlvariationen (*copy number variations*, CNV) war, eröffnen sich durch die dPCR neue Möglichkeiten in der Genforschung, u.a. in der Krebsdiagnostik. Das Prinzip der dPCR basiert auf der Partitionierung eines Analyts in zahlreiche kleine Reaktionsräume. Es entstehen Reaktionsräume, die keine Ziel-DNA enthalten, und solche mit einer oder mehreren Kopien der Ziel-DNA. Es folgt eine Endpunkt-PCR zur DNA-Detektion für jedes Kompartiment, sodass positive (1) und negative (0) Signale resultieren. (107)

Die *droplet digital PCR* (ddPCR) stellt eine Variante der dPCR dar, bei der mit Hilfe einer Wasser-Öl-Emulsion mehrere tausend kleine Reaktionsräume in Form von Tröpfchen erzeugt werden. Innerhalb der Tröpfchen werden die zu untersuchenden DNA-Moleküle amplifiziert und anschließend analysiert. Ein großer Vorteil gegenüber der qPCR ist, dass die dPCR eine absolute Quantifizierung von DNA-Molekülen ermöglicht, ohne eine externe Kalibrierung mittels Standardkurve zu benötigen. Die Korrekturberechnung erfolgt anhand einer angenommenen Poisson-Verteilung. Zudem ist die dPCR zeitsparender und es werden weniger Chemikalien sowie limitiertes Probenmaterial benötigt. Allerdings ist der Durchsatz der qPCR derzeit noch höher als von der dPCR. (107)

Für die Detektion seltener Mutationen ist eine hohe Sensitivität von großer Bedeutung, da sich nur eine kleine Anzahl mutierter DNA-Moleküle unter sehr vielen WT-Molekülen befindet. Bei der qPCR liegt das Hintergrundsignal des WT-Allels oft über dem der Mutation, sodass die Detektion schwierig ist. Durch Verdünnung mittels Partitionierung bei der dPCR wird das WT-Hintergrundsignal reduziert und die Mutation innerhalb jeder einzelnen Partition aufkonzentriert (109, 110).

Zu den limitierenden Faktoren der dPCR zählt, dass die Assays auf spezifische einzelne Mutationen beschränkt sind. Die Mutation und ihre Lokalisation muss daher vorher bekannt sein. (108)

Für eine ddPCR werden verschiedene Komponenten ähnlich zu einer qPCR benötigt: ein Primer-Paar mit einem *Forward* (fw) und *Reverse* (rv) Primer und eine Sonde,

beispielsweise eine *TaqMan*-Sonde (Hydrolysesonde). *TaqMan*-Sonden bestehen aus einer zur Zielsequenz komplementären, 18-22 Basenpaaren (bp) langen Oligonukleotidsonde. In Abbildung 4 wird die Wirkungsweise einer *TaqMan*-Sonde schematisch dargestellt. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem *Reporter*-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende mit einem *Quencher*-Farbstoff markiert, welcher das *Reporter*-Leuchtsignal größtenteils unterdrückt. Die Sonde lagert sich zunächst an den zu replizierenden DNA-Strang an. Bis zur Hydrolysierung der Sonde bleiben *Quencher* und *Reporter* in räumlicher Nähe zueinander, nur durch die Länge der Sonde getrennt. Während der PCR verlängert die DNA-Polymerase den zweiten DNA-Strang ausgehend vom Primer und spaltet dabei die Sonde ab. Der *Reporter* und *Quencher* verlieren ihre unmittelbare räumliche Nähe. Dadurch steigt die Fluoreszenzintensität des *Reporter*-Farbstoffs mit jedem PCR-Zyklus weiter an. Diese kann gemessen werden und verhält sich proportional zur Menge an vervielfältigter DNA. (107, 111)

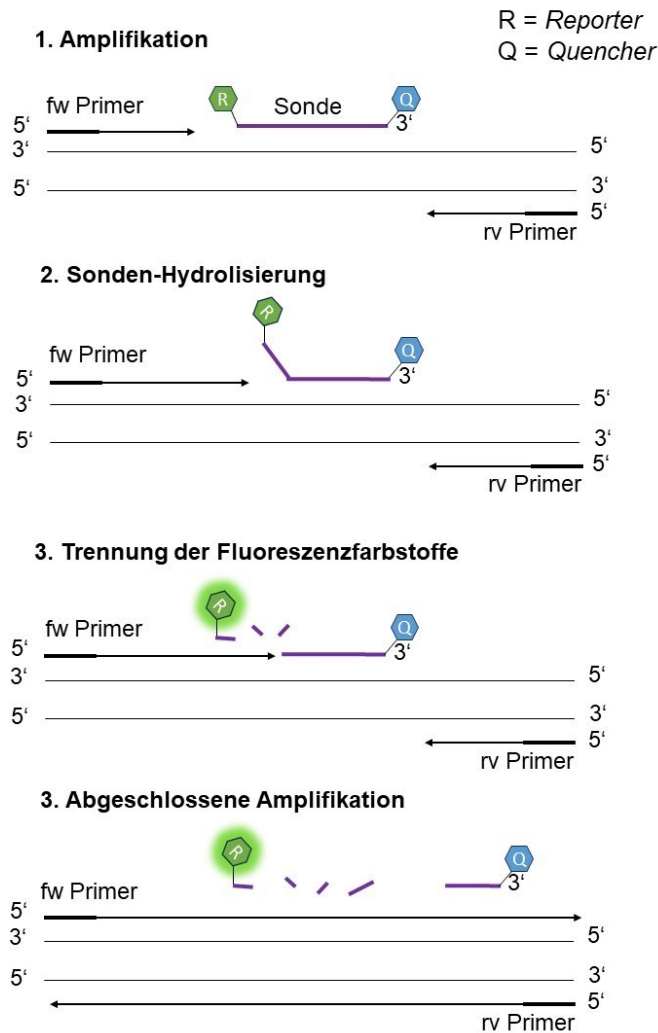


Abb. 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise einer TaqMan-Sonde

1. Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und der *Forward* (fw) und *Reverse* (rv) Primer. 2. Amplifikation der Primer und Hydrolysisierung der Sonde. 3. Trennung der Fluoreszenzfarbstoffe mit anschließend zunehmender Fluoreszenzintensität des *Reporter*-Farbstoffs. 4. Vollständige Synthese des PCR-Produkts. Mit jedem weiteren PCR-Zyklus steigende Fluoreszenzintensität. Modifiziert nach Butler (112).

Abkürzungen: fw Primer – *Forward* Primer; rv Primer – *Reverse* Primer; R – *Reporter*; Q – *Quencher*

Es ist möglich, verschiedene Primer- und Sonden-Sets zu einer Multiplex-PCR zu kombinieren, sodass mehrere Genomregionen in einer einzigen PCR-Reaktion untersucht werden. Dies ist besonders relevant für die Untersuchung polyklonaler Tumoren und für das Krankheitsmonitoring (109, 110).

Multiplex-PCR-Assays sind jedoch mit zahlreichen Herausforderungen verbunden, wie z.B. abweichende Effizienz der einzelnen Assays, unterschiedliche Primer-Hybridisierungs-Temperaturen, mögliche Kreuzreaktionen von Oligonukleotiden und

die ungenaue Trennung der Fluoreszenzsignale bei überlappenden Emissionsspektren. Aus diesen Gründen ist die Analyse breiterer genomischer Regionen mit ddPCR nicht möglich. (110)

Um eine hohe Sensitivität zu erreichen, sollte die Proben-DNA auf der Ebene eines einzelnen Zielmoleküls partitioniert werden. Dies wird durch die Erzeugung und Verarbeitung einer hohen Tröpfchenanzahl mit minimalem Volumen ermöglicht. Anderenfalls könnten die DNA-Fragmente möglicherweise nicht amplifiziert oder das Fluoreszenzsignal von einem Tröpfchen mit mehreren Targets nicht von Tröpfchen mit anderen Targets unterschieden werden. (113)

1.8 Ziele der Arbeit

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Etwa ein Drittel der Patientinnen mit Mammakarzinom entwickeln im Laufe ihrer Krankheit eine primäre oder sekundäre Metastasierung. Da ein Krankheitsprogress in der Regel mit einem Therapiewechsel einhergeht, bedeutet dies multiple Vortherapien bei fortgeschrittenen Brustkrebserkrankungen. Etwa 80 % aller Mammakarzinome sind HR-positiv, sodass eine zielgerichtete ET als Standardtherapie gewählt wird. Während die Mehrheit der Patientinnen zunächst gut auf diese Therapie anspricht, entwickelt ein Großteil im Verlauf eine endokrine Resistenz, die in der Regel mit einem Therapieversagen einhergeht. Unter verschiedenen Resistenzmechanismen werden Mutationen im *ESR1*-Gen als die häufigste Ursache angesehen. Die Kenntnis über den *ESR1*-Mutationsstatus und insbesondere auch über einen Mutationsstatus-Wechsel im Laufe der Erkrankung stellt einen wichtigen Ansatz für die Entwicklung von neuen Therapien dar. Das Vorliegen von Mutationen geht in der Regel mit einem kürzeren Überleben einher, da es zu einem schlechteren Therapieansprechen auf die bisherige Standardtherapie kommt. Zielgerichtete Therapieansätze bergen jedoch die Möglichkeit, diese Therapieresistenzen zu umgehen. Die meisten Untersuchungen finden aktuell noch im Rahmen klinischer Studien Anwendung. Allerdings wurden in diesem Kontext bereits die ersten Medikamente zugelassen, die beim Nachweis verschiedener Mutationen indiziert sind und zu einem längeren PFS führen. Das Ziel neuer Therapieansätze ist neben einem verlängerten Überleben vor allem der Erhalt von Lebensqualität und Symptombefreiheit, welche durch eine individuelle, zielgerichtete Therapieplanung ermöglicht werden kann.

Die LB stellt in diesem Zusammenhang ein einfaches Verfahren dar, mit dem serielle Blutentnahmen zur Bestimmung des aktuellen Mutationsstatus bei Progress durchgeführt werden können. Durch die hohe Akzeptanz der Patientinnen und die einfache Durchführbarkeit bietet die LB eine Möglichkeit, die Patientinnenversorgung deutlich zu verbessern.

Das Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist die Etablierung einer Methode zum Nachweis von *ESR1*-Mutationen in der ctDNA aus Blutplasma der Probandinnen mit

ER+/HER2- MBC. Hierzu soll das Verfahren der ddPCR eingesetzt und ein Multiplex-Assay zur Detektion von Hotspot-Mutationen im *ESR1*-Gen (E380Q, L536P, Y537C, Y537N, Y537S und D538G) angewendet werden. Initial soll die Extraktion von ctDNA aus Blutplasma erfolgen.

Ein besonderer Fokus ist dabei die Etablierung eines routinemäßigen Einsatzes von LB als klinisches Verfahren zur Untersuchung von peripherem Blut von MBC-Patientinnen auf prädiktive Biomarker.

Des Weiteren soll die *ESR1*-Mutationsrate im vorliegenden Patientinnenkollektiv bestimmt werden und mit den klinisch-pathologischen Daten der untersuchten Patientinnen im longitudinalen Verlauf verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientinnenkollektiv

Das Patientinnenkollektiv dieser Arbeit bestand aus 78 Patientinnen mit MBC. Ihnen wurde im Rahmen der PRAEGNANT-Studie (*PRospective Academic Translational Research Network for the Optimization of Oncological Health Care Quality in the Advanced Therapeutic Setting*, NCT02338167) im Zeitraum von Oktober 2014 bis März 2020 in der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf Blut entnommen. Die entsprechenden Ethikvoten der Ethikkommissionen der Eberhard Karls Universität Tübingen und der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studennummer: 4786) sowie die schriftlichen Einverständniserklärungen der Patientinnen zur Blutentnahme und weiteren Verwendung des Materials liegen vor. Zu den Einschlusskriterien der Studie zählten neben einer Mammakarzinom-Diagnose das Vorliegen einer Metastase oder einer nicht operablen, lokoregionären Erkrankung, unabhängig der Therapielinie.

Ziel des PRAEGNANT-Studiennetzwerks ist die Detektion von Biomarkern und insbesondere die Durchführung und Bereitstellung molekularer Tests zur Individualisierung der Therapie von MBC in der klinischen Patientinnenversorgung (114).

Des Weiteren wurde für die Positivkontrolle extrahierte DNA aus CTCs einer Patientin mit *ESR1*-Mutationen der AUGUSTA-Studie eingesetzt. Das entsprechende Ethikvotum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studennummer: 3430) sowie die schriftlichen Einverständniserklärungen der Patientinnen zur Blutentnahme und weiteren Verwendung des Materials liegen vor.

2.1.2 Zelllinien und Nukleinsäuren

Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und Nukleinsäuren

Zelllinie	Hersteller, Ort
MCF-7: ATCC Nr. HTB-22	American type culture collection (ATCC), Manassas, USA
Nukleinsäure	
DNA einer Patientin mit bekannten <i>ESR1</i> -Mutationen als Positivkontrolle	AUGUSTA-Studie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studennummer: 3430)

2.1.3 Puffer

Tabelle 4: Verwendete Puffer

Puffer	Hersteller, Ort
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.4 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller, Ort
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (50)	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Qubit™ dsDNA-HS (High Sensitivity)-Assay-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.5 Allgemeines Labormaterial und Geräte

Tabelle 6: Verwendetes allgemeines Labormaterial und Geräte

Labormaterial/Gerät	Hersteller, Ort
Pipetten, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen, TipOne, 10/20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe Lock Tubes, 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
(Falcon-)Röhrchen, Cellstar Tubes, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Stripette Costar 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, New York, USA
Pipettierhelfer, Accu-Jet	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wasserbad Pura	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
PV100 Red-Evac <i>Vacuum Pump</i>	Hoefer Inc., Massachusetts, USA
Test Tube Dry Block Heater SHT 2D	Stuart Scientific, South San Francisco, CA, USA
K ₂ EDTA Vacutainer 8,5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.6 Primer und Oligonukleotide

Tabelle 7: Verwendete Primer und Oligonukleotide

Primer	Hersteller, Ort
<u>ESR1 Exon 5:</u> Forward primer: 5'-TTGCTTGTTCCTCAGGCTTTGTGGA-3' Reverse primer: 5'-AGCGCCAGACGAGACCAATCAT-3'	Metabion international AG, Planegg/Steinkirchen, Deutschland
<u>ESR1 Exon 8:</u> Forward primer: 5'-ACAGCATGAAGTGCAAGAACGT-3' Reverse primer: 5'-TGGCTTTGGTCCGTCTCCTC-3'	Metabion international AG, Planegg/Steinkirchen, Deutschland
Oligonukleotide	Hersteller, Ort
REFex5 5'-(HEX)- TGACCTCCATGATC-(MGBEQ)-3' Ex5_E380Q 5'-(FAM)- ACCTTCTACAATGTGCCTG-(MGBEQ)- 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland
REFex8 5'-(FAM)- CTAGCCGTGGAGGGGC-(MGBEQ)-3' Ex8_Mut Hotspot 5'-(HEX)- CCTCTATGACCTGCTGC-(MGBEQ)-3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland

2.1.7 Droplet Digital PCR

Tabelle 8: Verwendete Materialien und Geräte für die Droplet Digital PCR

Material/Gerät	Hersteller, Ort
QX200™ Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
QX200™ Droplet Reader	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96-Deep Well Reaction Module	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
PX1 PCR Plate Sealer	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
ddPCR Droplet Reader Öl	Bio-Rad Laboratories, CA, USA

ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
ddPCR 96-well-Platten	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
DG Cartridges for QX200/QX100 Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
DG8 Cartridge Holder	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
DG8 Gaskets for QX200/QX100 Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Droplet Generation Oil for Probes	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
PCR-Platte Heat Seal-Folie	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
QuantaSoft Software, Regulatory Edition	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Multikanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nuklease-freies Wasser, Milli-Q®	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland

2.1.8 Software

Tabelle 9: Verwendete Software

Software	Hersteller, Ort
QuantaSoft-Software, Version 1.7.4.0917	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
QuantaSoft Analysis Pro, Version 1.0.596.0525	Bio-Rad Laboratories, CA, USA
Microsoft Excel, Version 2306	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word, Version 2306	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft PowerPoint, Version 2306	Microsoft, Redmond, Washington, USA
SPSS Statistics, Version 29.0.0.0	IBM, NY, USA
GraphPad Prism, Version 9	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Blutentnahme

Die Materialgewinnung erfolgte im Rahmen der PRAEGNANT-Studie mit Hilfe des PRAEGNANT-Blutabnahmekits, welches sieben Röhrchen à 8,5 ml bzw. 10 ml beinhaltet. Nach erfolgter Blutentnahme wurden die Proben am selben Tag zur Aufbereitung an das Labor für Molekulare Medizin der Frauenklinik in Erlangen versandt. Das Plasma des dritten und vierten Röhrchens (8,5 ml K₂EDTA *Vacutainer*,

Becton Dickinson, USA) wurde für diese Arbeit verwendet. Aus ihnen wurde die frei im Plasma befindliche cfDNA isoliert.

2.2.2 Extraktion von cfDNA aus Plasma

Für die Extraktion von cfDNA aus dem Blutplasma der Probandinnen wurde das *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit* (Qiagen, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Handbuch 10/2019 und wurde je nach Menge der Plasmaproben von 2 ml/ 3 ml/ 4 ml/ 5 ml angepasst.

Zunächst wurde in diversen Arbeitsschritten ein Gemisch aus den Plasmaproben und verschiedenen Puffern (*QIAGEN Proteinase K*, *ACL Puffer*, *ACB Puffer*) hergestellt, welches für 5 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurde eine Lochplatte mit Auffangbehälter an einer Vakuumpumpe (*PV100 Red-Evac Vacuum Pump*, Hoefer Inc., USA) angeschlossen und mit Konnektoren (*VacConnectors*) versehen. Auf diese wurden *QIAamp Mini Columns* und 20 ml *Tube Extender* gesteckt. Die Abbildung 5 zeigt den Laboraufbau.

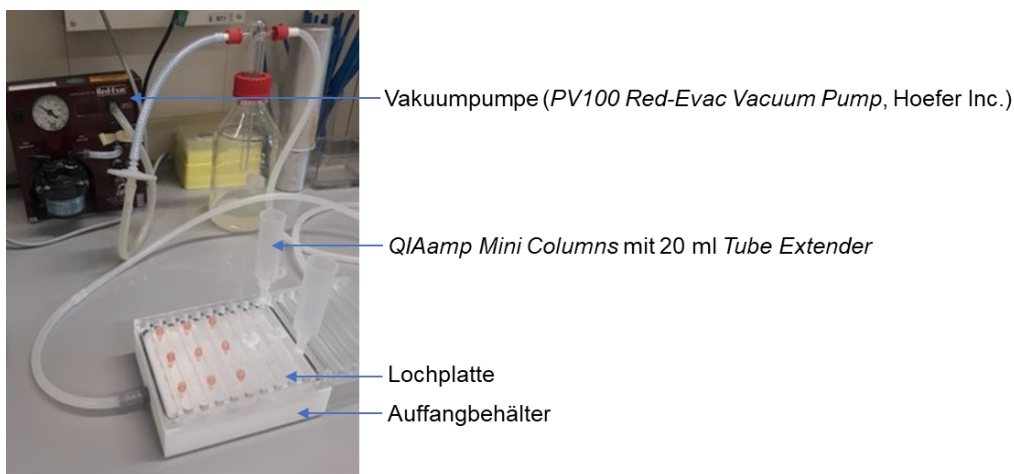


Abb. 5: An Vakuumpumpe angeschlossene Lochplatte mit Auffangbehälter

Eine Lochplatte mit Auffangbehälter an einer Vakuumpumpe angeschlossen und mit Konnektoren (*VacConnectors*) versehen. Auf den Konnektoren befinden sich *QIAamp Mini Columns* und 20 ml *Tube Extender*.

Die *Tube Extender* wurden mit dem zuvor hergestellten Gemisch befüllt und die Vakuumpumpe wurde eingeschaltet, bis die Flüssigkeit vollständig durch die Säule gelaufen war. Dieser Schritt wurde mit zwei weiteren Puffern und Ethanol wiederholt. Nach mehrmaligem Zentrifugieren und Inkubieren wurde schließlich die extrahierte DNA in ein 1,5 ml Röhrchen ausgespült.

Die DNA-Konzentration der Proben wurde mit dem dsDNA-HS (*High Sensitivity*)-Assay-Kit (Thermo Fisher Scientific) nach Herstellerangaben mit dem Qubit 2.0 Fluorometer gemessen. Die mediane DNA-Konzentration der Patientinnenproben lag bei 0,021 ng/μl (IQR 0,015-0,036). Die durchschnittliche DNA-Konzentration betrug

0,049 ng/μl (SD = 0,087).

Die extrahierte cfDNA wurde bei -20 °C gelagert, bis sie für die ddPCR verwendet wurde.

2.2.3 Droplet Digital PCR

2.2.3.1 Droplet Digital PCR-Assay

Das ddPCR-Assay der vorliegenden Arbeit kombiniert zwei Assays miteinander, welche jeweils entweder die geclusterten Mutationen in Exon 8 detektieren oder auf die E380Q-Mutation in Exon 5 des *ESR1*-Gens abzielen. Das Assay orientiert sich am Assay-Design der Gruppe Jeannot et. al.. Die Gruppe zeigte, dass mittels dieser ddPCR-Analyse bis zu 95 % der bekannten aktivierenden *ESR1*-Mutationen nachgewiesen werden können (67).

Bei dem ersten Assay zur Detektion der geclusterten Mutationen in Exon 8 (L536P, Y537C, Y537N, Y537S, D538G) handelt es sich um ein *Drop-off*-Assay. Dieses Assay-Prinzip ermöglicht den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Mutationen, die an genomischen Hotspots auftreten (67). Es werden zwei Sonden eingesetzt: eine Wildtyp (WT)- und eine Referenzsonde. Die WT-Sonde (Ex8 Hotspot, HEX-markiert) passt komplementär zur WT-Sequenz der veränderten Region. Sie deckt somit den Bereich ab, der von Mutationen betroffen sein kann. Die Referenzsonde (REFex8, FAM-markiert) bindet spezifisch an einen unveränderlichen Bereich des WT-Allels, die an die Mutationssequenz angrenzt, diese aber nicht überlappt.

Im Falle eines Tröpfchens mit WT-Allel binden beide Sonden an ihre komplementären Sequenzen und erzeugen ein Fluoreszenzsignal, sodass ein zweifach positives Signal entsteht (HEX+/FAM+). Bei Vorliegen einer Mutation, wird die Bindung der WT-Sonde destabilisiert und das Ziel nicht mehr erkannt. Das HEX-Signal nimmt ab und es resultiert lediglich ein einfach positives Ereignis (HEX low/FAM+). Dies bewirkt eine Verschiebung der Punktwolke (MUT Ex8) nach links, hin zu einer einfachen FAM-positiven Population (67). In der Abbildung 6 wird die Funktionsweise der Sonden schematisch dargestellt. Abbildung 7 zeigt die Punktwolkenverteilung des Assays in der Auswertung durch die QuantaSoft-Software. In Kapitel 2.2.5 wird die Auswertung mit der QuantaSoft-Software genauer dargelegt.

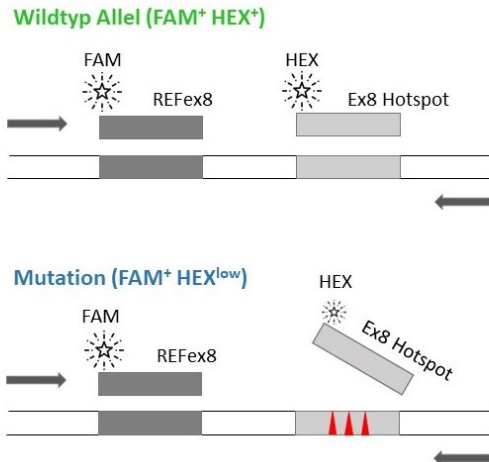


Abb. 6: Schematische Darstellung des Drop-off-Assays zur Detektion des Mutations-Hotspots in Exon 8

Die Referenzsonde (REFex8) und die Wildtyp (WT)-Sonde (Ex8 Hotspot) binden an die doppelsträngige DNA. Bei Vorliegen einer Mutation im Mutations-Hotspot (rote Dreiecke) wird die Bindung der WT-Sonde destabilisiert und das HEX-Fluoreszenzsignal nimmt ab (HEX low).

Abkürzungen: REFex8 – Referenzsonde Exon 8; Ex8 Hotspot – Sonde Exon 8 Hotspot

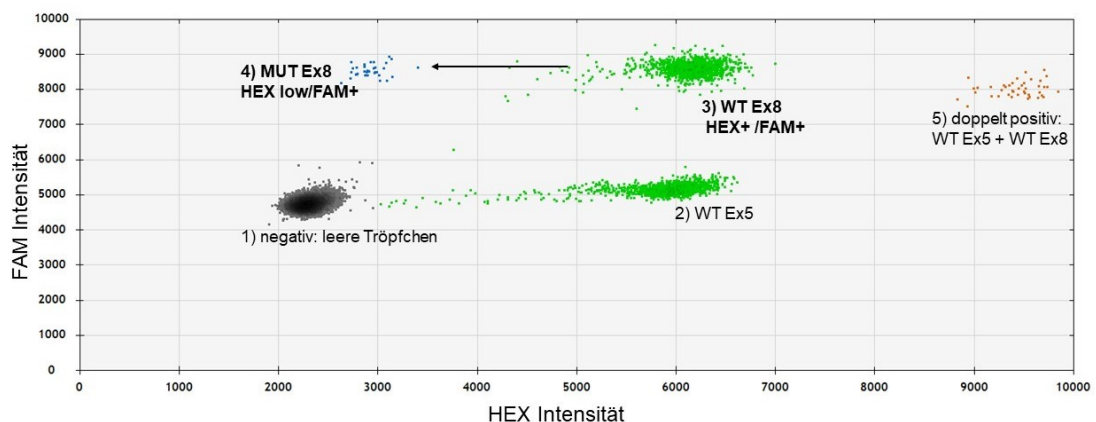


Abb. 7: Punktwolkenverteilung des Drop-off-Assays zur Detektion des Mutations-Hotspots in Exon 8

Das Drop-off-Assay als Teil des *ESR1*-Multiplex-Assays. Während Wildtyp (WT)-Allele des Exons 8 ein zweifach positives Fluoreszenzsignal (HEX⁺/FAM⁺) erzeugen (grüne Punktwolke 3)), bewirken Mutationen im Mutations-Hotspot des Exons 8 eine Linksverschiebung der Punktwolke durch Abnahme des HEX-Fluoreszenzsignals (HEX low) (blaue Punktwolke 4)).

Abkürzungen: WT – Wildtyp; MUT – Mutation; Ex5/8 – Exon 5/8

Das zweite Sondenpaar zielt spezifisch auf die E380Q-Mutation in Exon 5 ab. Eine der beiden Sonden ist komplementär zum E380Q-Mutanten-Allel (E380Q, FAM-markiert). Bei der anderen Sonde handelt es sich um die Referenzsonde (REFex5, HEX-markiert), welche eine benachbarte unveränderliche Region abdeckt.

In diesem unkonventionellen E380Q-Assay sind Tröpfchen, die WT-Allele enthalten, nur HEX-positiv (HEX⁺/FAM⁻), während Tröpfchen mit E380Q-Mutanten-Allelen

zweifach positiv sind (HEX+/FAM+). In der Abbildung 8 wird die Funktionsweise der Sonden schematisch dargestellt. Abbildung 9 zeigt die Punktwolkenverteilung des E380Q-Assays.

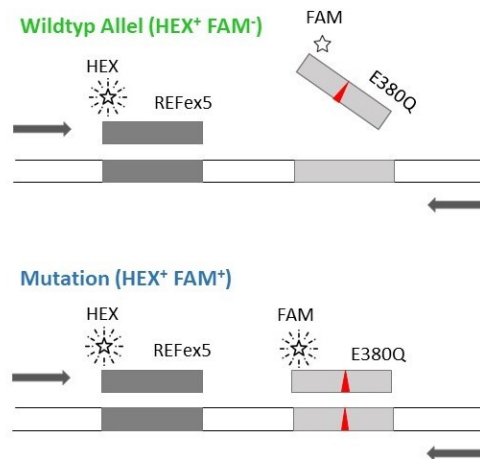


Abb. 8: Schematische Darstellung des Assays zur Detektion der E380Q-Mutation in Exon 5

Die Referenzsonde (REFex5) und die Wildtyp (WT)-Sonde (E380Q) binden an die doppelsträngige DNA. Bei Fehlen der E380Q-Mutation wird die Bindung der WT-Sonde destabilisiert und das FAM-Fluoreszenzsignal erlischt (FAM⁻).

Abkürzungen: REFex5 – Referenzsonde Exon 5

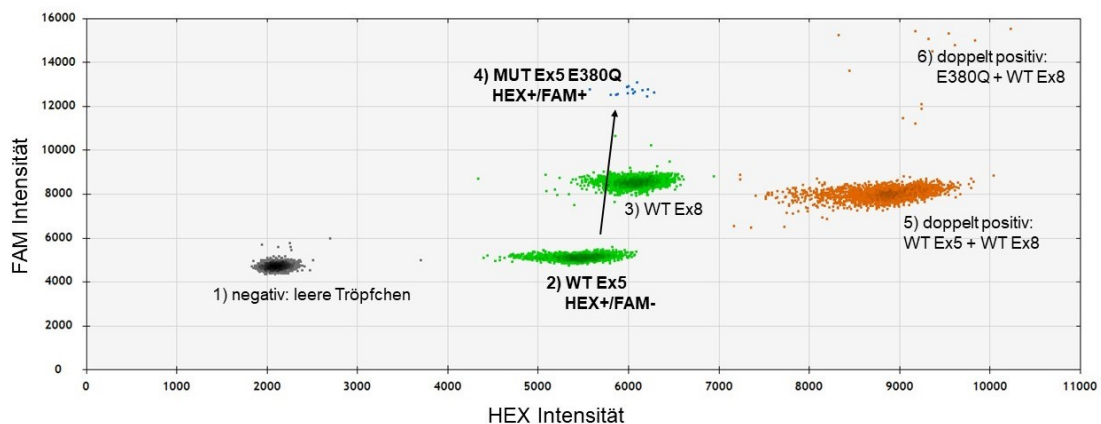


Abb. 9: Punktwolkenverteilung des E380Q-Assays in Exon 5

Das E380Q-Assay als Teil des *ESR1*-Multiplex-Assays. Während Wildtyp (WT)-Allele des Exons 5 ein einfach positives Fluoreszenzsignal (HEX+/FAM⁻) erzeugen (grüne Punktwolke 2)), bewirkt eine E380Q-Mutation eine Verschiebung der Punktwolke nach oben (blaue Punktwolke 4)).

Abkürzungen: WT – Wildtyp; MUT – Mutation; Ex5/8 – Exon 5/8

Weitere Bestandteile des Multiplex-Assays sind drei Kontrollproben: eine Positivkontrolle, eine WT-Kontrollprobe und eine Negativkontrolle (Leerprobe). Die Positivkontrolle repräsentiert jede von dem Assay erfasste Mutation und dient der Überprüfung der Testleistung und Identifizierung der Punktwolken. Die WT-

Kontrollprobe mit MCF-7 ermöglicht eine Schätzung der Falsch-Positiv-Rate. Die Negativkontrolle enthält Nuklease-freies Wasser und dient der Identifizierung von Kontamination. In Abbildung 10 werden drei beispielhafte Kontrollproben dargestellt.

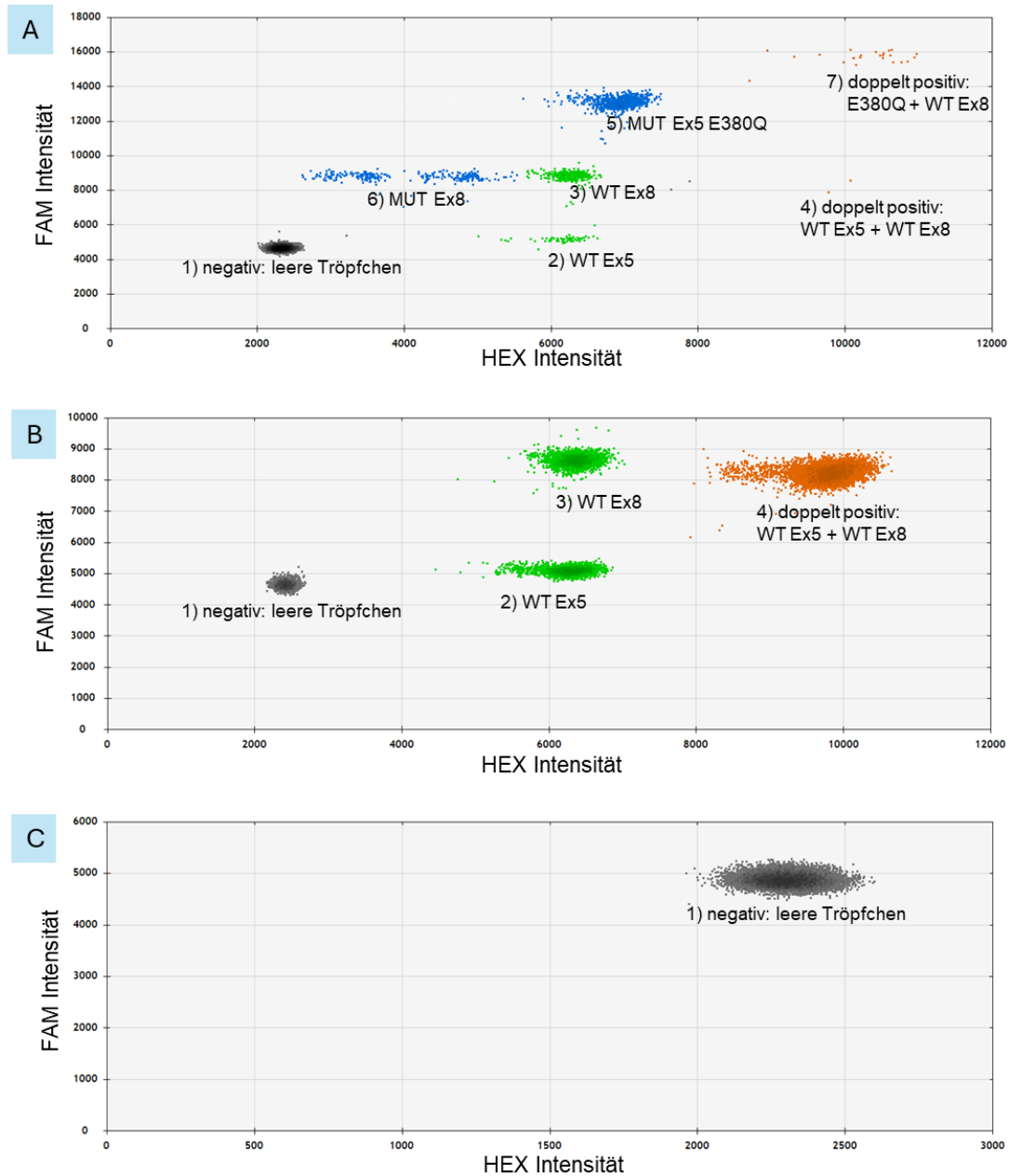


Abb. 10: Drei Kontrollproben des Multiplex-Assays

A) Positivkontrolle, B) Wildtyp-Kontrolle, C) Negativkontrolle (Leerprobe)

Punktswolken: 1) negative Tröpfchen: leere Tröpfchen, 2) Wildtyp Exon 5, 3) Wildtyp Exon 8, 4) doppelt positive Tröpfchen: Wildtyp Exon 5 und Exon 8, 5) Mutation Exon 5 E380Q, 6) Mutation Exon 8, 7) doppelt positive Tröpfchen: E380Q und Wildtyp Exon 8

Abkürzungen: WT – Wildtyp; MUT – Mutation; Ex5/8 – Exon 5/8

2.2.3.2 Optimierung der *Droplet Digital PCR*

In dieser Arbeit wurde für die ddPCR das *QX200 Droplet Digital PCR*-System von der Firma Bio-Rad Laboratories, CA, USA, verwendet.

Zunächst wurden die Primer in einer konventionellen PCR auf ihre korrekte Bindungssequenz überprüft.

Vor der Analyse von Patientinnenproben erfolgte die Optimierung der Assay-Bedingungen. In verschiedenen ddPCR-Läufen (Singleplex-Läufe für die Mutationshotspot in Exon 5 und Exon 8 mit den jeweiligen Primer- und Sondenpaaren sowie anschließend kombiniert als Multiplex-Lauf) wurde mittels Temperaturgradient (49,5-58 °C) die ideale Hybridisierungstemperatur von 56,4 °C und eine *Ramp* von 2 °C/s ermittelt. Im Anhang der Arbeit befindet sich eine Abbildung zum Temperaturgradienten (Abb. 21). In weiteren Durchläufen wurde zudem eine optimale Zyklenzahl von 45 und eine DNA-Menge von 4 µl ermittelt. Bei Wiederholungen unklarer Fälle wurde die DNA-Menge auf 8 µl erhöht. Für die Positivkontrolle, welche alle Mutationen und WT-DNA enthielt, ergab sich die beste Punktwolkenverteilung bei folgenden Konzentrationen: Exon 5 (E380Q): 1 ng/µl; Exon 8 (L536P, Y537C, Y537N, Y537S und D538G): 0,1 ng/µl; MCF-7: 0,1 ng/µl. Die WT-Kontrollprobe enthielt 10 ng/µl MCF-7 und die Negativkontrolle Nuklease-freies Wasser.

Außerdem erfolgte die Ermittlung der Leerwertgrenze (engl. *Limit of Blank, LoB*) und der Nachweisgrenze (engl. *Limit of Detection, LoD*). Siehe Kapitel 2.2.4.

2.2.3.3 Ablauf der *Droplet Digital PCR*

Zunächst erfolgte die Vorbereitung des 20x Mastermix für Exon 5 und Exon 8 wie in Tabelle 10 aufgelistet. Es folgte die Herstellung des Reaktionsgemisches in der empfohlenen Menge von 20 µl in der Zusammensetzung wie in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des 20x Mastermixes für Mutations-Hotspots in Exon 5 und Exon 8 des *ESR1*-Gens

<i>Forward Primer</i> (100 µmol)	18 µl
<i>Reverse Primer</i> (100 µmol)	18 µl
Wildtyp-Sonde (100 µmol)	5 µl
Mutations-Sonde (100 µmol)	5 µl
Nuklease-freies Wasser	54 µl
20x Mastermix	100 µl

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches

Bio-Rad Supermix	10 µl
20x Mastermix Exon 5	1 µl
20x Mastermix Exon 8	1 µl
Proben-ctDNA	4 µl
Nuklease-freies Wasser	4 µl
Reaktionsgemisch	20 µl

Um eine hohe Sensitivität zu erreichen, wurden alle Proben als Triplikate untersucht (115).

Das anschließende ausführliche Vortexen für 30 Sekunden und Zentrifugieren des Reaktionsgemisches erwies sich als besonders wichtig. Nun wurden die 20 µl Reaktionsgemisch pro Probe jeweils in die vorhergesehenen *wells* einer eingespannten Kartusche (*DG Cartridge*) pipettiert. Es folgten 70 µl Tröpfchenerzeugungsöl pro *well* der unteren Reihe und das Bedecken der befüllten Kartusche mit einem Dichtungsgummi (*DG Gasket*). Danach wurden im *QX200 Droplet Generator* (Bio-Rad Laboratories) bis zu 20.000 Tröpfchen pro *well* innerhalb eines Durchlaufs von ca. 2 Minuten erzeugt, welche vorsichtig mit einer Multipipette in eine 96-*well*-Platte überführt wurden. Die Platte wurde mit einer Aluminiumfolie (*Heat Seal-Folie*) bedeckt und mittels Plattenversieglers *PX1 PCR Plate Sealer* (Bio-Rad Laboratories) bei 180 °C versiegelt. Nun wurde die Platte für die PCR-Amplifikation in den *C1000 Touch Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories) gegeben und das *Thermal cycling* Protokoll gestartet. Wie in Tabelle 12 aufgeführt, wurden die Proben zunächst für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt, was zur Denaturierung der DNA führt. Anschließend liefen 45 Zyklen einer 30-sekündigen erneuten Denaturierung bei 94 °C sowie einer 60-sekündigen Primer-Hybridisierung. Die Hybridisierung erfolgte bei einer Temperatur von 56,4 °C. Nach 45 Zyklen wurden die Proben für die Elongation 10 Minuten bei 98 °C erwärmt. Um eine gute Stabilität der Tröpfchen und eine optimale Anzahl an Tröpfchen von mindestens 10.000 bis max. 20.000 pro *well* zu erreichen, wurde die 96-*well*-Platte nach dem ca. 2-stündigen Thermozyklus für mindestens weitere 12 Stunden im *Thermocycler* bei 12 °C belassen. In einer Arbeit von Rowlands et al. wurde von einer Verformung der Tröpfchen durch Kondensation unmittelbar nach der PCR mit anschließend deutlich geringerer gemessener Tröpfchenanzahl berichtet (110).

Tabelle 12: Thermal cycling Protokoll *ESR1*-Multiplex

Ablauf	Temperatur	Dauer
1. Polymerase-Aktivierung (Denaturierung)	95 °C <i>Ramp 2 °C/s</i>	00:10:00
2. Denaturierung	94 °C <i>Ramp 2 °C/s</i>	00:00:30
3. Primer-Hybridisierung	56,4 °C	00:01:00
4. Elongation	98 °C <i>Ramp 2 °C/s</i>	00:10:00
5. Stabilisierung	12 °C	12:00:00

45 x

Am folgenden Tag erfolgte der letzte Schritt des Verfahrens. Für das Auslesen der Proben im *QX200 Droplet Reader* (Bio-Rad Laboratories) mit der *QX200 QuantaSoft*-Software (Bio-Rad Laboratories) wurde ein FAM- und HEX-Assay angewendet sowie die *Rare Event Detection* (RED)-Einstellung gewählt. In der Abbildung 11 werden der Ablauf der ddPCR und die verwendeten Geräte dargestellt.

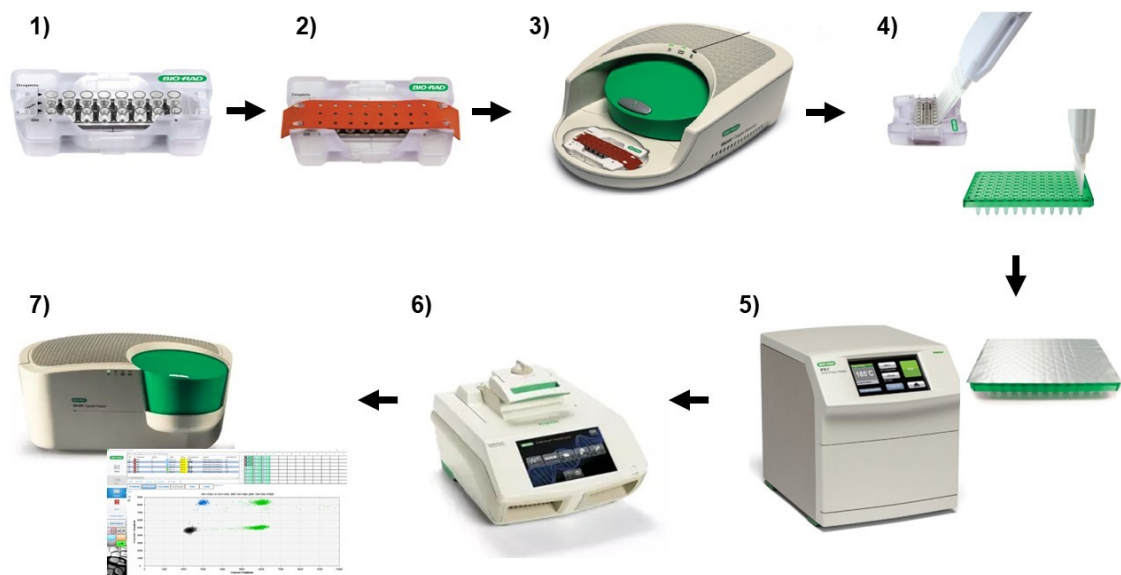


Abb. 11: Ablauf der Droplet Digital PCR

1) Kartusche (*DG Cartridge*) eingespannt in Kartuschenhalterung, 2) Befüllte Kartusche mit Dichtungsgummi (*DG Gasket*) versehen, 3) *QX200 Droplet Generator* mit Kartusche befüllt, 4) Überführen der Tröpfchen aus der Kartusche in eine 96-well-Platte mittels Multipipette, 5) Bedecken der Platte mit einer Aluminiumfolie (*Heat Seal-Folie*) und Versiegelung im Plattenversiegler (*PX1 PCR Plate Sealer*), 6) PCR-Amplifikation im *C1000 Touch Thermal Cycler*, 7) Auslesen der Proben im *QX200 Droplet Reader* mit der *QX200 QuantaSoft*-Software. Verwendung der Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von Bio-Rad Laboratories GmbH (116).

2.2.4 Bestimmung einer Leerwertgrenze und Nachweisgrenze

Die Leerwertgrenze (engl. *Limit of Blank*, LoB) und die Nachweisgrenze (engl. *Limit of Detection*, LoD) sind wichtige Parameter zur Bewertung der Empfindlichkeit eines Assays. Die LoB gibt per Definition die höchste Analytkonzentration an, die erwartet wird, wenn Proben, die kein Analyt enthalten, wiederholt getestet werden (117). In ddPCR-Experimenten stellt die untersuchte Mutation den Analyten dar. Zur Bestimmung der LoB wurden 31 Replikate von WT-DNA der Zelllinie MCF-7 (5 ng/ µl) analysiert. Als falsch positive Ereignisse wurden Tröpfchen angesehen, die im Bereich der Mutationswolken erschienen, obwohl ausschließlich WT-DNA getestet wurde. Die LoB wird mit folgender Formel berechnet:

$$LoB = \text{Mittelwert}_{(Leerprobe)} + 1,645 \times \text{Standardabweichung}_{(Leerprobe)}$$

Die LoD ist definiert als die niedrigste Analytkonzentration, bei der zuverlässig von der LoB unterschieden werden kann und bei der ein Mutationsnachweis möglich ist (117). Zur Bestimmung der LoD wurde jeweils für Exon 5 und Exon 8 eine serielle Verdünnung von DNA einer Patientin mit bekannten *ESR1*-Mutationen durchgeführt. Es erfolgte die Analyse der DNA in variierenden Konzentrationen (0,5 ng/µl, 0,05 ng/µl, 0,005 ng/µl, 0,0005 ng/µl, 0,00005 ng/µl) in 10 ng/µl WT-DNA im Hintergrund. Die erwarteten Mutations-Allelfrequenzen (engl. *mutant allele frequencies*, MAFs) lagen somit bei 5 %, 0,5 %, 0,05 %, 0,005 % und 0,0005 %.

2.2.5 Auswertung QuantaSoft-Software

Die Auswertung erfolgte mit der *QuantaSoft*-Software (Version 1.7.4.0917, Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Wells mit mindestens 10.000 akzeptierten Tröpfchen wurden in die Datenanalyse einbezogen. Bei triplierten Proben ergab sich eine Mindestanzahl von mindestens 30.000 Tröpfchen pro Probe.

Ein Punkt entspricht in der Auswertung einem Tröpfchen. Die Daten einer ddPCR können im 1-D- und 2-D-Plot dargestellt werden. Im 1-D-Plot wird die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Tröpfchenanzahl aufgeführt. Für Multiplex Assays ist jedoch das 2-D-Plot die relevante Darstellung. Hier wird für jedes Tröpfchen die Fluoreszenzintensität von Kanal 1 (FAM) gegen die Fluoreszenzintensität von Kanal 2 (HEX) aufgetragen und es ergeben sich Punktwolken.

Zu Beginn wurden die drei Kontrollproben (Positivkontrolle, WT-Kontrollprobe und Negativkontrolle (Leerprobe)) im 2-D-Plot analysiert. Es wurde auf eine deutliche Separierung der Punktwolken geachtet, sodass in den Kontrollproben jeweils Grenzen zur Zuordnung der Punkte zu den sieben jeweiligen Gruppen gesetzt werden konnten. Abbildung 12 zeigt das Punktwolken-Diagramm des *ESR1*-Multiplex-Assays, in dem die verschiedenen Punktwolken-Kombinationen enthalten sind: „negative/leere Tröpfchen“ (1), „Wildtyp Exon 5“ (2), „Wildtyp Exon 8“ (3), „Mutations-Hotspot Exon 8“

(4), „Mutation Exon 5 E380Q“ (5) sowie die doppelt positiven Punktwolken „Wildtyp Exon 8 und Mutation E380Q“ (6) und „Wildtyp Exon 5 und Exon 8“ (7) dienen. Die Punkte können mittels verschiedener Farben den Gruppen zugeordnet werden. In Tabelle 13 werden die Punktwolken mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-Intensitäten aufgelistet. Für die E380Q-Mutation entspricht die Anzahl der mutierten DNA-Kopien der Anzahl der Tröpfchen der Wolken 5 und 6. Die MAF ergibt sich aus folgender Rechnung: Wolken (5+6) / Wolken (5+6+2+7). Mutationen in Exon 8 werden durch die Pünktchen der Wolke 4 abgebildet. Die MAF wurde wie folgt berechnet: Wolke 4 / Wolken (4+3+7).

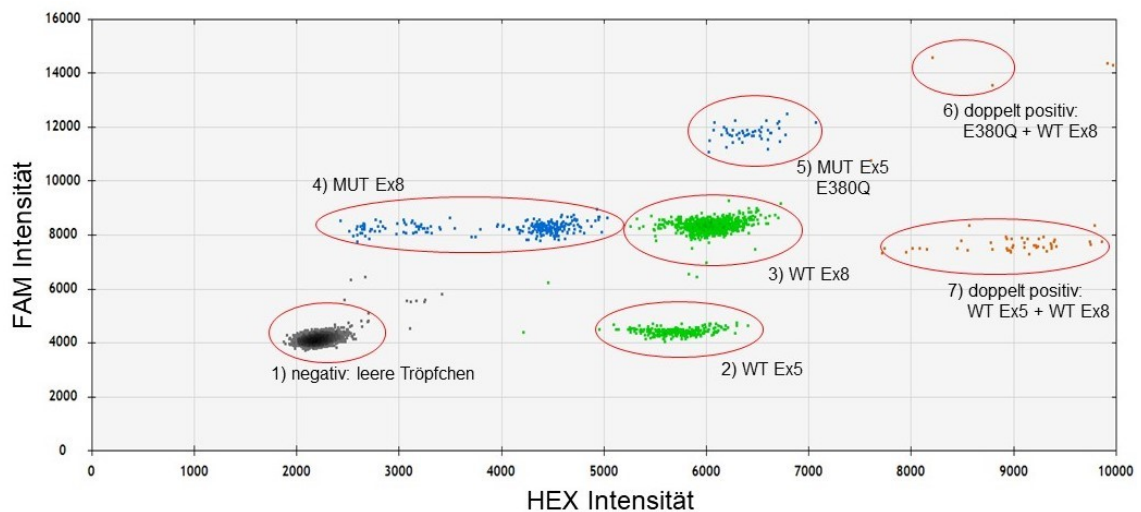


Abb. 12: Punktwolken-Diagramm des *ESR1*-Multiplex-Assays

Punktwolken-Verteilung des *ESR1*-Multiplex-Assays mit sieben voneinander getrennten Punktwolken, welche den einzelnen Mutationen bzw. den Mutations-Hotspots zugeordnet werden.

Abkürzungen: WT – Wildtyp; MUT – Mutation; Ex5/8 – Exon 5/8

Tabelle 13: Punktwolken und HEX/FAM Intensität

Punktwolke	HEX/FAM Intensität
1) negativ: leere Tröpfchen	HEX-/FAM-
2) WT Ex5	HEX+/FAM-
3) WT Ex8	HEX+/FAM+
4) Mut Ex8	HEX low/FAM+
5) Mut Ex5 E380Q	HEX+/FAM+
6) WT Ex8 und Mut E380Q	HEX+/FAM+
7) WT Ex5 und Ex8	HEX+/FAM+

Abkürzungen: WT – Wildtyp; MUT – Mutation; Ex5/8 – Exon 5/8

Auf Basis dieser Grenzen erfolgte anschließend die Auswertung der Patientinnenproben. Ab einem Nachweis von 3 positiven Tröpfchen und einer MAF über der LoD wurde eine Probe als Mutations-positiv gewertet (67, 109, 110, 115).

2.2.6 Statistik

Die statistische Analyse der Patientinnendaten erfolgte mit IBM SPSS Statistics Version 29.0.0.0 für Windows. Zur Korrelation der klinisch-pathologischen Daten und dem Nachweis von *ESR1*-Mutationen wurden Chi-Quadrat-Tests (X^2) durchgeführt. Des Weiteren wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven zum Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben erstellt und mittels Log Rank-Tests verglichen.

Sofern nicht anders angegeben, waren die p -Werte zweiseitig und wurden als signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war.

Die in dieser Arbeit dargestellten Graphen und Abbildungen wurden mit Microsoft Excel Version 2306, Microsoft Power Point Version 2306, GraphPad Prism 9.5.1, IBM SPSS Statistics Version 29.0.0.0 und QuantaSoft Software Version 1.7.4.0917 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines ddPCR-Assays zur Detektion von *ESR1*-Mutationen in ctDNA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein ddPCR-Assay zur Detektion von *ESR1*-Mutationen in ctDNA etabliert. Die Gewinnung der ctDNA erfolgte mittels LB. In zahlreichen ddPCR-Läufen wurden die optimalen Bedingungen für die Multiplex-ddPCR-Analyse ermittelt. Dies wurde im Methodenteil beschrieben (siehe 2.2.3.2). Tabelle 14 stellt den schematischen Ablauf der finalen ddPCR-Analyse dar.

Tabelle 14: Schema der ddPCR-Analyse im chronologischen Ablauf

ctDNA-Extraktion mittels <i>QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit</i> (Qiagen, Deutschland) und Lagerung bei -20 °C	
Auftauen der Proben für 20 min	
Herstellung des Reaktionsgemisches 20 µl	
Bio-Rad Supermix	10 µl
20x Mastermix Exon 5	1 µl
20x Mastermix Exon 8	1 µl
Proben-ctDNA	4 µl
Nuklease-freies Wasser	4 µl
Reaktionsgemisch	20 µl
Vortexen 30 s und Zentrifugieren des Reaktionsgemisches	
Befüllen der <i>Cartridge</i> mit dem Reaktionsgemisch und dem Tröpfchenerzeugungsöl	
Generierung der Tröpfchen mittels <i>QX200 Droplet Generator</i> (Bio-Rad Laboratories, USA), 2 min	
Transferieren der Tröpfchen in eine 96-well-Platte	
Versiegelung der 96-well-Platte mittels <i>PX1 PCR Plate Sealer</i> (Bio-Rad Laboratories, USA) bei 180 °C	

PCR-Amplifikation mittels *C1000 Touch Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, USA), gemäß folgendem *Thermal cycling* Protokoll, ca. 2 h:

Ablauf	Temperatur	Dauer
1. Polymerase-Aktivierung (Denaturierung)	95 °C <i>Ramp 2 °C/s</i>	00:10:00
2. Denaturierung	94 °C <i>Ramp 2 °C/s</i>	00:00:30
3. Primer-Hybridisierung	56,4 °C	00:01:00
4. Elongation	98 °C <i>Ramp 2 °C/s</i>	00:10:00

 45 x

Belassen der 96-well-Platte im Thermocycler für mindestens 12 h bei 12 °C zur Stabilisierung der Tröpfchen

Auslesen der Proben im *QX200 Droplet Reader* (Bio-Rad Laboratories, USA) und Auswertung mittels *QX200 QuantaSoft*-Software (Bio-Rad Laboratories, USA)

3.2 Patientinnenkollektiv

Insgesamt konnten 103 Plasmaproben von 78 Patientinnen mit MBC in die Arbeit aufgenommen werden. Eine Plasmaprobe konnte wahrscheinlich aufgrund von degradierter ctDNA nicht ausgewertet werden und wurde aus der Untersuchung ausgeschlossen. Von 78 Patientinnen wurde bei Studienbeginn jeweils eine Blutprobe abgenommen. Bei Progress erfolgte bei 21 Patientinnen eine zweite, bei drei Patientinnen eine dritte und bei einer Patientin eine vierte Probenentnahme.

3.2.1 Altersverteilung

Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme befanden sich die Patientinnen im Alter zwischen 31 und 88 Jahren. Das mediane Alter lag bei 62 Jahren (IQR 52,8-72). Das durchschnittliche Alter betrug 61,4 Jahre (SD = 12,7). Abbildung 13 zeigt die Altersverteilung des Patientinnenkollektivs.

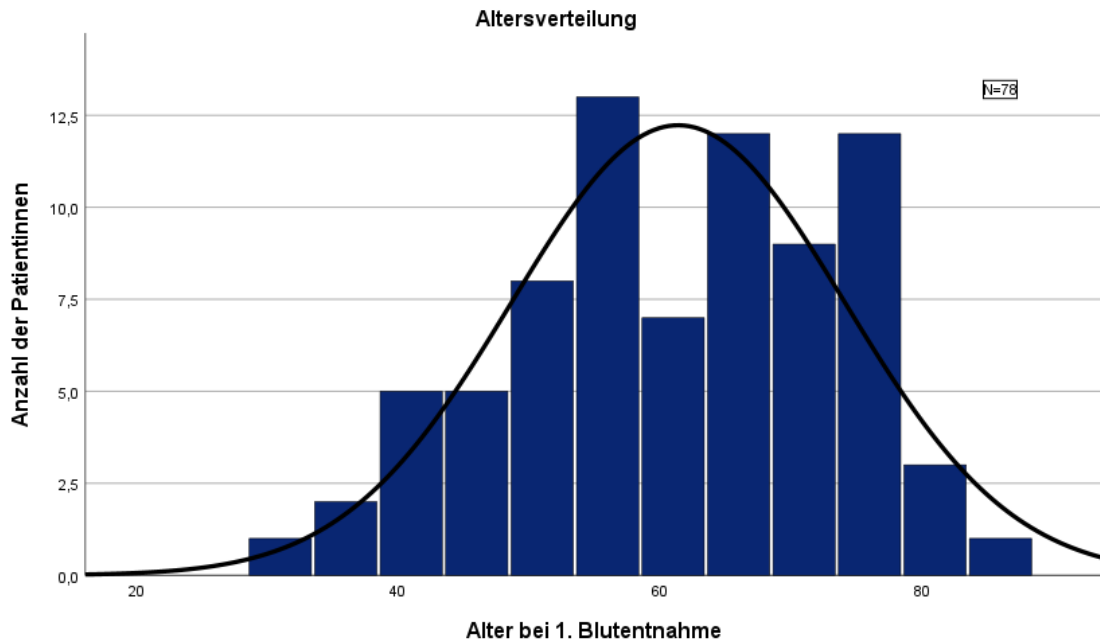


Abb. 13: Altersverteilung des Patientinnenkollektivs

3.2.2 Klinisch-pathologische Daten zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme

Die klinisch-pathologischen Daten der 78 Patientinnen sind in Tabelle 15 aufgeführt. Die Daten beziehen sich auf den Zeitpunkt der ersten Blutentnahme.

Die Mehrheit der Patientinnen befand sich in der Postmenopause (80,8 %).

Bezüglich des Gradings handelte es sich bei 2 Patientinnen (2,6 %) um Grad 1, bei 49 Patientinnen (62,8 %) um Grad 2 und bei 14 Patientinnen (17,9 %) um Grad 3. Bei 13 Patientinnen war das Grading unbekannt.

Knapp ein Viertel der Patientinnen war primär metastasiert (23,1 %). Alle Patientinnen wiesen einen positiven ER-Status des Primarius auf. Ebenso war der PR-Status überwiegend positiv (83,3 %). Bei allen Patientinnen lag ein negativer HER2-Status vor. Ossäre und viszerale Metastasen traten am häufigsten auf (57,7 %). 14 Patientinnen wiesen eine ausschließlich ossäre Metastasierung auf. Bei 4 Patientinnen lag eine ZNS-Metastasierung vor und bei 26 Patientinnen eine Metastasierung an anderer Lokalisation. Hierbei handelte es sich um Lymphknotenmetastasen, Metastasen der Haut und des Augenlids.

Etwas mehr als die Hälfte der Patientinnen hatte eine (neo)adjuvante Chemotherapie (56,4 %) erhalten. Die überwiegende Mehrheit (91 %) hatte bis zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme mindestens eine endokrine Vortherapie erhalten. Diese beinhaltete bei 54 Patientinnen Als, bei 39 Patientinnen Tamoxifen, bei 14 Patientinnen Fulvestrant und bei 8 Patientinnen GnRH-Analoga. 11 Patientinnen erhielten CDK4/6-Inhibitoren in der Vortherapie.

29 Patientinnen (37,2 %) befanden sich in der ersten Therapielinie, davon waren 5 primär metastasiert, sodass Therapienaivität vorlag. 62,8 % der Patientinnen (49 Patientinnen) befanden sich in der zweiten oder einer höheren Therapielinie.

Entsprechend der Definition zur endokrinen Resistenz nach AGO-Leitlinie (4) wiesen 22 Patientinnen (28,2 %) keine endokrine Resistenz auf. Bei 13 Patientinnen (16,7 %) lag eine primäre Resistenz vor. Bei 35 Patientinnen (44,7 %) bestand eine sekundäre Resistenz.

Tabelle 15: Klinisch-pathologische Daten der Patientinnen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme

Variable	Anzahl der Patientinnen N=78 N	Anteil der Patientinnen (%)
Menopausenstatus		
Prämenopausal	15	19,2
Postmenopausal	63	80,8
Grading		
G1	2	2,6
G2	49	62,8
G3	14	17,9
Unbekannt	13	16,7
ER-Status Primarius		
Positiv	78	100
Negativ	0	0
PR-Status Primarius		
Positiv	65	83,3
Negativ	13	16,7
HER2-Status Primarius		
Positiv	0	0
Negativ	78	100
Metastasenlokalisation		
Ossär	45 ¹⁾	57,7
Viszeral	45	57,7
ZNS	4	5,1
Andere	26	33,3

Vorthherapie		
(Neo)adjuvante Chemotherapie	44	56,4
Endokrine Therapie	71	91,0
Aromatase-Inhibitoren	54	69,2
Tamoxifen	39	50,0
Fulvestrant	14	17,9
GnRH-Analoga	8	10,3
CDK4/6-Inhibitoren	11	14,1
Therapielinie		
1. Linie	29 ²⁾	37,2
≥ 2. Linie	49	62,8
Endokrine Resistenz		
Keine	22	28,2
Primäre	13	16,7
Sekundäre	35	44,9
Unklar ³⁾	8	10,3

¹ davon 14 (17,9 %) nur ossär metastasiert

² davon 5 (6,4 %) primär metastasiert und therapienaiv

³ keine endokrine Therapie erhalten oder kein Progress aufgetreten

3.3 Detektion von *ESR1*-Mutationen

3.3.1 Leerwertgrenze und Nachweisgrenze

Die Bestimmung der LoB erfolgte, wie in Kapitel 2.2.4 *Bestimmung einer Leerwertgrenze und Nachweisgrenze* beschrieben, mittels ddPCR-Analyse von 31 Replikaten, die ausschließlich WT-DNA enthielten. Gemäß der Definition von Armbruster et al. repräsentiert die LoB die höchste scheinbare Analytenkonzentration, die in Leerproben erwartet wird (117). Es wurden keine falsch-positiven Tröpfchen im Bereich der Mutationswolken detektiert. Somit lag die LoB für das Multiplex-Assay für Exon 5 und Exon 8 bei 0 % (0 von 198.320 WT-Kopien).

Die LoD, definiert als die niedrigste Konzentration eines Analyten, die zuverlässig von einer Leerprobe unterschieden und nachgewiesen werden kann (117), wurde auf Basis der LoB theoretisch abgeleitet und empirisch bestimmt. In Anlehnung an Milbury et al. wurde die theoretische LoD auf 3 Tröpfchen festgelegt (109). Dies bedeutet, dass die Anzahl der detektierten Tröpfchen in den Mutationsbereichen den Schwellenwert von mindestens 3 erreichen muss, um eine Probe als positiv für die jeweilige Mutation zu klassifizieren. Dieser Ansatz berücksichtigt, dass selbst bei keinen falsch-positiven Ereignissen eine Mindestanzahl von Zielmolekülen vorhanden sein muss, um die Wahrscheinlichkeit einer falsch-negativen Aussage niedrig zu halten. Zur Bewertung

der Empfindlichkeit des Assays und zur Bestimmung der in-vitro LoD wurde für Exon 5 und Exon 8 jeweils eine serielle Verdünnung von mutierter DNA mit variierenden Konzentrationen in einem Hintergrund von WT-DNA durchgeführt. Es erfolgte die Analyse von mutierter DNA mit MAFs von 5 % bis 0,0005 %. Für beide untersuchten Mutationshotspots, sowohl in Exon 5 als auch in Exon 8, konnten die jeweiligen Mutationen bis zu einer Konzentration von 0,0005 ng/µl nachgewiesen werden. Daraus resultierte eine LoD von 0,005 %. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung.

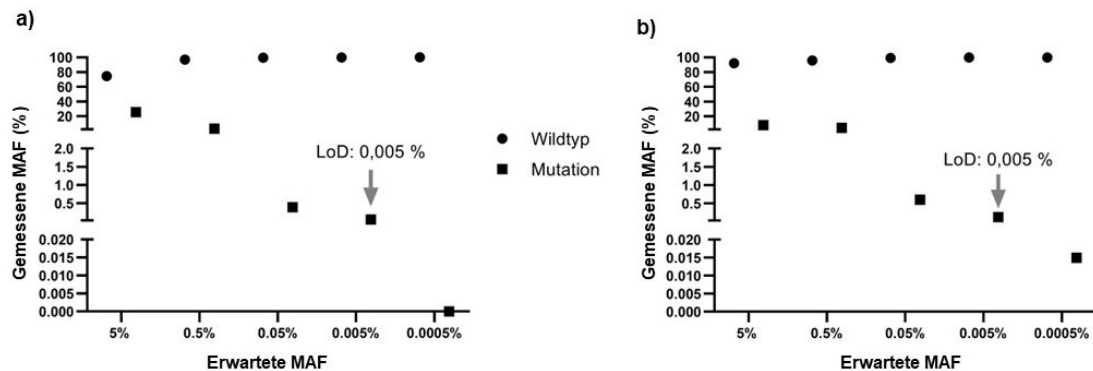


Abb. 14: Serielle Verdünnung zur Bestimmung der a) LoD Exon 5 und b) LoD Exon 8

Abkürzungen: MAF – *mutant allele frequency*; LoD – *Limit of detection*

3.3.2 Nachweis von *ESR1*-Mutationen

Insgesamt konnten 103 Proben in die Analyse eingeschlossen werden. In 28 Proben (27,2 %) wurde mindestens eine Mutation detektiert. In zwei Proben lag eine Mutation in Exon 5 vor, in 22 Proben in Exon 8 und in vier Fällen in beiden Hotspot-Regionen. Abbildung 15 stellt die Mutationsverteilung dar.

Bei 25 der insgesamt 78 Patientinnen (32,1 %) konnte mindestens in einer Blutentnahme eine *ESR1*-Mutation nachgewiesen werden.

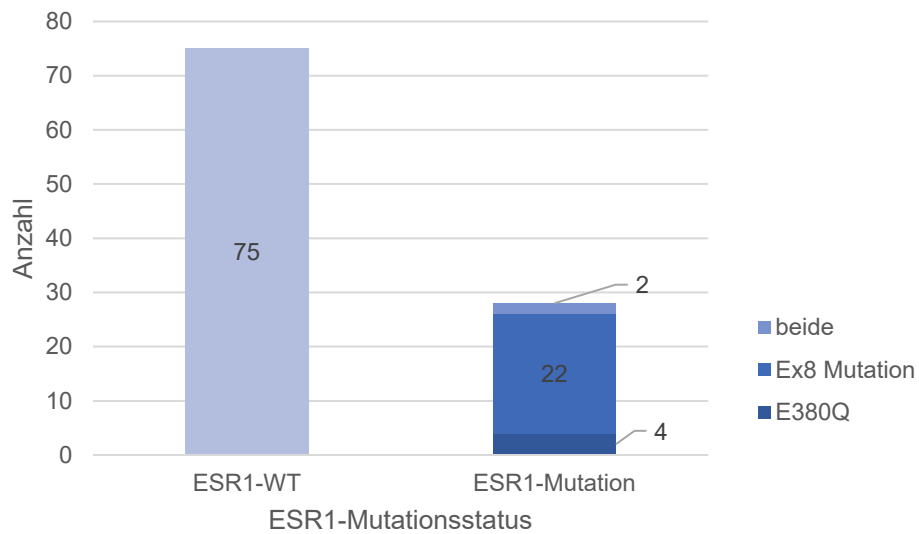


Abb. 15: *ESR1*-Mutationsstatus der 103 untersuchten Plasmaproben

Abkürzungen: WT – Wildtyp; Ex8 – Exon 8

Abbildung 16 zeigt Beispiele der mit Hilfe der QuantaSoft-Software ausgewerteten und visualisierten Analysen mit typischen Punktwolkenverteilungen bei Vorliegen einer oder mehrerer Mutationen.

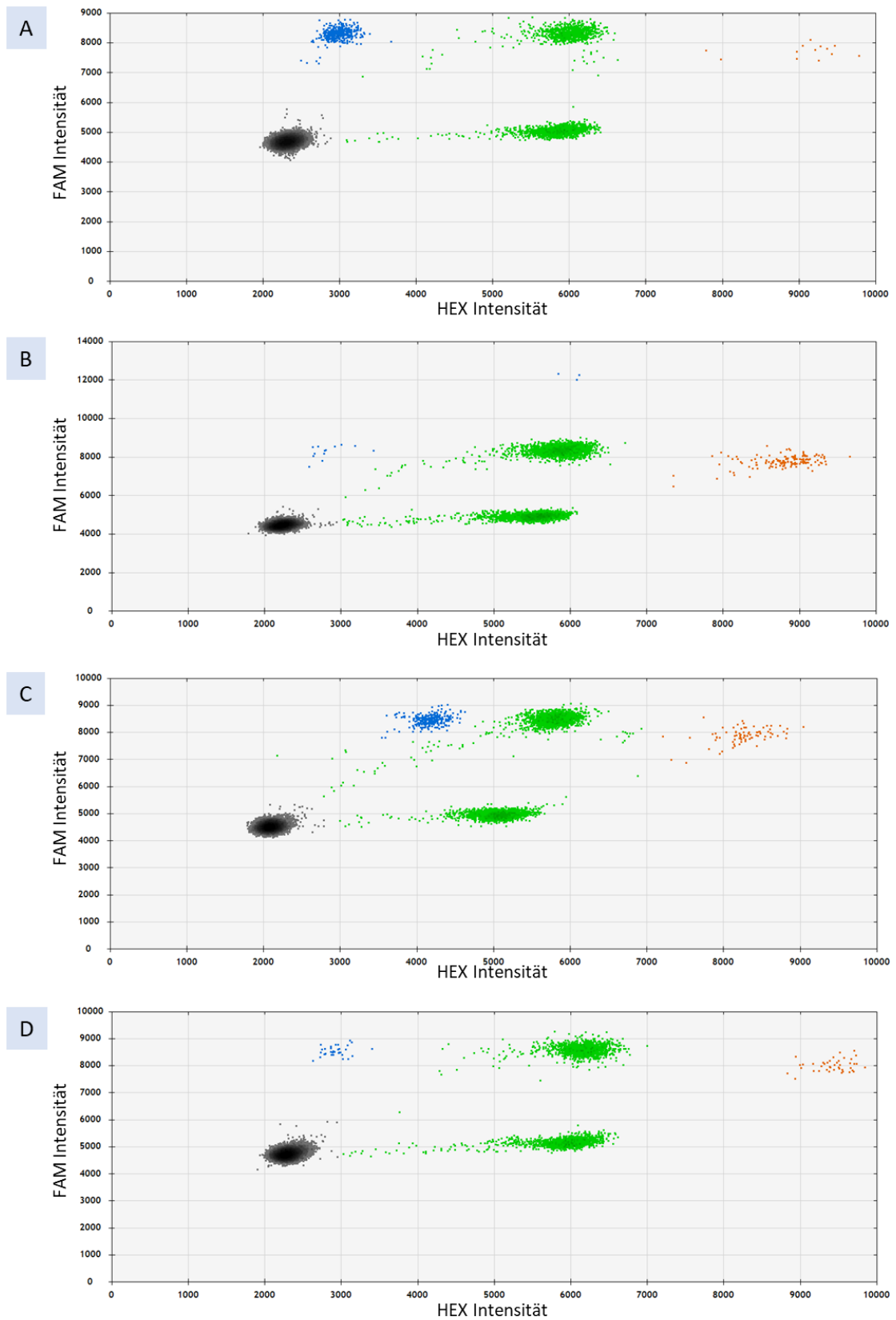


Abb. 16: Typische Punktwolkenverteilungen bei Vorliegen einer oder mehrerer Mutationen

A) Nachweis einer Mutation in Exon 8, B) Nachweis einer Mutation in Exon 8 sowie Exon 5 (E380Q), C) Nachweis einer Mutation in Exon 8, D) Nachweis einer Mutation in Exon 8

In der Abbildung 17 werden die 16 Patientinnen, bei denen in der ersten Blutentnahme ein Mutationsnachweis vorlag, aufgelistet und das jeweilige Krankheitsgeschehen mit erfolgten Behandlungen in chronologischer Abfolge dargestellt. In zwei Fällen wurde eine *ESR1*-Mutation in einer weiteren Blutentnahme erneut nachgewiesen (P-48 und P-64). Bei Patientin P-48 lag in der ersten Probe lediglich eine E380Q-Mutation vor, in der zweiten Blutentnahme zeigten sich Mutationen in beiden Hotspots. In drei Fällen (P-23, P-30, P-60) wurden *ESR1*-Mutationen nachgewiesen, obwohl keine antiöstrogene Vortherapie vorlag.

Abbildung 18 bildet die Fälle ab, welche erst in der zweiten oder dritten Blutentnahme, die bei Krankheitsprogress gewonnen wurden, einen positiven Mutationsstatus aufwiesen. Umgekehrt gab es auch einen Fall, bei dem ein Mutationsverlust beobachtet wurde (P-28).

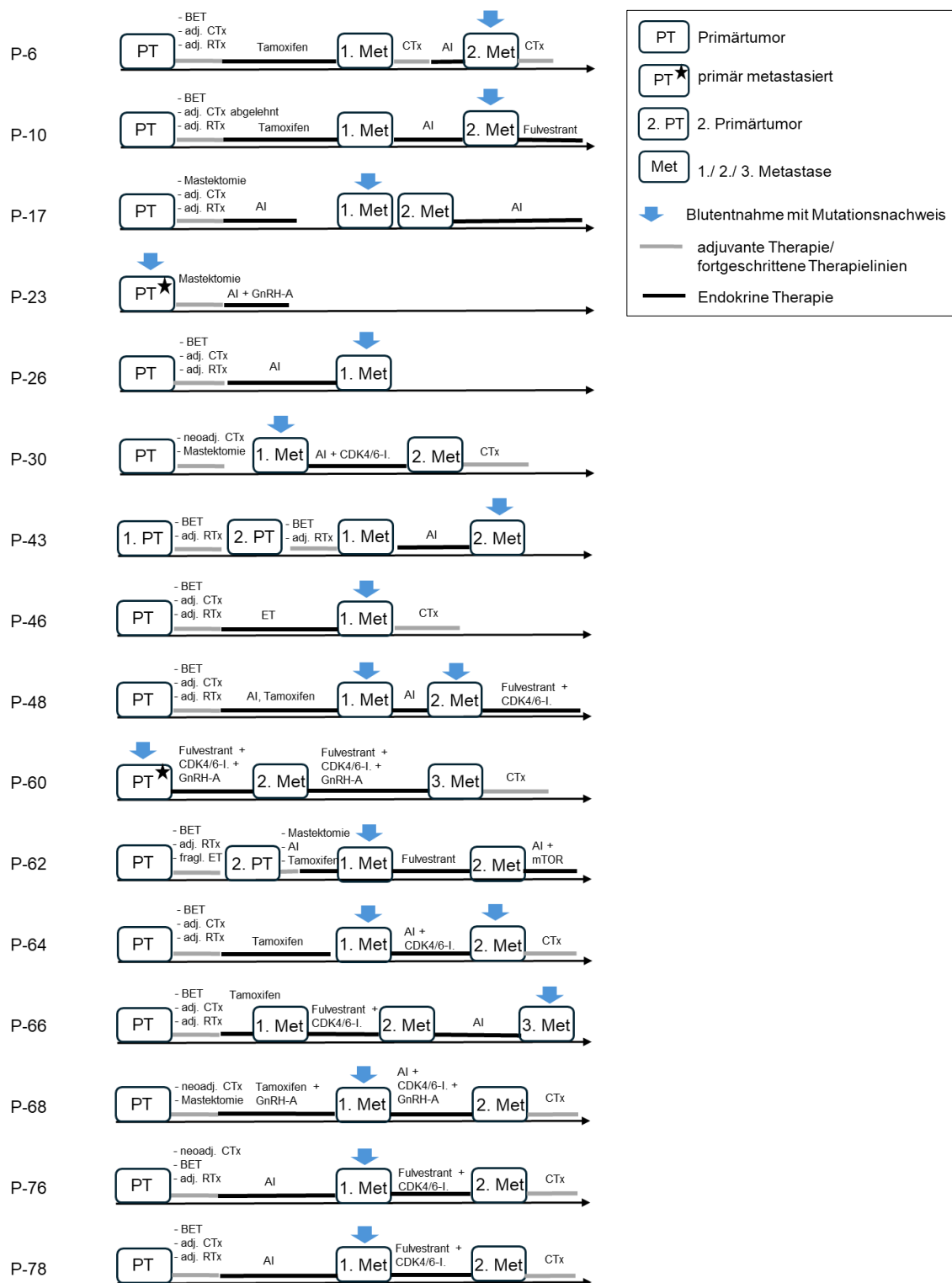


Abb. 17: Krankheitsverlauf der 16 Patientinnen mit Mutationsnachweis in der ersten Blutentnahme

Abkürzungen: P – Patientin; PT – Primärtumor; BET – brusterhaltende Therapie; Met – Metastase; AI – Aromataseinhibitor; CTx – Chemotherapie; RTx – Radiatio; ET – endokrine Therapie; (neo)adj. – (neo)adjuvant; CDK4/6-I. – CD4/6-Inhibitor; GnRH-A. – GnRH-Agonist

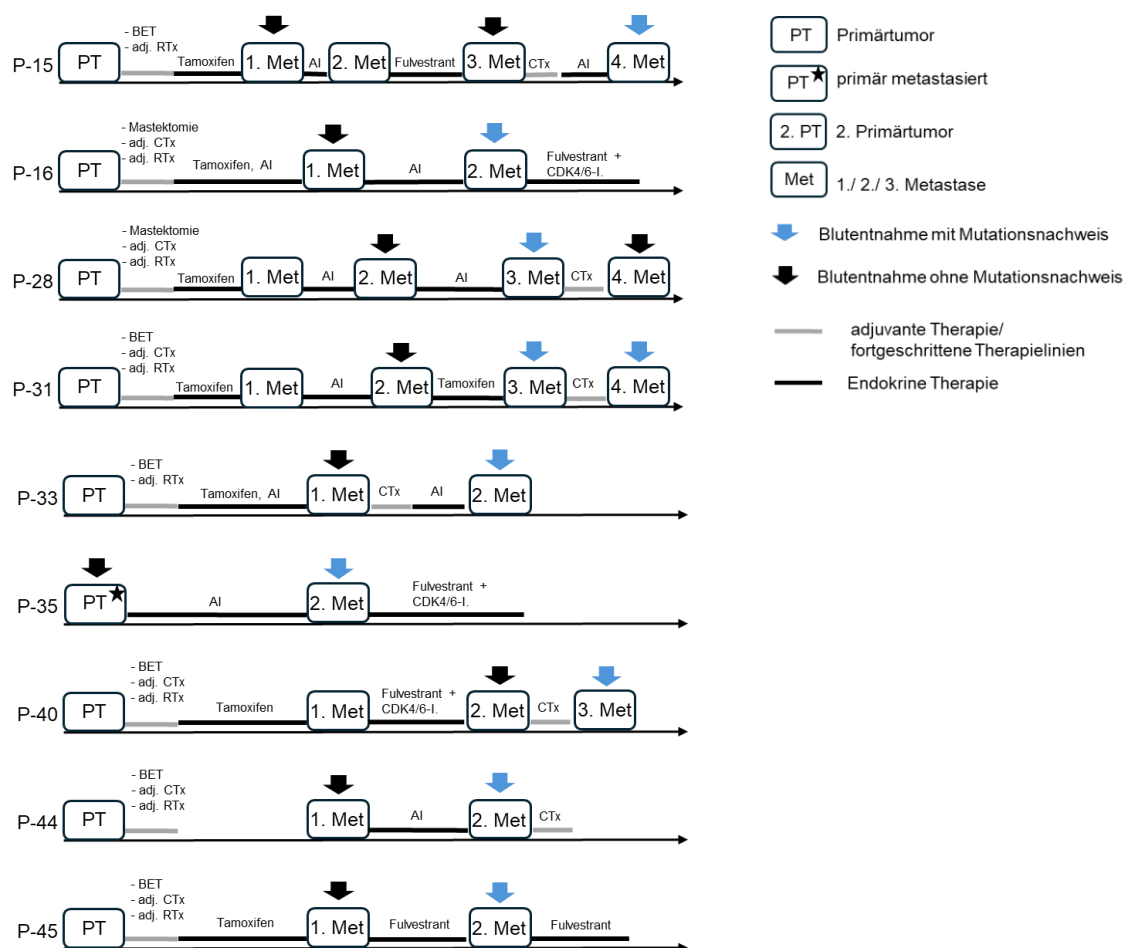


Abb. 18: Krankheitsverlauf der Fälle mit Mutationsnachweis in der zweiten oder dritten Blutentnahme

Abkürzungen: P – Patientin; PT – Primärtumor; BET – brusterhaltende Therapie; Met – Metastase; AI – Aromataseinhibitor; CTx – Chemotherapie; RTx – Radiatio; ET – endokrine Therapie; (neo)adj. – (neo)adjuvant; CDK4/6-I. – CD4/6-Inhibitor; GnRH-A. – GnRH-Agonist

In Tabelle 16 werden alle 103 Proben mit und ohne Mutationsnachweis im Verlauf der Blutentnahmen aufgelistet.

Tabelle 16: Übersicht der Proben mit und ohne Mutationsnachweis im Verlauf von der 1. bis 4. Blutentnahme

	Anzahl der Patientinnen	(%)
1. Blutentnahme	78	
Mutation	16	20,5
Exon 5	2	12,5
Exon 8	12	75,0
Beide	2	12,5
Keine Mutation	62	79,5

2. Blutentnahme	21	
Mutation	10	47,6
Exon 5	0	0
Exon 8	8	80
Beide	2	20
Keine Mutation	11	52,4
3. Blutentnahme	3	
Mutation	1	33,3
Exon 5	0	0
Exon 8	1	100
Beide	0	0
Keine Mutation	2	66,7
4. Blutentnahme	1	
Mutation	1	100
Exon 5	0	0
Exon 8	1	100
Beide	0	0
Keine Mutation	0	0

3.3.3 Ergebnisse der ddPCR

In der Auswertung der ddPCR der 103 analysierten Proben zeigte sich eine mediane Anzahl akzeptierter Tröpfchen von 47.248 pro Patientinnenprobe (44.261; 50.676) (M = 46.962, SD = 4.851,93). Bei der Durchführung der ddPCR-Analyse jeder Probe als Triplikat ergab sich eine durchschnittliche Tröpfchenanzahl von 15.654 pro *well*.

Die mediane Anzahl Wildtyp-DNA enthaltender Tröpfchen lag bei 4.565 pro Probe (3.111; 8.144) (M = 8.330,02, SD = 9.638,01). Dies entspricht einem Anteil an Tröpfchen von 29,2 %. Beim Nachweis einer Mutation enthielten die Proben im Median 13 Mutations-positive Tröpfchen (6; 267) (M = 239,41, SD = 471,4). Die mediane MAF von E380Q-Mutationen lag bei 0,18 % (0,05 %; 4,26 %) (M = 1,70 %, SD = 2,14 %) mit entsprechend im Median 0,27 Kopien/µl (0,11; 1,91) (M = 2,36 Kopien/µl, SD = 5,04). Für Mutationen in Exon 8 (L536P, Y537C, Y537N, Y537S, D538G) betrug die mediane MAF 0,52 % (0,18 %; 3,58 %) (M = 3,87 %, SD = 7,40 %) mit entsprechend im Median 0,37 Kopien/µl (0,15; 5,9) (M = 5,94, SD = 11,65). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass

ggf. mehrere Mutationen in einer Probe vorliegen können, welche durch das Multiplex-ddPCR-Assay nicht weiter differenziert werden.

Im Anhang der Arbeit befindet sich eine Tabelle der ddPCR-Ergebnisse der 28 Plasmaproben mit positivem Mutationsstatus (Tabelle 19).

3.4 Korrelation des *ESR1*-Mutationsstatus mit klinisch-pathologischen Faktoren

Mittels Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test) wurde die Korrelation zwischen einer vorliegenden *ESR1*-Mutation und den unterschiedlichen klinisch-pathologischen Faktoren zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme untersucht. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz zwischen einem positiven *ESR1*-Mutationsstatus und den erhobenen klinisch-pathologischen Faktoren. Die Ergebnisse dieser Analyse werden in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Korrelation der klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen mit dem Nachweis von *ESR1*-Mutationen in der ersten Blutentnahme

Variable	Anzahl der Patientinnen N=78	Nachweis einer <i>ESR1</i> -Mutation		p-Wert
	N	N	(%)	
Menopausenstatus				0,511
Prämenopausal	15	4	27	
Postmenopausal	63	12	19	
Grading				0,578
G1	2	1	50	
G2	49	9	18	
G3	14	4	29	
Unbekannt	13	2	15	
Primär metastasiert				0,645
Ja	18	3	17	
Nein	60	13	22	
Metastasenlokalisation				0,662
Ossär	45 ¹⁾	10	22	
Viszeral	45	11	24	
ZNS	4	0	0	
Andere	26	8	31	0,113

Vorthherapie				
(Neo)adjuvante Chemotherapie	44	10	23	0,627
Endokrine Therapie	71	14	20	0,418
Aromatase-Inhibitoren	54	10	19	0,676
Adjuvant ²⁾	16	4	25	0,830
Fortgeschritten ²⁾	28	6	21	
Tamoxifen	39	6	15	0,328
Fulvestrant	14	3	21	0,860
GnRH-Analoga	8	2	25	0,693
Therapielinie				0,542
1. Linie	29 ³⁾	7	24	
≥ 2. Linie	49	9	18	
Endokrine Resistenz				0,276
Keine	22	2	9	
Primäre	13	2	15	
Sekundäre	35	9	26	
Unklar ⁴⁾	8			

¹ davon 14 (17,9 %) nur ossär metastasiert

² erste AI-Exposition

³ davon 5 (6,4 %) primär metastasiert und therapienaiv

⁴ keine endokrine Therapie erhalten oder kein Progress aufgetreten

Da diverse Studien eine Korrelation zwischen einer AI-basierten Vorthherapie, welche erst in der metastasierten Situation begonnen wurde, und einem positiven Mutationsstatus nachweisen konnten (54, 60, 63), wurde ein besonderes Augenmerk auf die endokrinen Vorthapien gelegt. Allerdings konnte auch hier kein statistisch signifikanter Effekt einer AI-Therapie mit unterschiedlichem Expositionsbeginn auf den Mutationsstatus detektiert werden ($p = 0,594$).

Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen der Dauer einer AI-Vorthherapie und dem *ESR1*-Mutationsstatus mit Hilfe eines Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Es zeigte sich hinsichtlich der Vorthepiedauer kein signifikanter Unterschied zwischen einem positiven und einem negativen Mutationsstatus ($z = -1,564$, $p = 0,118$). Ähnliches ergab sich bei zusätzlicher Aufteilung der Kohorte in zwei Gruppen je nach Zeitpunkt der ersten AI-Exposition in adjuvanten oder fortgeschrittenem Setting (AI-Exposition adjuvant: $z = -1,168$, $p = 0,243$; AI-Exposition fortgeschritten: $z = -0,880$, $p = 0,379$).

Auch unterteilt in 12, 18, 20 und 24 Monate Therapiedauer ergab sich mittels χ^2 -Test kein signifikanter Unterschied. Die mediane AI-Vorthherapie-Dauer betrug 22,5 Monate (IQR 10,25-59,75). Bei der Unterteilung des Kollektivs in zwei Gruppen mit jeweils

positivem oder negativem Mutationsstatus zeigte sich allerdings eine Tendenz. Die Gruppe mit positivem Mutationsstatus hat mit durchschnittlich 41,4 Monaten (SD = 21,8) eine längere Dauer AI-Vortherapie erhalten als die Gruppe mit negativem Mutationsstatus mit durchschnittlich 29,3 Monaten (SD = 24,6).

In einer multivariablen Analyse mittels binär logistischer Regressionsanalyse zeigte sich, dass kein signifikanter Einfluss einer Vortherapie auf den Mutationsstatus nachweisbar ist. Anhand des *Odds Ratios* ließ sich lediglich die Tendenz erkennen, dass eine AI-Vortherapie bis zur ersten Blutentnahme das Risiko für das Auftreten einer Mutation erhöhte (OR 1,48; 95%-KI: 0,29-7,61).

Mittels χ^2 -Test ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen einem positiven *ESR1*-Mutationsstatus und dem definitionsgemäß erhobenen endokrinen Resistenzstatus. Bei der Unterteilung des Kollektivs in zwei Gruppen mit (primäre oder sekundäre endokrine Resistenz) und ohne endokrine Resistenz konnte in der Gruppe mit definitionsgemäß vorliegender endokriner Resistenz in knapp 23 % (11 von 48 Fälle) eine Mutation nachgewiesen werden. In der Gruppe ohne endokrine Resistenz lag in nur 9,1 % (2 von 22 Fälle) eine Mutation vor.

3.5 Kaplan-Meier Überlebenskurven

3.5.1 Gesamtüberleben

Es wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven zum Gesamtüberleben von Patientinnen mit und ohne *ESR1*-Mutationen erstellt und mittels Log Rank-Test verglichen (Abbildung 19). In der untersuchten Gruppe zeigte sich kein signifikanter Effekt des Mutationsstatus auf das Überlebensrisiko der Patientinnen (Log Rank $\chi^2 = 0,533$, $p = 0,465$).

Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug ohne *ESR1*-Mutation 5,23 Jahre (95%-KI: 4,29-6,17) und mit nachgewiesener *ESR1*-Mutation 5,9 Jahre (95%-KI: 4,72-7,09).

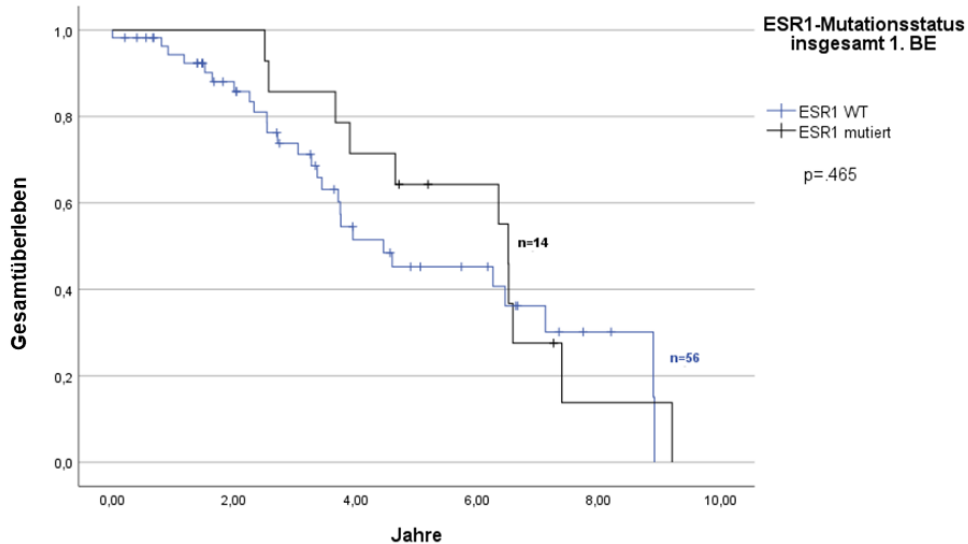


Abb. 19: Kaplan-Meier Überlebenskurve zum Gesamtüberleben

Abkürzungen: *ESR1* – *Estrogen receptor 1*; WT – Wildtyp; BE – Blutentnahme

3.5.2 Progressionsfreies Überleben

Des Weiteren wurden Kaplan-Meier Überlebenskurven zum progressionsfreien Überleben von Patientinnen mit und ohne *ESR1*-Mutationen erstellt und mittels Log Rank-Test verglichen (Abbildung 20). Auch hier ergab sich kein signifikanter Effekt des Mutationsstatus auf das progressionsfreie Überlebensrisiko (Log Rank $\chi^2 = 0,066$, $p = 0,797$).

Das durchschnittliche PFS betrug ohne *ESR1*-Mutation 30,45 Monate (95%-KI: 21,82-39,09) und mit nachgewiesener *ESR1*-Mutation 21,78 Monate (95%-KI: 13,41-30,14).

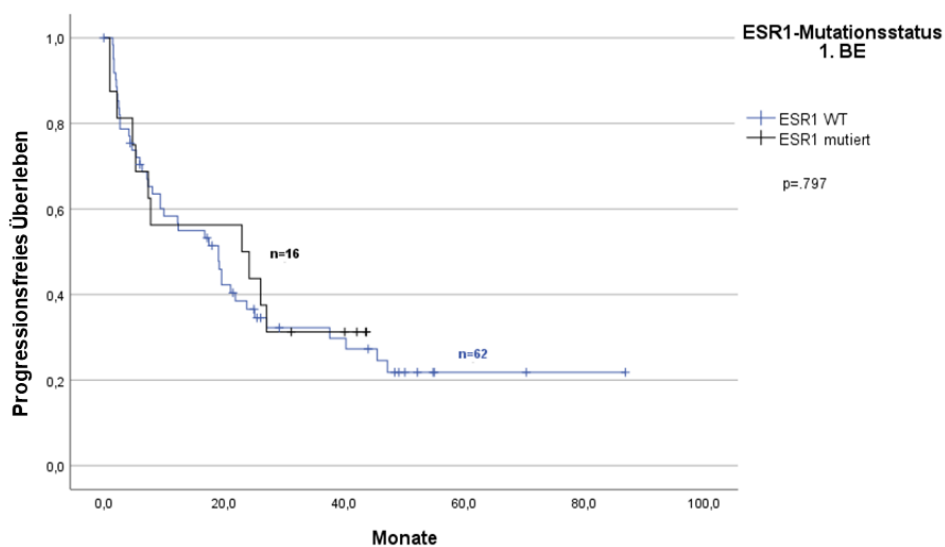


Abb. 20: Kaplan-Meier Überlebenskurve zum progressionsfreien Überleben

Abkürzungen: *ESR1* – *Estrogen receptor 1*; WT – Wildtyp; BE – Blutentnahme

Außerdem wurde das PFS nach der ersten Blutentnahme unterteilt nach AI-basierter und nicht AI-basierter folgender Therapie betrachtet. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Effekt des Mutationsstatus auf das PFS (Log Rank $\chi^2 = 0,267$, $p = 0,606$).

4 Diskussion

4.1 *ESR1*-Mutationsstatus

In den vergangenen Jahren kam es zu rapiden und wesentlichen Fortschritten in der Therapie des Mammakarzinoms. Ein Schwerpunkt zukünftiger Therapien liegt in der individuellen zielgerichteten Therapie. Die Detektion neuer prädiktiver Faktoren, welche als Therapieansatz genutzt werden können, ist somit von besonderer Relevanz. (11-13)

So gelten Mutationen im *ESR1*-Gen als interessanter prädiktiver Faktor beim fortgeschrittenen MBC. Verschiedene Forschungsgruppen haben aktivierende Mutationen im *ESR1*-Gen nachgewiesen, welche nur sehr selten im Primärtumor auftreten, allerdings häufig im fortgeschrittenen Stadium nach endokriner Behandlung mit Als nachgewiesen werden können (26, 58, 118, 119). Es wurde gezeigt, dass Mutationen im *ESR1*-Gen zu einer endokrinen Resistenz und im Verlauf zu einem schlechten Therapieansprechen führen. In der Folge kommt es zu einem insgesamt schlechteren Outcome für diese Patientinnen. (8, 54)

Die Phase-III-Studie EMERALD zeigte die Bedeutung von *ESR1*-Mutationen als Therapieansatz beim fortgeschrittenen BC. Mit Elacestrant steht nun ein neues Medikament zur Verfügung, welches insbesondere beim fortgeschrittenen MBC mit nachgewiesenen aktivierenden *ESR1*-Mutationen gute Wirksamkeit zeigt und das PFS signifikant verlängert. Elacestrant ist für das fortgeschrittenen MBC nach mindestens einer erfolgten endokrinen Therapielinie, einschließlich eines CDK 4/6-Inhibitor, zugelassen und wird als Monotherapie angewendet. (46, 47, 49)

4.2 Fragestellungen zur Methodik

4.2.1 *ESR1*-Mutationsnachweis in ctDNA

In der vorliegenden Arbeit wurde ctDNA als Material zur Untersuchung auf Mutationen im *ESR1*-Gen verwendet. Neben ctDNA gibt es jedoch auch noch weitere mögliche Untersuchungsmaterialien, welche in zahlreichen Forschungsarbeiten mittels verschiedener Verfahren auf *ESR1*-Mutationen untersucht wurden. Hierzu wurden beispielsweise CTCs sowie Tumor- und Metastasengewebe auf Mutationen untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Jedes der Untersuchungsmaterialien bietet spezifische Vor- und Nachteile. Ein entscheidender Vorteil der Analyse von ctDNA ist die LB-Kompatibilität, sodass die Materialgewinnung schnell, kostengünstig und minimalinvasiv durchgeführt werden kann. Dies ist für die klinische Anwendung von besonderer Relevanz und führt bei den Patientinnen zu hoher Akzeptanz. (77, 81-83, 120) Durch die gute Stabilität der ctDNA ist die Isolierung aus Blutplasma und die anschließende Konservierung einfach in der Handhabung. Allerdings kann der Anteil

der Tumor-DNA im Plasma sowie die ctDNA-Fragmentierung stark variieren, was die Analyse erschweren und limitieren kann. (60, 92, 121)

Vergleichbar mit ctDNA sind auch CTCs LB-kompatibel, sodass sich ähnliche Vorteile ergeben. CTCs werden stets von Tumorgewebe in den Blutfluss abgegeben (122) und gelten als prognostischer Faktor für PFS und OS in der adjuvanten, neoadjuvanten sowie metastasierten Situation (123-125). Sie werden als Vorläuferzellen von Metastasengewebe angesehen (122, 126). Als limitierende Faktoren für die Nutzung von CTCs für den klinischen Alltag gelten allerdings zum einen eine geringe CTC-Anzahl in den Blutplasmaproben sowie insgesamt wenige CTC-positive Patientinnen. Ein weiterer kritischer Punkt ist die schnell eintretende Apoptose und ein damit verbundener Qualitätsverlust der DNA. Während der Genomamplifikation (engl. *whole genome amplification*, WGA) kann es zum Allelverlust kommen, sodass Mutationen fälschlicherweise verloren gehen. Dies ist ein genereller limitierender Faktor von DNA-Analysen von Einzelzellen. Trotz dieser Herausforderungen bieten CTCs im Gegensatz zu ctDNA und Tumorgewebe die Möglichkeit für funktionelle Untersuchungen, einschließlich der Generierung von Zelllinien. (8, 95, 127)

Die Analyse von Tumorgewebe ermöglicht eine direkte Untersuchung des Tumors, erfordert jedoch eine invasive Probenentnahme, welche begrenzt möglich ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass eine einzelne Gewebeprobe möglicherweise nicht die gesamte Heterogenität des Tumors oder der Metastase repräsentiert. (62)

In der Tabelle 18 wird eine Auswahl an Arbeiten zum *ESR1*-Nachweis beim MBC aufgelistet. Die Arbeiten von Sundaresan et al. und Smilkou et al. vergleichen den *ESR1*-Mutationsnachweis in ctDNA und in genomischer DNA aus CTCs (63, 128). In beiden Studien zeigte sich in der CTC-DNA ein etwas höherer *ESR1*-Mutationsstatus. Sundaresan et al. zeigten jedoch eine hohe Konkordanz zwischen der ctDNA und CTCs von 95 % der Fälle (63). Ein möglicher Faktor für einen höheren Mutationsstatus in DNA aus CTCs könnte eine unterschiedliche Repräsentation der Tumorerheterogenität sein. Während CTCs möglicherweise eine spezifische Subpopulation von Tumorzellen mit höherer Mutationslast repräsentieren, könnte die untersuchte ctDNA eine Mischung aus DNA verschiedener Tumorherde und Zellen darstellen. Einzelne Mutationen in ctDNA könnten aufgrund der geringen Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze liegen.

In weiteren Arbeiten wurden die Ergebnisse der ctDNA-Analyse mit der Untersuchung von Tumor- und Metastasengewebe auf *ESR1*-Mutationen verglichen. Hierbei variierten die Ergebnisse je nach Patientinnenkollektiv und Zeitpunkt der Probengewinnung.

Schiavon et al. zeigten beispielsweise eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von 97 % bei 31 zeitgleich entnommenen ctDNA-Proben und Tumorbiopsien zum Zeitpunkt eines Fortschreitens beim MBC (60).

In der Arbeit von Spoerke et al. ergab sich lediglich eine Konkordanz von 47 % beim

Vergleich von *ESR1*-Mutationsnachweis in ctDNA und Metastasengewebe. Im Vergleich zum Primärtumor lag die Übereinstimmung nur bei 5 % (12/9). So berichteten auch Franken et al. einen *ESR1*-Mutationsstatus von 0 % (0/12) im untersuchten Primärtumorgewebe, während in 26 % der Fälle (12/46) ein positiver *ESR1*-Mutationsstatus in der genomischen DNA der CTCs vorgefunden wurde (8).

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass *ESR1*-Mutationen nur sehr selten im Primärtumor nachgewiesen werden und erst im Laufe einer fortschreitenden Erkrankung auftreten (10, 26, 58, 60).

Eine große US-amerikanische Studie von Iams et al. untersuchte die Vorteile der gleichzeitigen Durchführung von Gewebe- und ctDNA-Sequenzierung bei Patientinnen mit verschiedenen fortgeschrittenen Krebsentitäten (Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (*non-small cell lung cancer*, NSCLC), Mammakarzinom, Prostatakarzinom, Kolorektales Karzinom). Die Studie wurde auf der Grundlage durchgeführt, dass der bisherige Goldstandard zum Nachweis somatischer Genmutationen, welche mit zielgerichteten Therapien nach Leitlinie behandelt werden können, auf der Gewebeanalyse solider Tumoren mittels NGS basiert. Es zeigte sich, dass knapp ein Viertel der Mutationen (351 von 1448) lediglich durch Gewebeanalysen entdeckt wurden, allerdings in 9,3 % der Fälle Genmutationen ausschließlich durch ctDNA-Analysen identifiziert wurden. Interessanterweise unterschieden sich diese Ergebnisse deutlich je nach Tumorentität, dem jeweils betrachteten Gen und der ctDNA-Belastung. Die Gruppe mit MBC (n = 352) wurde auf Mutationen im *ESR1*-, *PIK3CA*-, *BRCA1/2*- und *ERBB2*-Gen sowie auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) untersucht. Die Übereinstimmungsrate der durch beide Testmethoden nachgewiesenen Genmutationen lag bei knapp 60 %. Ein Fünftel der Mutationen (106 von 507) wurde lediglich durch eine Gewebeanalyse detektiert, ebenfalls knapp ein Fünftel der Fälle (100 von 507) ausschließlich durch eine ctDNA-Analyse. Von Letzteren waren *ESR1*-Mutationen mit 55 % (55 von 100) die häufigsten relevanten Befunde. Außerdem wurde beobachtet, dass in der HR-positiven Gruppe, die eine hohe ctDNA-Belastung aufwies, *ESR1*-Mutationen häufiger ausschließlich durch ctDNA-Analyse nachgewiesen werden konnten. Für *ESR1* ergab die gleichzeitige Testung von ctDNA und Gewebe eine Zunahme von 24,7 % (23 von 93) der Patientinnen mit einer therapeutisch relevanten Genmutation im Vergleich zur alleinigen Gewebeanalyse. So legt die Studie nahe, dass eine Aufnahme gleichzeitiger Durchführung von Gewebe- und ctDNA-Sequenzierung in die routinemäßige Behandlung insbesondere von Patientinnen mit MBC sinnvoll ist. (120)

Verschiedene Forschungsgruppen haben in ihren Studien außerdem das prädiktive Potential vom LB-basierten Nachweis von *ESR1*-Mutationen in ctDNA und vom generellen Monitoring von ctDNA-Dynamik zur Therapieüberwachung gezeigt. Es wurde festgestellt, dass *ESR1*-Mutationen oder ein Anstieg der ctDNA-Mengen häufig schon bis zu im Median 6,7 Monaten vor dem Auftreten eines klinischen Progresses nachgewiesen werden können (55, 67, 130, 131). Der klinische Nutzen von seriellen

Testungen auf *ESR1*-Mutationen ist jedoch nicht abschließend erwiesen und muss in künftigen Studien untersucht werden.

Tabelle 18: Auswahl an Arbeiten zur Detektion von *ESR1*-Mutationen beim MBC modifiziert nach Herzog und Fuqua (62)

Studie	Kohorte	Untersuchungs-material	Nachweis-methode	<i>ESR1</i> -Mutations-status	Untersuch-te <i>ESR1</i> -Mutationen
Sundaresan et al. (63)	55 ER+ MBC	CTC, ctDNA	NGS (für CTC), Multiplex-ddPCR (für ctDNA)	22 % (12/55) (CTC), 17% (7/41) (ctDNA), 95% Konkordanz	Y537C/N/S, D538G, L536F/R/Q
Schiavon et al. (60)	171 MBC insgesamt, davon 44 mit erstmaliger AI-Therapie in met. Situation	ctDNA, Tumorgewe-be (31 von 171)	Multiplex-ddPCR	10,5 % (18/171) (ctDNA) (97 % Konkordanz mit Tumorgewebe) 36,4 % (16/44) bei AI erstmalig in met. Situation	L536R, Y537C/N/S, D538G
Jeannot et al. (67)	42 HR+/HER2-MBC mit Progress unter AI-Therapie	ctDNA	Multiplex-ddPCR, NGS	26 % (11/42)	E380Q, L536H, Y537C/N/S, D538G
Clatot et al. (130)	144 ER+ MBC mit Progress unter AI-Therapie	ctDNA	ddPCR	30,6 % (44/144)	Y537C/N/S, D538G
Franken et al. (8)	46 ER+/HER2-MBC	CTC, Tumor-/Metastasen-gewebe	NGS, Einzelzell-WGA	26 % (12/46) (CTC), 0 % (0/12) (Primärtumor)	G160C, K252R, N348S, E380Q, D426E, L507F, Y537C/N, D538G, D541Q

Chandarlapaty et al. (54)	541 ER+ MBC mit AI-Vorthherapie	ctDNA	Singleplex-ddPCR	28,8 % (156/541)	Y537S, D538G
Iams et al. (120)	352 MBC-Subgruppe	ctDNA, Tumorgewebe	NGS	26,4 % (93/352) insgesamt, 66,4 % Konkordanz mit Tumorgewebe	
Takeshita et al. (68)	69 ER+ MBC	ctDNA	Multiplex-ddPCR	28,9 % (20/69)	Y537S/N, D538G
Bidard et al. (46)	477 ER+/HER2-MBC mit Progress nach ET und CDK 4/6-Inhibitor	ctDNA	NGS (Guardant360 CDx-Test)	47,8 % (228/477)	Missense-Mutationen in Codon 310-547
Wang et al. (132)	29 ER+ MBC (43 PT, Metastasen: 12 ossär, 38 cerebral)	ctDNA, PT-Gewebe, Metastasengewebe (ossär, cerebral)	ddPCR	24,1 %, PT: 7 % (3/43), Metastasen: ossär 9,1 % (1/11), cerebral 12,5 % (3/24)	K303R, S463P, Y537C/N/S, D538G
Turner et al. (133)	383 HR+ MBC mit Progress unter AI-Therapie	ctDNA	Multiplex-ddPCR	30 % (151/383)	D538G, Y537C/N/S, L536R, S463P, E380Q
Turner et al. (71)	1051 MBC mit Progress	ctDNA	ddPCR, NGS	21 % (222/1051)	Y537S, D538G, E380Q
Spoerke et al. (129)	153 ER+ MBC mit Progress unter AI-Therapie	ctDNA, Tumorgewebe	ddPCR	37 % (57/153), Konkordanz mit Tumorgewebe: 47 % mit Metastasengewebe, 5 % mit PT-Gewebe	D538G, E380Q, Y537C/N/S, S463P, V534E, P535H, L536H/P/Q/R

Smilkou et al. (128)	42 ER+ MBC	ctDNA, CTC	ddPCR (ddPLEX <i>Mutation Detection Assay</i>)	26,2 % (11/42) (CTC), 14,3 % (6/42) (ctDNA)	E380Q, S463P, L536R, D538G, Y537C/N/S
----------------------	------------	------------	---	--	---------------------------------------

Abkürzungen: CTC – *Circulating tumor cell*; ctDNA – *Circulating tumor DNA*; NGS – *Next generation sequencing*; ddPCR – *Droplet digital PCR*; MBC – *Metastatic breast cancer*; WGA – *whole genome amplification*; AI – Aromataseinhibitor; PT – Primärtumor; met. – metastasiert

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass sich die Analyse von ctDNA bei BC als besonders vielversprechend erwiesen hat. Sie ermöglicht eine kontinuierliche Überwachung des Therapieansprechens über den gesamten Krankheitsverlauf und zeigt eine hohe Konkordanz mit zeitgleichen Tumorbiopsien (60). Im Vergleich zu Tumorgewebe bieten sowohl ctDNA als auch CTCs den Vorteil einer weniger invasiven Probengewinnung und können potenziell die Heterogenität des Tumors und seiner Metastasen besser abbilden. Die ctDNA-Analyse hat gegenüber CTCs den Vorteil einer höheren Stabilität und einfacheren Isolierung aus Plasma oder Serum. Abschließend lässt sich sagen, dass jede Methode ihre spezifischen Stärken und Schwächen hat. Die Wahl des optimalen Untersuchungsmaterials hängt von verschiedenen Faktoren ab, einschließlich der klinischen Fragestellung, der Verfügbarkeit der Proben und der technischen Möglichkeiten. In vielen Fällen kann eine Kombination verschiedener Analysetechniken, einschließlich ctDNA, CTCs und Tumorgewebe, ein umfassenderes Bild der Tumorbiologie und -evolution liefern und somit die Grundlage für eine optimale, personalisierte Behandlungsstrategie bilden. Mit der Zulassung des SERDs Elacestrant auf Grundlage des Nachweises von *ESR1*-Mutationen in ctDNA wurde die sinnvolle Verwendung von ctDNA als Untersuchungsmaterial auch für die vorliegende Arbeit noch einmal bestätigt (46).

4.2.2 ddPCR vs. NGS

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Multiplex-ddPCR-Assay als Verfahren zum Nachweis von *ESR1*-Mutationen entwickelt und angewendet. Eine weitere, häufig in diesem Zusammenhang angewendete Methode ist die NGS, welche eine Hochdurchsatzsequenzierungsanalyse darstellt. Wie in Tabelle 18 berichtet, wurden in vielen Forschungsarbeiten beide Methoden zur Validierung der Ergebnisse angewendet (62, 63, 67, 71). Vorteile der ddPCR sind neben einer schnellen Durchführbarkeit und vergleichbar niedrigen Kosten eine hohe Sensitivität und Spezifität bei der Detektion spezifischer Mutationen. Eine hohe Sensitivität ist insbesondere bei niedrigen Allelfrequenzen der untersuchten Mutationen relevant. Als Nachteile sind die begrenzte Anzahl an Zielmutationen und die Notwendigkeit der vorherigen Definition dieser Mutationen zu nennen. NGS hingegen ermöglicht die parallele Analyse mehrerer Gene und die Entdeckung neuer Mutationen, ist jedoch zeit- und kostenintensiver sowie weniger sensitiv. (121, 134)

So können beispielsweise neben den bekannten Hotspot-Mutationen im *ESR1*-Gen weitere Mutationen außerhalb dieser Hotspot-Regionen detektiert werden (8, 65, 118).

Die PADA-1-Studie (NCT03079011) untersuchte die klinische Anwendbarkeit von serieller Überwachung von *ESR1*-Mutationen in ctDNA von 1017 Patientinnen mit ER+/HER2- MBC durch einen ddPCR-Ansatz. Unter der Erstlinientherapie mittels AI und Palbociclib erfolgten regelmäßige Blutentnahmen zur Mutationsüberwachung, um rechtzeitig therapeutische Interventionen, wie den Wechsel auf eine Behandlung mit Fulvestrant und Palbociclib, einzuleiten. Ein Teil der ddPCR-positiven Proben (n = 200) wurde durch NGS überprüft, um die Genauigkeit und Sensitivität der ddPCR zu evaluieren. 84 % der ddPCR-positiven Proben wurden durch NGS bestätigt. 27 ddPCR-positive Proben mit MAF < 1 % wurden durch NGS nicht erkannt, was die höhere Sensitivität der ddPCR bei niedrigen Mutationsfrequenzen unterstreicht. (134)

Ähnliche Beobachtungen machte auch die Forschungsgruppe um Jeannot et al. Sie untersuchten ctDNA auf *ESR1*-Mutationen und verglichen die Ergebnisse einer Multiplex-ddPCR-Analyse und eines NGS-Ansatzes miteinander. Ca. 82 % der ddPCR-positiven Fälle konnten mittels NGS bestätigt werden. In verbleibenden zwei Fällen (18 %) lag eine niedrige MAF von unter 1 % vor, welche wahrscheinlich unter der Nachweisgrenze von NGS lag. (67)

Schiavon et al. zeigten ebenfalls eine Konkordanzrate von 95 % beim Vergleich der Nachweismethoden der *ESR1*-Mutationen mittels ddPCR und NGS. (60)

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die ddPCR für das gezielte Screening spezifischer Mutationen in klinischen Studien oder zur Therapieüberwachung aufgrund der Schnelligkeit und Sensitivität vorteilhaft ist, während NGS für umfassendere genomische Analysen besser geeignet ist (134). Während für den Einsatz von Elacestrant zum Nachweis von *ESR1*-Mutationen NGS verwendet wird (46), erwies sich die ddPCR in der PADA-1-Studie als zuverlässige Methode für das Echtzeit-Monitoring von *ESR1*-Mutationen und könnte in diesem Bereich in der klinischen Anwendung für Therapieentscheidungen genutzt werden. (134)

4.2.3 Optimierung des Multiplex-ddPCR-Assays

Wie in den Kapiteln 1.7 *Droplet Digital PCR* und 2.2.3.1 *Droplet Digital PCR-Assay* dargelegt, ermöglichen Multiplex-ddPCR-Assays die gleichzeitige Untersuchung von Proben auf mehrere vordefinierte Mutationen in einem einzigen Test, was Zeit und limitiertes Probenmaterial spart. Sie eignen sich besonders für Verlaufsuntersuchungen, um die Polyklonalität im Laufe der Erkrankung darzustellen. (60, 67, 110)

Bei der Entwicklung von Multiplex-Ansätzen ergeben sich jedoch durch die Kombination verschiedener Primer- und SONDENSSETS zahlreiche Herausforderungen. Dazu gehören z.B. die unterschiedliche Effizienz der einzelnen Assays, verschiedene

Hybridisierungstemperaturen der Primer, mögliche Kreuzreaktionen der Oligonukleotide und die ungenaue Trennung der Fluoreszenzsignale bei überlappenden Emissionsspektren, sodass möglichst optimale Bedingungen hergestellt werden sollten. (60, 110)

CtDNA

In den Bio-Rad-Richtlinien wird bei großer Bandbreite der Proben bezüglich DNA-Länge und -Menge, wie es bei ctDNA der Fall ist, eine DNA-Fragmentierung durch Restriktionsverdau vorgeschlagen, um die Präzision, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der ddPCR-Analyse zu erhöhen. Allerdings kann die zufällige DNA-Fragmentierung zu einer niedrigeren Sensitivität durch Zerstörung der Mutationssequenz und Zunahme des sogenannten Tröpfchenregens führen, sodass in dieser Arbeit von Restriktionsverdau abgesehen wurde. (115)

Bestimmung von mutationspositiven Proben

Bei *Rare Mutation Detection* (RMD)-Assays ist die genaue Differenzierung zwischen positiven und negativen Tröpfchen besonders wichtig. Falsch-positive Tröpfchen können unterschiedliche Ursachen haben und fallen insbesondere in der WT-Kontrollprobe sowie Leerprobe auf. Zum einen können sie durch Kontamination der Proben bzw. des Arbeitsplatzes auftreten. Des Weiteren können falsch-positive Signale durch uneinheitliche Tröpfchen aufgrund von schlechtem Handling, durch Taq-Fehler während der Amplifikation oder durch beschädigte Proben-DNA entstehen. Wie in den Richtlinien von Bio-Rad empfohlen, wurde in der vorliegenden Arbeit in jedem ddPCR-Durchgang eine WT-Kontrollprobe durchgeführt, um die Falsch-Positiv-Rate des Assays einzuschätzen. Selbst wenn bei der Durchführung der ddPCR-Analysen eine gute Laborpraxis eingehalten wird, ist es riskant, eine Probe als mutationspositiv aufgrund eines einzelnen positiven Tröpfchens zu werten. Fehlinterpretationen in der Auswertung sollen zum einen durch den Einbau von Kontrollproben verhindert werden sowie durch das Aufstellen der Bedingung, dass mindestens drei positive Tröpfchen in dem jeweils definierten Bereich im 2-D-Plot detektiert werden müssen, um eine Probe als mutationspositiv zu werten. Rowlands et al. beschreiben in ihrer Arbeit zur Optimierung von Singleplex- und Multiplex-ddPCR-Assays, dass es nicht möglich ist, perfekte Grenzwerte mit einer Sensitivität und einem positiven prädiktiven Wert (engl. *positive predictive value*, PPV) von 1 zu erreichen, jedoch sollten falsch-positive Ergebnisse verhindert werden. Eine statistische Analyse von 178 Proben mit niedriger Mutationskonzentration bestätigte einen optimalen Grenzwert von 3 positiven Tröpfchen mit einer Sensitivität von 0,994 und einem PPV von 1 (95%-KI: 0,973227-1). Ein Schwellenwert von 2 positiven Tröpfchen führte zu einem PPV von 0,957 (8 falsch-positive Ergebnisse bei 168 richtig-negativen Ergebnissen) und ein Schwellenwert von 4 positiven Tröpfchen führte zu einem PPV von 1 (0 falsch-positive Ergebnisse), jedoch mit einem Sensitivitätsverlust (4 falsch-negative Ergebnisse bei 172 richtig-positiven Ergebnissen). (110)

Ein weiterer Aspekt ist das Setzen von Schwellenwerten zur Zuordnung von

mutationspositiven oder -negativen Punktwolken. Während in Singleplex-Assays Schwellenwerte im 1-D-Plot zur Unterteilung in mutationspositiv oder -negativ klar definiert werden können, erfolgt die Zuordnung zu den Mutationswolken bei Multiplex-Assays manuell, was eine Fehlerquelle darstellen kann. Um Fehler zu vermeiden, wird hierzu allerdings in jedem ddPCR-Durchlauf eine Positivkontrolle durchgeführt, sodass die Punktwolken im 2-D-Plot entsprechend der Kontrolle zugeordnet werden können. Des Weiteren ist die initiale Optimierung der ddPCR-Bedingungen, zunächst mittels Singleplex-Durchläufen und im Anschluss durch Multiplex-Ansätze, zur optimalen Separierung der Punktwolken wichtig.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 *ESR1*-Mutationsstatus

In der vorliegenden Arbeit wurde ctDNA aus 103 Plasmaproben von 78 Patientinnen auf Mutationen im *ESR1*-Gen untersucht. Mit Hilfe einer Multiplex-ddPCR-Analyse wurden *ESR1*-Mutationen in zwei Hotspot-Regionen (Exon 8 (L536P, Y537C, Y537N, Y537S, D538G) und E380Q-Mutation in Exon 5) detektiert. Im untersuchten Patientinnenkollektiv zeigten sich bei 25 von 78 Patientinnen mindestens eine Mutation im *ESR1*-Gen. Die Mutationsrate liegt somit insgesamt bei 32,1 %. 91 % der Patientinnen (71 von 78 Patientinnen) waren endokrin vorththerapiert, 69 % (54 von 78 Patientinnen) hatten eine AI-Vorththerapie erhalten. Die *ESR1*-Mutationsrate in der Gruppe mit AI-basierter Vorththerapie liegt bei 28,2 % (22 von 78 Patientinnen).

Es gibt zahlreiche Studien zum Nachweis von *ESR1*-Mutationen beim fortgeschrittenen ER+/HER2- MBC. Eine Auswahl wird in Tabelle 18 im Abschnitt 4.2.1 aufgelistet. In den Arbeiten werden *ESR1*-Mutationen insbesondere nach AI-Vorththerapie mit einer Prävalenz von 20-50 % angegeben (52, 54, 60, 63, 67, 68, 118, 130, 134). Der detektierte *ESR1*-Mutationsstatus entspricht somit der in der Literatur berichteten Mutationsrate.

Die Variabilität des *ESR1*-Mutationsstatus in den verschiedenen Untersuchungen könnte durch unterschiedliche Detektionsmethoden und Patientenkohorten mit teilweise unterschiedlichen Vorththerapien und Dauer erklärt werden sowie durch die Untersuchung unterschiedlicher Mutationen im *ESR1*-Gen.

4.3.2 Polyklonalität

Mutationen im *ESR1*-Gen treten in der Regel in zwei Mutationshotspot-Regionen in der LBD in Exon 5 und Exon 8 auf (64-66). Am häufigsten werden in der Literatur die Mutationen Y537S und D538G beschrieben. Zusammen machen sie einen Anteil von über 70 % der *ESR1*-Mutationen aus (10, 134). Zu weiteren häufig auftretenden Mutationen zählen Y537N, Y537C, L536H, L536P, L536R, S463P und E380Q (66,

129, 132-138). Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte Multiplex-ddPCR-Assay deckt die Mutationen E380Q, L536P, Y537C, Y537N, Y537S und D538G ab.

Von den 103 untersuchten Proben wiesen 28 Proben (27,2 %) mindestens eine Mutation auf. Davon lag in zwei Proben die Mutation in E380Q in Exon 5 vor, in 22 Proben in Exon 8 (L536P, Y537C, Y537N, Y537S und/oder D538G) und in vier Fällen (14,3 %) in beiden Hotspot-Regionen. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass lediglich zwischen den beiden Hotspot-Regionen unterschieden wurde. Die Mutationen in Exon 8 wurden nicht näher differenziert, da der Schwerpunkt der Arbeit auf der generellen Detektion von *ESR1*-Mutationen lag. Bei weiterer Unterscheidung wäre von einer höheren Rate an Polyklonalität auszugehen.

Polyklonalität beim Nachweis von *ESR1*-Mutationen wird in der Literatur mit 20-70 % angegeben (60, 63, 129, 136). In einer Arbeit von Fribbens et al. wurde beispielsweise ctDNA aus Baseline-Plasmaproben aus der SoFEA-Studie und der PALOMA3-Studie auf *ESR1*-Mutationen untersucht. Die Studienkohorten setzten sich aus Patientinnen mit fortgeschrittenem MBC mit Progress unter AI-Therapie (in der PALOMA3-Studie) bzw. unter ET (in der SoFEA-Studie) zusammen. In der SoFEA-Studie zeigten sich 39,1 % der Fälle mutationspositiv; davon waren 49,1 % (27 von 55) polyklonal. In der PALOMA-3-Studie lag eine Mutationsrate von 25,3 % vor mit einer Polyklonalität von 28,6 % (26 von 91). (66)

In einer weiteren prospektiven Studie von Fribbens et al. wurden von 83 Patientinnen mit MBC, die eine Erstlinientherapie mit AI erhielten, alle drei Monate bis zum Krankheitsprogress serielle Plasmaproben gewonnen. Die extrahierte ctDNA wurde mittels ddPCR und *Enhanced Tagged-Amplicon Sequencing* (eTASeq) analysiert. Von den 39 Patientinnen mit Progress unter AI-Erstlinientherapie, wiesen 56,4 % *ESR1*-Mutationen zum Zeitpunkt des Progresses auf, die bei 9 Patientinnen polyklonal waren. Subklonale *ESR1*-Mutationen, welche in besonders niedriger Allelfrequenz auftreten, wurden sogar mit einer Rate von über 70 % angegeben. Außerdem wurde beobachtet, dass die *ESR1*-Mutationsvielfalt und Allelfrequenzen zum Zeitpunkt des Progresses zunehmend nachweisbar waren, was den Selektionsdruck unter AI-Therapie verdeutlicht. Neben zahlreichen *ESR1*-Mutationen, welche häufig allerdings nur auf subklonaler Ebene in niedriger Allelfrequenz auftraten, wurden zusätzliche weitere Treibermutationen (z.B. KRAS) nachgewiesen. Dies verdeutlicht noch einmal, dass *ESR1*-Mutationen nicht die einzige Ursache für Resistenzen darstellen und es weitere Untersuchungen zu Resistenzmechanismen bedarf. (55)

Wang et al. zeigten in einer longitudinalen Analyse von ctDNA ebenfalls einen Anstieg der Mutationsallelfrequenz sowie in wenigen Fällen auch einen Verlust einzelner Klone (132). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde in einem Fall (P-28, Abb. 18, Kapitel 3.3.2) ein Mutationsverlust nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für einen Mutationsverlust wäre das Verschwinden einer Mutation unter einer erfolgten Therapie aufgrund von Selektionsdruck (132). Als weitere Hypothese könnte der Verlust auch mit der Schwierigkeit erklärt werden, die komplexe Tumorheterogenität mit einer

einzigsten Probenanalyse aus wenig fragmentierter ctDNA zu erfassen. Auch wenn mit der LB bereits ein Fortschritt gegenüber Gewebebiopsie erreicht wurde, gibt es keine Garantie, die Tumorerheterogenität umfassend abzubilden.

Weiterführende Arbeiten untersuchten, ob sich unterschiedliche Konsequenzen aus den einzelnen *ESR1*-Mutationen ergeben. Es ist davon auszugehen, dass alle *ESR1*-LBD-Mutationen zu einer AI-Resistenz führen (65). Allerdings deuten Studien darauf hin, dass die Y537S-Mutation die höchste Transaktivierungsaktivität und die größte relative Resistenz gegenüber Tamoxifen, Fulvestrant und einigen der neuen SERDs und SERMs verursacht (10, 58, 65, 139-141). In der PALOMA-3- und SoFEA-Studie zeigte sich bei Vorliegen einer Y537S-Mutation für Patientinnen unter Fulvestrant ein Trend zu einem kürzeren PFS, allerdings ohne statistische Signifikanz, sowie eine Anreicherung von Y537S unter Fulvestrant und Fulvestrant plus Palbociclib, während das Auftreten der anderen *ESR1*-Mutationen konstant blieb (66). Auch in der BOLERO-2 Studie wies eine Y537S-Mutation im Vergleich zur D538G-Mutation auf ein schlechteres Outcome hin (54). Andererseits zeigt D538G ein höheres Metastasierungspotenzial, insbesondere mit Auftreten viszeraler Metastasierung wie Lebermetastasen (140, 142-144).

Abschließend ist festzuhalten, dass AI-resistente Tumoren eine komplexe genetische Heterogenität aufweisen, welche im Laufe einer Erkrankung und durch Selektionsdruck unter endokriner Therapie zunimmt. Durch Polyklonalität kann die Wirksamkeit gezielter Therapien, welche auf einen bestimmten Klon abzielen, eingeschränkt werden. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass sich aus den einzelnen *ESR1*-Mutationen unterschiedliche Konsequenzen ergeben können und legen nahe, dass in weiteren Studien mit großer Stichprobengröße spezifisch nach Mutationstypen stratifiziert werden sollte, um die Heterogenität der Tumoren zu verstehen und gezielte Therapien zu entwickeln. Zudem sollten neben *ESR1*-Mutationen auch noch weitere Resistenzmechanismen untersucht werden.

4.3.3 Diskussion der Korrelation des *ESR1*-Mutationsstatus mit klinisch-pathologischen Faktoren

In der untersuchten Kohorte zeigte sich keine statistische Signifikanz zwischen einem positiven *ESR1*-Mutationsstatus und den erhobenen klinisch-pathologischen Faktoren.

In zahlreichen Studien wurde ebenfalls keine Korrelation zwischen einem positiven *ESR1*-Mutationsstatus und dem Alter, dem Grading sowie verschiedener Metastasierungslokalisationen nachgewiesen. In Hinblick auf Vortherapien und Überleben zeigten sich jedoch durchaus Effekte, welche im Folgenden diskutiert werden (54, 60, 63, 66).

AI-basierte Vortherapie

Im Zusammenhang mit *ESR1*-Mutationen ist insbesondere die Betrachtung einer AI-basierten Vortherapie von Interesse. Von den 78 untersuchten Patientinnen hatten 54 (69 %) zuvor eine AI-Therapie erhalten, davon 16 in der Adjuvanz und 28 in der metastasierten Situation. Bei etwa 19 % der Fälle mit AI-Vortherapie (10 von 54 Patientinnen) wurde eine *ESR1*-Mutation nachgewiesen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen AI-Vortherapie und *ESR1*-Mutationsstatus konnte jedoch weder insgesamt noch differenziert nach Zeitpunkt der ersten AI-Exposition gezeigt werden. Am ehesten ist dies auf die geringe Größe des Patientinnenkollektivs in der vorliegenden Arbeit zurückzuführen.

In vielen Studien wurde allerdings eine Korrelation zwischen dem Vorliegen von *ESR1*-Mutationen und einer AI-basierten Vortherapie, welche erst in der metastasierten Situation begonnen wurde, nachgewiesen (54, 58, 60, 63). So berichteten beispielsweise Schiavon et al. von einer Mutationsrate von 5,8 % bei Patientinnen, die einen AI in der Adjuvanz erhalten hatten, unabhängig davon, ob anschließend eine weitere Therapie im metastasierten Stadium erfolgte, versus 36,4 % ($p = 0,0002$) bei Patientinnen, die eine AI-Behandlung erst in der metastasierten Situation erhalten hatten (60). Chandarlapaty et al. machten ähnliche Beobachtungen und berichteten von 11 % im Vergleich zu 33 % bei Patientinnen der BOLERO-2-Studie (54). Ebenso beschrieben Sundaresan et al., dass eine adjuvante AI-Therapie nicht mit dem Mutationsstatus korreliert, allerdings die Anzahl an eingesetzten AI-Therapien in der metastasierten Situation ($p = 0,02$) (63).

Diese Unterschiede in der Prävalenz untermauern die Theorie der genomischen Evolution beim ER+ MBC. Während der Metastasierung und unter dem Einfluss verschiedener Therapien können sich Subklone mit *ESR1*-Mutationen entwickeln und expandieren, was zu einem Anstieg an Mutationen und in der Folge zu Resistenzen führen kann (46, 55, 118, 145). Eine weitere Erklärung könnte die größere Tumormasse im metastasierten Setting sein, welche die Wahrscheinlichkeit der Selektion von Krebszellen mit erworbenen *ESR1*-Mutationen erhöht (63, 146). Außerdem weisen metastasierte Tumoren eine größere genetische Heterogenität sowie Instabilität auf, was die Entstehung von Mutationen begünstigt (145).

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem die Dauer einer AI-Vortherapie betrachtet. Es zeigte sich die Tendenz eines positiven Mutationsstatus bei längerer Dauer mit durchschnittlich 41,4 Monaten (SD = 21,8) gegenüber 29,3 Monaten (SD = 24,6) bei einem negativen Mutationsstatus, jedoch ohne statistische Signifikanz. In Abbildung 18, Kapitel 3.3.2, lässt sich dies anhand der Patientinnen 15, 16, 28 und 33 nachvollziehen. In der ersten Blutentnahme lassen sich trotz erfolgter AI-Vortherapie noch keine *ESR1*-Mutationen nachweisen, nach längerer Exposition kommt es zur Entstehung von Mutationen.

Sundaresan et al. untersuchten ebenfalls, ob zwischen der Dauer einer AI-Therapie und dem Mutationsstatus eine Korrelation besteht. Es zeigte sich kein Unterschied bei der Dauer einer adjuvanten AI-Therapie. Allerdings korrelierte die Dauer der AI-Therapie im metastasierten Setting mit dem *ESR1*-Mutationsstatus ($p = 0,0007$) (63). In der Arbeit von Schiavon et al. konnte dieser Unterschied hingegen auch nicht dargestellt werden (60).

Des Weiteren zeigten sich in der untersuchten Kohorte drei Fälle (P-23, P-30, P-60; siehe Abb. 17, Kapitel 3.3.2) mit positivem *ESR1*-Mutationsstatus, obwohl keine antiöstrogene Vortherapie vorlag. Diese Konstellation ist ungewöhnlich und erscheint eher unwahrscheinlich. Mögliche Erklärungen hierfür könnten nicht dokumentierte Vortherapien, sehr seltene therapienaive *ESR1*-Mutationen (119) oder ein falsch-positiver *ESR1*-Mutationsnachweis sein. Letzteres wäre durch eine niedrige MAF begünstigt. Betrachtet man die MAFs der drei Fälle ergibt sich jedoch kein eindeutiges Bild, da die MAFs von 0,1 % (P-23) und 0,85 % (P-60) bis 30,53 % (P-30) variieren. Von seltenen therapienaiven *ESR1*-Mutationen berichteten Takeshita et al. in ihrer Arbeit und nannten als mögliche Begründungen zum einen Tumorerheterogenität und zum anderen intrinsische Faktoren wie Tumorerprogression und eine natürliche Selektion hormonunabhängiger Klone (119). Interessanterweise handelt es sich bei zwei der Fälle (P-23, P-60) sogar um primär metastasierte Tumoren, welche eine vollständige Therapienaivität aufweisen.

Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

In der Kohorte der vorliegenden Arbeit wurden keine signifikanten Effekte des *ESR1*-Mutationsstatus auf das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben gezeigt. In Bezug auf das OS berichteten auch Franken et al. von keinem signifikanten Unterschied (8). Die meisten Studien zu dem Thema *ESR1*-Mutationen weisen jedoch ein insgesamt schlechteres Outcome in Bezug auf PFS und OS für Patientinnen mit positivem *ESR1*-Mutationsstatus nach.

So berichteten Chandarlapaty et al. in ihrer Studie von einem um fast 12 Monate verkürzten medianen OS bei Vorliegen einer *ESR1*-Mutation (*ESR1*-WT 32,1 Monate (95%-KI: 28,09-36,4) vs. *ESR1*-mutiert 20,73 Monate (95%-KI: 17,71-28,06); $p < 0,001$). Dabei zeigten sich unterschiedliche Effekte durch die beiden jeweils untersuchten Mutationen D538G und Y537S, wobei letztere das OS signifikant um ca. 5 Monate verkürzte. Bei Vorliegen beider Mutationen reduzierte sich das OS weiter auf 15,15 Monate (95%-KI: 10,87-27,43; $p < 0,001$). (54)

Clatot et al. beobachteten in einer retrospektiven Studie ebenfalls ein signifikant verkürztes medianes Gesamtüberleben (15,5 vs. 23,8 Monaten, $p = 0,0006$) sowie ein verkürztes PFS bei Patientinnen mit *ESR1*-Mutationen (5,9 vs. 7 Monate, $p = 0,002$). (130)

In der prospektiven Studie von Sundaresan et al. wurde zudem untersucht, welche klinischen Folgen sich aus einer Therapieumstellung bei positivem Mutationsnachweis

ergeben. Bei Patientinnen, deren anschließende Therapie auf einem AI basierte, verkürzte sich das PFS bei Vorliegen einer *ESR1*-Mutation in CTCs oder ctDNA deutlich im Vergleich zu Patientinnen mit *ESR1*-WT (median 56 Tage *ESR1*-mutiert vs. 335 Tage *ESR1*-WT; HR 24,52; 95%-KI: 1,96–18,29; $p = 0,0006$). Bei Einsatz eines nicht-AI-basierten Behandlungsregimes, wurde bezüglich des *ESR1*-Mutationsstatus kein signifikanter Unterschied im PFS beobachtet (*ESR1*-WT median 105 Tage vs. *ESR1*-mutiert median 127 Tage; HR 1,23; 95%-KI: 0,37–4,09; $p = 0,73$). (63)

Auch in der Studie von Schiavon et al. zeigte sich, dass Patientinnen mit im Plasma nachgewiesenen *ESR1*-Mutationen ein wesentlich kürzeres PFS bei einer anschließenden AI-basierten Therapie aufwiesen (HR 3,7; 95%-KI: 1,9-76,9; $p = 0,008$). (60)

In der PADA-1-Studie erfolgte interessanterweise schon zum Zeitpunkt eines molekularen *ESR1*-Mutationsnachweises ohne klinisch nachweisbarem Progress eine Therapieumstellung von AI plus Palbociclib zu Fulvestrant plus Palbociclib. Auch hier ergab sich ein signifikant verlängertes medianes PFS in der Fulvestrant plus Palbociclib-Gruppe von 11,9 Monaten im Vergleich zu 5,7 Monaten in der AI plus Palbociclib-Gruppe (HR 0,61; 95%-KI: 0,43–0,86; $p = 0,004$). (146)

4.4 Limitationen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Detektion von *ESR1*-Mutationen in ctDNA aus Blutplasma von Patientinnen mit MBC etabliert. Aufgrund von begrenzter Verfügbarkeit von Blutplasmaproben ist die untersuchte Fallzahl gering, sodass anhand der vorliegenden Ergebnisse keine statistisch signifikanten Aussagen über mögliche Zusammenhänge zwischen dem *ESR1*-Mutationsstatus und klinisch-pathologischen Patientinnendaten getroffen werden können. Des Weiteren wäre eine größere Anzahl an longitudinal entnommenen Proben interessant gewesen, um Aussagen über die Entwicklung einer Erkrankung und das Ansprechen auf eine Therapie treffen zu können.

Erschwerend kommen die teilweise lückenhafte Dokumentation der klinisch-pathologischen Daten durch verschiedene Therapie-betreuende Einrichtungen sowie eine mögliche mangelnde Therapieadhärenz seitens der Patientinnen hinzu.

Eine relevante methodische Limitation des angewendeten Multiplex-ddPCR-Assays ist die Tatsache, dass nicht der genaue Nukleotidaustausch in Exon 8 nachweisbar ist, sondern lediglich der Bereich der Mutations-Hotspots der Codons 536-538 abdeckt wird. Die Verschiebungen der Wolken lassen die unterschiedlichen Mutationen vermuten, jedoch keine eindeutige Aussage treffen. Hierzu wäre eine genauere Analyse mittels NGS oder Singleplex-ddPCR-Assays nötig. Aus klinischer Sicht sind zwar alle Mutationen im Bereich der Codons 536-538 mit einem AI-Resistenz assoziiert, jedoch gibt es Hinweise darauf, dass gewisse Mutationen unterschiedliche

Auswirkungen auf Therapieansprechen haben. Das Multiplex-Assay könnte also als erstes Screeningverfahren zum allgemeinen Nachweis von *ESR1*-Mutationen dienen.

4.5 Schlussbetrachtung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Multiplex-ddPCR-Assay zur Detektion von *ESR1*-Mutationen in ctDNA von Patientinnen mit ER+/HER2- MBC entwickelt.

Um Aussagen zu den statistisch signifikanten Effekten treffen zu können, sollte in Zukunft ein größeres Patientinnenkollektiv mit dem hier beschriebenen Verfahren untersucht werden. Außerdem wäre die Untersuchung von weiterem Untersuchungsmaterial wie Tumorgewebe oder CTCs des gleichen Kollektivs interessant.

Da das metastasierte Mammakarzinom die häufigste zum Tode führende Krebserkrankung der Frau ist, wird viel Forschung in diesem Bereich betrieben, um zielgerichtete Therapien zu entwickeln. Mit der LB steht eine minimalinvasive Methode zur Probengewinnung zur Verfügung, welche die Gewebebiopsie insbesondere in der fortgeschrittenen Krankheitssituation schrittweise ablöst.

CtDNA hat sich in den vergangenen Jahren als vielversprechendes Untersuchungsmaterial im Hinblick auf die Detektion von Biomarkern, das Monitoring von Therapieansprechen und minimaler Resterkrankung (MRD, *engl. minimal residual disease*) sowie bei der Früherkennung von Rezidiven erwiesen (121). Die Relevanz von ctDNA spiegelt sich auch in den Zulassungen der SERDs Elacestrant und Imlunestrant wider, welche auf Grundlage von *ESR1*-Mutationsnachweisen in der ctDNA eingesetzt werden.

In umfassenden Studien mit seriellen ctDNA-Probenentnahmen konnte zudem gezeigt werden, dass *ESR1*-Mutationen bereits Monate vor dem klinisch manifesten Progress detektierbar sind. Wiederholte ctDNA-Testungen und Therapiewechsel aufgrund eines Neuauftretens einer *ESR1*-Mutation ohne klinisch sichtbarem Progress werden jedoch noch nicht als Standardverfahren durchgeführt, sondern sind noch Gegenstand aktueller Forschung. (55, 131, 146)

Darüber hinaus wird in den Behandlungsplänen für das HR-positive MBC von der AI-Monotherapie als Erstbehandlung abgerückt und die Forschung konzentriert sich nun auf die Entwicklung von Kombinationstherapien und neuen ER-gerichteten Wirkstoffen. Mit der Zulassung des SERDs Elacestrant steht beispielsweise ein neues Medikament für den Einsatz im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium zur Verfügung.

Die Untersuchung von Kombinationstherapien ist von besonderer Relevanz vor dem Hintergrund, dass endokrine Resistenz, insbesondere bei fortgeschrittenen Erkrankungen, ein heterogenes Muster aufweist. Neben den häufigsten Missense-Mutationen im *ESR1*-Gen werden stetig weitere Resistenzmechanismen entdeckt, dessen Konsequenzen noch nicht umfassend geklärt sind und weiterer Forschung

bedürfen. Zudem sollten zukünftige Studien die Unterscheidung der verschiedenen *ESR1*-Mutationen berücksichtigen. Aus den unterschiedlichen molekularen Strukturen ergeben sich verschiedene funktionelle Konsequenzen, was die Frage nach den klinischen Auswirkungen der einzelnen Mutationen aufwirft. Des Weiteren sollte ein standardisierter Test zum Nachweis von *ESR1*-Mutationen etabliert werden. Bisherige Studien verwendeten unterschiedliche Assays, sodass die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

5.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms modifiziert nach Perou et al. (6)	2
Tabelle 2: Definition primäre und sekundäre Resistenz nach AGO-Leitlinie (4)	10
Tabelle 3: Verwendete Zelllinien und Nukleinsäuren	20
Tabelle 4: Verwendete Puffer	21
Tabelle 5: Verwendete Kits	21
Tabelle 6: Verwendetes allgemeines Labormaterial und Geräte	21
Tabelle 7: Verwendete Primer und Oligonukleotide	22
Tabelle 8: Verwendete Materialien und Geräte für die Droplet Digital PCR	22
Tabelle 9: Verwendete Software	23
Tabelle 10: Zusammensetzung des 20x Mastermixes für Mutations-Hotspots in Exon 5 und Exon 8 des <i>ESR1</i> -Gens	29
Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches	30
Tabelle 12: Thermal cycling Protokoll <i>ESR1</i> -Multiplex	31
Tabelle 13: Punktwolken und HEX/FAM Intensität	33
Tabelle 14: Schema der ddPCR-Analyse im chronologischen Ablauf	35
Tabelle 15: Klinisch-pathologische Daten der Patientinnen zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme	38
Tabelle 16: Übersicht der Proben mit und ohne Mutationsnachweis im Verlauf von der 1. bis 4. Blutentnahme	45
Tabelle 17: Korrelation der klinisch-pathologischen Daten der Patientinnen mit dem Nachweis von <i>ESR1</i> -Mutationen in der ersten Blutentnahme	47
Tabelle 18: Auswahl an Arbeiten zur Detektion von <i>ESR1</i> -Mutationen beim MBC modifiziert nach Herzog und Fuqua (62)	55
Tabelle 19: Plasmaproben mit positivem <i>ESR1</i> -Mutationsstatus	80

5.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau des <i>ESR1</i> -Gens (a) und des Östrogenrezeptors α (ER α) (b)	5
Abb. 2: Schematischer Überblick der Wirkungsweise von Östradiol, Aromatasehemmern und SERDs auf den Östrogenrezeptor α im Zusammenhang mit <i>ESR1</i> -Mutationen	11
Abb. 3: Das Prinzip der Liquid Biopsy mit dem Ziel der personalisierten Therapie	13
Abb. 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise einer TaqMan-Sonde	17
Abb. 5: An Vakuumpumpe angeschlossene Lochplatte mit Auffangbehälter	24

Abb. 6: Schematische Darstellung des Drop-off-Assays zur Detektion des Mutations-Hotspots in Exon 8	26
Abb. 7: Punktwolkenverteilung des Drop-off-Assays zur Detektion des Mutations-Hotspots in Exon 8	26
Abb. 8: Schematische Darstellung des Assays zur Detektion der E380Q-Mutation in Exon 5.....	27
Abb. 9: Punktwolkenverteilung des E380Q-Assays in Exon 5	27
Abb. 10: Drei Kontrollproben des Multiplex-Assays	28
Abb. 11: Ablauf der Droplet Digital PCR	31
Abb. 12: Punktwolken-Diagramm des <i>ESR1</i> -Multiplex-Assays.....	33
Abb. 13: Altersverteilung des Patientinnenkollektivs.....	37
Abb. 14: Serielle Verdünnung zur Bestimmung der a) LoD Exon 5 und b) LoD Exon 8	40
Abb. 15: <i>ESR1</i> -Mutationsstatus der 103 untersuchten Plasmaproben	41
Abb. 16: Typische Punktwolkenverteilungen bei Vorliegen einer oder mehrerer Mutationen	42
Abb. 17: Krankheitsverlauf der 16 Patientinnen mit Mutationsnachweis in der ersten Blutentnahme	44
Abb. 18: Krankheitsverlauf der Fälle mit Mutationsnachweis in der zweiten oder dritten Blutentnahme	45
Abb. 19: Kaplan-Meier Überlebenskurve zum Gesamtüberleben	50
Abb. 20: Kaplan-Meier Überlebenskurve zum progressionsfreien Überleben	50
Abb. 21: Temperaturgradient zur Optimierung des Multiplex-ddPCR-Assays	79

5.3 Literaturverzeichnis

1. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2019/2020. 2023.
2. Tosello G, Torloni MR, Mota BS, Neeman T, Riera R. Breast surgery for metastatic breast cancer. The Cochrane database of systematic reviews. 2018;3(3):CD011276.
3. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, André F, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology. 2020;31(12):1623-49.
4. Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. KM. Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome - Empfehlungen der AGO Kommission Mamma. 2025.
5. Meindl A, Ditsch N, Kast K, Rhiem K, Schmutzler RK. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. Deutsches Arzteblatt international. 2011;108(19):323-30.
6. Perou CM. Tumor Marker Utility Grading System: a Framework to Evaluate Clinical Utility of Tumor Markers. 2000.
7. DeSantis CE, Ma J, Gaudet MM, Newman LA, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Breast cancer statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(6):438-51.
8. Franken A, Honisch E, Reinhardt F, Meier-Stiegen F, Yang L, Jaschinski S, et al. Detection of ESR1 Mutations in Single Circulating Tumor Cells on Estrogen Deprivation Therapy but Not in Primary Tumors from Metastatic Luminal Breast Cancer Patients. The Journal of molecular diagnostics : JMD. 2020;22(1):111-21.
9. Clarke R, Tyson JJ, Dixon JM. Endocrine resistance in breast cancer--An overview and update. Molecular and cellular endocrinology. 2015;418 Pt 3(0 3):220-34.
10. Jeselsohn R, Buchwalter G, De Angelis C, Brown M, Schiff R. ESR1 mutations-a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2015;12(10):573-83.
11. Banys-Paluchowski M, Krawczyk N, Fehm T. Liquid Biopsy in Breast Cancer. Geburtshilfe und Frauenheilkunde. 2020;80(11):1093-104.
12. Kraus D. Liquid Biopsy - was kann sie beim Mammakarzinom leisten? InFo Hämatologie + Onkologie. 2021;24(7):56.
13. S3-Leitlinie. S3-Leitlinie Mammakarzinom Version 4.4. 2021.
14. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. Nature reviews Cancer. 2005;5(8):591-602.
15. Weide. Metastatic breast cancer: prolongation of survival in routine care is restricted to hormone-receptorand Her2-positive tumors. 2014.
16. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2010;28(20):3271-7.
17. Curtit E, Nerich V, Mansi L, Chaigneau L, Cals L, Villanueva C, et al. Discordances in estrogen receptor status, progesterone receptor status, and HER2 status between primary breast cancer and metastasis. The oncologist. 2013;18(6):667-74.
18. Pusztai L, Viale G, Kelly CM, Hudis CA. Estrogen and HER-2 receptor discordance between primary breast cancer and metastasis. The oncologist. 2010;15(11):1164-8.
19. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. Cancer discovery. 2021;11(4):858-73.
20. Brückl WM, Al-Batran SE, Ficker JH, Wirtz RM, Atmaca A. Östrogenrezeptoren und ihre Bedeutung für die Prognose und Therapie des Lungenkarzinoms - neue Erkenntnisse zu einem bisher unterschätzten Mechanismus. Pneumologie (Stuttgart, Germany). 2015;69(6):350-60.
21. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 2015;29(4):557-68.

22. Kuiper. Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors alpha and beta. 1997.
23. Heinrich PC. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie [Elektronische Ressource, Lehrbuch]. 9., vollständig überarbeitete Auflage ed. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
24. Campbell MJ, Bevan CL. Nuclear Receptors in Human Health and Disease. Cham: Springer International Publishing; 2022. 338 p.
25. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocrine reviews*. 2008;29(2):217-33.
26. Robinson DR, Wu Y-M, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nature genetics*. 2013;45(12):1446-51.
27. Cheung KL. Endocrine therapy for breast cancer: an overview. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2007;16(4):327-43.
28. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9793):771-84.
29. Ebcog. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9472):1687-717.
30. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(21):2255-69.
31. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(3):205-13.
32. Qiu L, Fu F, Huang M, Lin Y, Chen Y, Chen M, et al. Evaluating the Survival Benefit Following Ovarian Function Suppression in Premenopausal Patients with Hormone Receptor Positive Early Breast Cancer. *Scientific reports*. 2016;6:26627.
33. Lambertini M, Viglietti G, Azambuja E. Impact of ovarian function suppression in premenopausal women with estrogen receptor-positive early breast cancer. *Current opinion in oncology*. 2019;31(1):43-51.
34. Sukumar JS, Quiroga D, Kassem M, Grimm M, Shinde NV, Appiah L, et al. Patient preferences and adherence to adjuvant GnRH analogs among premenopausal women with hormone receptor positive breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2021;190(2):183-8.
35. Banys-Paluchowski M, Krawczyk N, Fehm T, Müller V. Aromatasehemmer: Eine kritische Bestandsaufnahme. *Deutsches Aerzteblatt Online*. 2016.
36. Lu Y-S, Mahidin EIBM, Azim H, Eralp Y, Yap YS, Im S-A, et al. Final Results of RIGHT Choice: Ribociclib Plus Endocrine Therapy Versus Combination Chemotherapy in Premenopausal Women With Clinically Aggressive Hormone Receptor–Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Advanced Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2024;42(23):2812-21.
37. Rugo HS, Rumble RB, Macrae E, Barton DL, Connolly HK, Dickler MN, et al. Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(25):3069-103.
38. Wilcken N, Hornbuckle J, Ghersi D. Chemotherapy alone versus endocrine therapy alone for metastatic breast cancer. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2003;2003(2):CD002747.

39. Schettini F, Santo I, Rea CG, Placido P, Formisano L, Giuliano M, et al. CDK 4/6 Inhibitors as Single Agent in Advanced Solid Tumors. *Frontiers in Oncology*. 2018;8.
40. Jerzak KJ, Bouganim N, Brezden-Masley C, Edwards S, Gelmon K, Henning J-W, et al. HR+/HER2– Advanced Breast Cancer Treatment in the First-Line Setting: Expert Review. 2023.
41. Piccart M, Hortobagyi GN, Campone M, Pritchard KI, Lebrun F, Ito Y, et al. Everolimus plus exemestane for hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: overall survival results from BOLERO-2†. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2014;25(12):2357-62.
42. Turner NC, Im SA, Saura C, Juric D, Loibl S, Kalinsky K, et al. Inavolisib-Based Therapy in PIK3CA-Mutated Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2024;391(17):1584-96.
43. Oliveira M, Rugo HS, Howell SJ, Dalenc F, Cortes J, Gomez HL, et al. Capivasertib and fulvestrant for patients with hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer (CAPItello-291): patient-reported outcomes from a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol*. 2024;25(9):1231-44.
44. Turner NC, Oliveira M, Howell SJ, Dalenc F, Cortes J, Gomez Moreno HL, et al. Capivasertib in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2023;388(22):2058-70.
45. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, et al. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2021;32(2):208-17.
46. Bidard F-C, Kaklamani VG, Neven P, Streich G, Montero AJ, Forget F, et al. Elacestrant (oral selective estrogen receptor degrader) Versus Standard Endocrine Therapy for Estrogen Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From the Randomized Phase III EMERALD Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2022;40(28):3246-56.
47. Sanchez KG, Nangia JR, Schiff R, Rimawi MF. Elacestrant and the Promise of Oral SERDs. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2022;40(28):3227-9.
48. Kaklamani VG, Bidard FC, Neven P, Montero AJ, Mouret-Reynier M-A, Sohn J, et al. Oral elacestrant vs standard-of-care in estrogen receptor-positive, HER2-negative (ER+/HER2-) advanced or metastatic breast cancer (mBC) without detectable ESR1 mutation (EMERALD): Subgroup analysis by prior duration of CDK4/6i plus endocrine therapy (ET). *ASCO Annual Meeting 2023*2023.
49. European Medicines Agency. Orserdu - Elacestrant. Abgerufen am 22.10.2023. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/orserdu2023>.
50. U.S. Food and Drug Administration. FDA approves imlunestrant for ER-positive, HER2-negative, ESR1-mutated advanced or metastatic breast cancer. Abgerufen am 19.10.2025. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-implunestrant-er-positive-her2-negative-esr1-mutated-advanced-or-metastatic-breast2025>.
51. Alva-Bianchi M, Sanchez-Bayona R, Ciruelos E. Oral SERDs: Transforming the treatment of advanced breast cancer-Insights from EMBER-3. *Med*. 2025;6(2):100602.
52. Li S, Shen D, Shao J, Crowder R, Liu W, Prat A, et al. Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell reports*. 2013;4(6):1116-30.
53. Hartmaier RJ, Trabucco SE, Priedigkeit N, Chung JH, Parachoniak CA, Vanden Borre P, et al. Recurrent hyperactive ESR1 fusion proteins in endocrine therapy-resistant breast cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(4):872-80.

54. Chandarlapaty S, Chen D, He W, Sung P, Samoila A, You D, et al. Prevalence of ESR1 Mutations in Cell-Free DNA and Outcomes in Metastatic Breast Cancer: A Secondary Analysis of the BOLERO-2 Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2016;2(10):1310-5.
55. Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, et al. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol*. 2018;29(1):145-53.
56. Musgrove EA, Sutherland RL. Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(9):631-43.
57. Saatci O, Huynh-Dam K-T, Sahin O. Endocrine resistance in breast cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2021;99(12):1691-710.
58. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nature genetics*. 2013;45(12):1439-45.
59. Zhang QX, Borg A, Wolf DM, Oesterreich S, Fuqua SA. An estrogen receptor mutant with strong hormone-independent activity from a metastatic breast cancer. *Cancer Res*. 1997;57(7):1244-9.
60. Schiavon G. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. 2015.
61. Reinert T, Saad ED, Barrios CH, Bines J. Clinical Implications of ESR1 Mutations in Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Frontiers in oncology*. 2017;7:26.
62. Herzog SK, Fuqua SAW. ESR1 mutations and therapeutic resistance in metastatic breast cancer: progress and remaining challenges. *Br J Cancer*. 2022;126(2):174-86.
63. Sundaresan TK, Dubash TD, Zheng Z, Bardia A, Wittner BS, Aceto N, et al. Evaluation of endocrine resistance using ESR1 genotyping of circulating tumor cells and plasma DNA. *Breast Cancer Res Treat*. 2021;188(1):43-52.
64. Chung JH, Pavlick D, Hartmaier R, Schrock AB, Young L, Forcier B, et al. Hybrid capture-based genomic profiling of circulating tumor DNA from patients with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(11):2866-73.
65. Toy W, Weir H, Razavi P, Lawson M, Goeppert AU, Mazzola AM, et al. Activating ESR1 Mutations Differentially Affect the Efficacy of ER Antagonists. *Cancer discovery*. 2017;7(3):277-87.
66. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, et al. Plasma ESR1 Mutations and the Treatment of Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(25):2961-8.
67. Jeannot E, Darrigues L, Michel M, Stern M-H, Pierga J-Y, Rampanou A, et al. A single droplet digital PCR for ESR1 activating mutations detection in plasma. *Oncogene*. 2020;39(14):2987-95.
68. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, et al. Analysis of ESR1 and PIK3CA mutations in plasma cell-free DNA from ER-positive breast cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(32):52142-55.
69. O'Leary B, Cutts RJ, Liu Y, Hrebien S, Huang X, Fenwick K, et al. The Genetic Landscape and Clonal Evolution of Breast Cancer Resistance to Palbociclib plus Fulvestrant in the PALOMA-3 Trial. *Cancer discovery*. 2018;8(11):1390-403.
70. Müller V, Welslau M, Lüftner D, Schütz F, Stickeler E, Fasching PA, et al. Update Mammakarzinom 2022 Teil 2 – Brustkrebs in fortgeschrittenen Krankheitsstadien. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie*. 2022;19(04):353-64.
71. Turner NC, Kingston B, Kilburn LS, Kernaghan S, Wardley AM, Macpherson IR, et al. Circulating tumour DNA analysis to direct therapy in advanced breast cancer (plasmaMATCH): a multicentre, multicohort, phase 2a, platform trial. *The Lancet Oncology*. 2020;21(10):1296-308.

72. Amir E, Clemons M, Purdie CA, Miller N, Quinlan P, Geddie W, et al. Tissue confirmation of disease recurrence in breast cancer patients: pooled analysis of multi-centre, multi-disciplinary prospective studies. *Cancer treatment reviews*. 2012;38(6):708-14.
73. Jones RH, Casbard A, Carucci M, Cox C, Butler R, Alchami F, et al. Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2020;21(3):345-57.
74. Kataoka Y, Mukohara T, Shimada H, Saijo N, Hirai M, Minami H. Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2010;21(2):255-62.
75. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo W-L, Davies M, et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer research*. 2008;68(15):6084-91.
76. Wheler JJ, Moulder SL, Naing A, Janku F, Piha-Paul SA, Falchook GS, et al. Anastrozole and everolimus in advanced gynecologic and breast malignancies: activity and molecular alterations in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Oncotarget*. 2014;5(10):3029-38.
77. Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC medicine*. 2017;15(1):75.
78. Roeper CMT, Hoehne I, Schlepper N, Koch C, Pantel K, Smit DJ. „Liquid biopsy“ – schon reif für Therapieentscheidungen? *best practice onkologie*. 2023;18(5):194-202.
79. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in Molecular Medicine*. 2010;16(9):398-406.
80. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nature reviews Genetics*. 2019;20(2):71-88.
81. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature reviews Cancer*. 2011;11(6):426-37.
82. Schwarzenbach H, Pantel K, Kemper B, Beeger C, Otterbach F, Kimmig R, et al. Comparative evaluation of cell-free tumor DNA in blood and disseminated tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2009;11(5):R71.
83. Reinhardt F, Franken A, Fehm T, Neubauer H. Navigation through inter- and intratumoral heterogeneity of endocrine resistance mechanisms in breast cancer: A potential role for Liquid Biopsies? *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(11):1010428317731511.
84. Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical prospects of liquid biopsies. *Nature Biomedical Engineering*. 2017;1(4).
85. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine*. 2019;380(20):1929-40.
86. Robson M, Im S-A, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *The New England journal of medicine*. 2017;377(6):523-33.
87. Juric D, Janku F, Rodón J, Burris HA, Mayer IA, Schuler M, et al. Alpelisib Plus Fulvestrant in PIK3CA-Altered and PIK3CA-Wild-Type Estrogen Receptor-Positive Advanced Breast Cancer: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2019;5(2):e184475.
88. European Medicines Agency. Itovebi - Inavolisib. Abgerufen am 04.09.2025. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/itovebi2025>.
89. European Medicines Agency. Truqap - Capivasertib. Abgerufen am 04.09.2025. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/truqap2025>.

90. Chin R-I, Chen K, Usmani A, Chua C, Harris PK, Binkley MS, et al. Detection of Solid Tumor Molecular Residual Disease (MRD) Using Circulating Tumor DNA (ctDNA). *Molecular diagnosis & therapy*. 2019;23(3):311-31.
91. Bianchi DW, Chudova D, Sehnert AJ, Bhatt S, Murray K, Prosen TL, et al. Noninvasive Prenatal Testing and Incidental Detection of Occult Maternal Malignancies. *JAMA*. 2015;314(2):162-9.
92. Jung A, Kirchner T. Liquid Biopsy in Tumor Genetic Diagnosis. *Deutsches Arzteblatt international*. 2018;115(10):169-74.
93. Alimirzaie S, Bagherzadeh M, Akbari MR. Liquid biopsy in breast cancer: A comprehensive review. *Clinical genetics*. 2019;95(6):643-60.
94. Oxnard GR, Thress KS, Alden RS, Lawrance R, Paweletz CP, Cantarini M, et al. Association Between Plasma Genotyping and Outcomes of Treatment With Osimertinib (AZD9291) in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(28):3375-82.
95. Polasik A, Tzschaschel M, Schochter F, Gregorio A, Friedl TWP, Rack B, et al. Circulating Tumour Cells, Circulating Tumour DNA and Circulating MicroRNA in Metastatic Breast Carcinoma - What is the Role of Liquid Biopsy in Breast Cancer? *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2017;77(12):1291-8.
96. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature methods*. 2006;3(2):95-7.
97. Didelot A, Kotsopoulos SK, Lupo A, Pekin D, Li X, Atochin I, et al. Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clinical chemistry*. 2013;59(5):815-23.
98. Sarwat M, Yamdagni MM. DNA barcoding, microarrays and next generation sequencing: recent tools for genetic diversity estimation and authentication of medicinal plants. *Critical reviews in biotechnology*. 2016;36(2):191-203.
99. Speicher MR, Pantel K. Tumor signatures in the blood. *Nature biotechnology*. 2014;32(5):441-3.
100. Agostini M, Enzo MV, Bedin C, Belardinelli V, Goldin E, Del Bianco P, et al. Circulating cell-free DNA: a promising marker of regional lymphonode metastasis in breast cancer patients. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*. 2012;11(2-3):89-98.
101. Shaw JA, Guttery DS, Hills A, Fernandez-Garcia D, Page K, Rosales BM, et al. Mutation Analysis of Cell-Free DNA and Single Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with High Circulating Tumor Cell Counts. *Clin Cancer Res*. 2017;23(1):88-96.
102. Andre F, Su F, Solovieff N, Arteaga CL, Hortobagyi GN, Chia SKL, et al. Pooled ctDNA analysis of the MONALEESA (ML) phase III advanced breast cancer (ABC) trials. *American Society of Clinical Oncology*; 2020.
103. O'Leary B, Hrebien S, Morden JP, Beaney M, Fribbens C, Huang X, et al. Early circulating tumor DNA dynamics and clonal selection with palbociclib and fulvestrant for breast cancer. *Nature communications*. 2018;9(1):896.
104. Magbanua MJM, Swigart LB, Wu HT, Hirst GL, Yau C, Wolf DM, et al. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2021;32(2):229-39.
105. Garcia-Murillas I, Chopra N, Comino-Méndez I, Beaney M, Tovey H, Cutts RJ, et al. Assessment of Molecular Relapse Detection in Early-Stage Breast Cancer. *JAMA oncology*. 2019;5(10):1473-8.
106. Lüftner D, Schütz F, Stickeler E, Fasching PA, Janni W, Kolberg-Liedtke C, et al. Update Breast Cancer 2021 Part 5 - Advanced Breast Cancer. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2022;82(2):215-25.
107. Gürtler P, Gerdes L. Digitale Polymerasekettenreaktion (dPCR). *BIOspektrum*. 2014;20(6):632-5.

108. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*. 2011;83(22):8604-10.
109. Milbury CA, Zhong Q, Lin J, Williams M, Olson J, Link DR, et al. Determining lower limits of detection of digital PCR assays for cancer-related gene mutations. *Biomolecular detection and quantification*. 2014;1(1):8-22.
110. Rowlands V, Rutkowski AJ, Meuser E, Carr TH, Harrington EA, Barrett JC. Optimisation of robust singleplex and multiplex droplet digital PCR assays for high confidence mutation detection in circulating tumour DNA. *Scientific reports*. 2019;9(1):12620.
111. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:9236–41.
112. Butler JM. DNA Quantitation. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*: Elsevier; 2012. p. 49-67.
113. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry*. 2013;59(12):1722-31.
114. Fasching PA, Brucker SY, Fehm TN, Overkamp F, Janni W, Wallwiener M, et al. Biomarkers in Patients with Metastatic Breast Cancer and the PRAEGNANT Study Network. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*. 2015;75(1):41-50.
115. Bio-Rad Laboratories, Rare Mutation Detection, Best Practices Guidelines. Abgerufen am 13.04.2023. <https://www.bio-rad.com>.
116. Bio-Rad Laboratories. Abgerufen am 02.09.2024. <https://www.bio-rad.com>.
117. Armbruster DA, Pry T. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *Clinical Biochemist*. 2008;29.
118. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(7):1757-67.
119. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, et al. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of ESR1 mutations in 325 breast cancer specimens. *Transl Res*. 2015;166(6):540-53 e2.
120. Iams WT, Mackay M, Ben-Shachar R, Drews J, Manghnani K, Hockenberry AJ, et al. Concurrent Tissue and Circulating Tumor DNA Molecular Profiling to Detect Guideline-Based Targeted Mutations in a Multicancer Cohort. *JAMA Netw Open*. 2024;7(1):e2351700.
121. Ulz P, Geigl JB, Speicher MR, Heitzer E. Neueste technologische Entwicklungen für die Analyse von zirkulierender Tumor-DNA. *Medizinische Genetik*. 2016;28(2):234-44.
122. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *Journal of Cell Biology*. 2011;192(3):373-82.
123. Bidard F-C, Michiels S, Riethdorf S, Mueller V, Esserman LJ, Lucci A, et al. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer Patients Treated by Neoadjuvant Chemotherapy: A Meta-analysis. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2018;110(6):560-7.
124. Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, Nole F, Gisbert-Criado R, Mavroudis D, et al. Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2014;15(4):406-14.
125. Janni WJ, Rack B, Terstappen LWMM, Pierga J-Y, Taran F-A, Fehm T, et al. Pooled Analysis of the Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(10):2583-93.
126. Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, Rao C, et al. Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004;10.

127. Polzer B, Medoro G, Pasch S, Fontana F, Zorzino L, Pestka A, et al. Molecular profiling of single circulating tumor cells with diagnostic intention. *EMBO Mol Med.* 2014;6(11):1371-86.
128. Smilkou S, Ntzifa A, Tserpeli V, Balgkouranidou I, Papatheodoridi A, Razis E, et al. Detection rate for ESR1 mutations is higher in circulating-tumor-cell-derived genomic DNA than in paired plasma cell-free DNA samples as revealed by ddPCR. *Mol Oncol.* 2025.
129. Spoerke JM, Gendreau S, Walter K, Qiu J, Wilson TR, Savage H, et al. Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nat Commun.* 2016;7:11579.
130. Clatot F, Perdrix A, Augusto L, Beaussire L, Delacour J, Calbrix C, et al. Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. *Oncotarget.* 2016.
131. Clatot F, Perdrix A, Beaussire L, Lequesne J, Levy C, Emile G, et al. Risk of early progression according to circulating ESR1 mutation, CA-15.3 and cfDNA increases under first-line anti-aromatase treatment in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):56.
132. Wang P, Bahreini A, Gyanchandani R, Lucas PC, Hartmaier RJ, Watters RJ, et al. Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2016;22(5):1130-7.
133. Turner NC, Swift C, Kilburn L, Fribbens C, Beaney M, Garcia-Murillas I, et al. ESR1 Mutations and Overall Survival on Fulvestrant versus Exemestane in Advanced Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: A Combined Analysis of the Phase III SoFEA and EFACT Trials. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2020;26(19):5172-7.
134. Callens C, Bidard FC, Curto-Taribo A, Trabelsi-Grati O, Melaabi S, Delaloge S, et al. Real-Time Detection of ESR1 Mutation in Blood by Droplet Digital PCR in the PADA-1 Trial: Feasibility and Cross-Validation with NGS. *Anal Chem.* 2022;94(16):6297-303.
135. Zundeleovich A, Dadiani M, Kahana-Edwin S, Itay A, Sella T, Gadot M, et al. ESR1 mutations are frequent in newly diagnosed metastatic and loco-regional recurrence of endocrine-treated breast cancer and carry worse prognosis. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):16.
136. Brett JO, Spring LM, Bardia A, Wander SA. ESR1 mutation as an emerging clinical biomarker in metastatic hormone receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2021;23(1):85.
137. Najim O, Seghers S, Sergoyne L, van Gaver H, Papadimitriou K, Wouters K, et al. The association between type of endocrine therapy and development of estrogen receptor-1 mutation(s) in patients with hormone-sensitive advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized and non-randomized trials. *Biochimica et biophysica acta Reviews on cancer.* 2019;1872(2):188315.
138. Grinshpun A, Chen V, Sandusky ZM, Fanning SW, Jeselsohn R. ESR1 activating mutations: From structure to clinical application. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2023;1878(1):188830.
139. Fanning SW, Jeselsohn R, Dharmarajan V, Mayne CG, Karimi M, Buchwalter G, et al. The SERM/SERD bazedoxifene disrupts ESR1 helix 12 to overcome acquired hormone resistance in breast cancer cells. *Elife.* 2018;7.
140. Jeselsohn R, Bergholz JS, Pun M, Cornwell M, Liu W, Nardone A, et al. Allele-Specific Chromatin Recruitment and Therapeutic Vulnerabilities of ESR1 Activating Mutations. *Cancer Cell.* 2018;33(2):173-86 e5.
141. Bahreini A, Li Z, Wang P, Levine KM, Tasdemir N, Cao L, et al. Mutation site and context dependent effects of ESR1 mutation in genome-edited breast cancer cell models. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):60.

142. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, et al. D538G mutation in estrogen receptor- α : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer research*. 2013;73(23):6856-64.
143. Li Z, Wu Y, Yates ME, Tasdemir N, Bahreini A, Chen J, et al. Hotspot ESR1 mutations are multimodal and contextual drivers of breast cancer metastasis. 2021.
144. Rinaldi J, Sokol ES, Hartmaier RJ, Trabucco SE, Frampton GM, Goldberg ME, et al. The genomic landscape of metastatic breast cancer: Insights from 11,000 tumors. *PLoS One*. 2020;15(5):e0231999.
145. Razavi P, Chang MT, Xu G, Bandlamudi C, Ross DS, Vasan N, et al. The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer Cell*. 2018;34(3):427-38 e6.
146. Bidard FC, Hardy-Bessard AC, Dalenc F, Bachelot T, Pierga JY, de la Motte Rouge T, et al. Switch to fulvestrant and palbociclib versus no switch in advanced breast cancer with rising ESR1 mutation during aromatase inhibitor and palbociclib therapy (PADA-1): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2022;23(11):1367-77.

6 Anhang

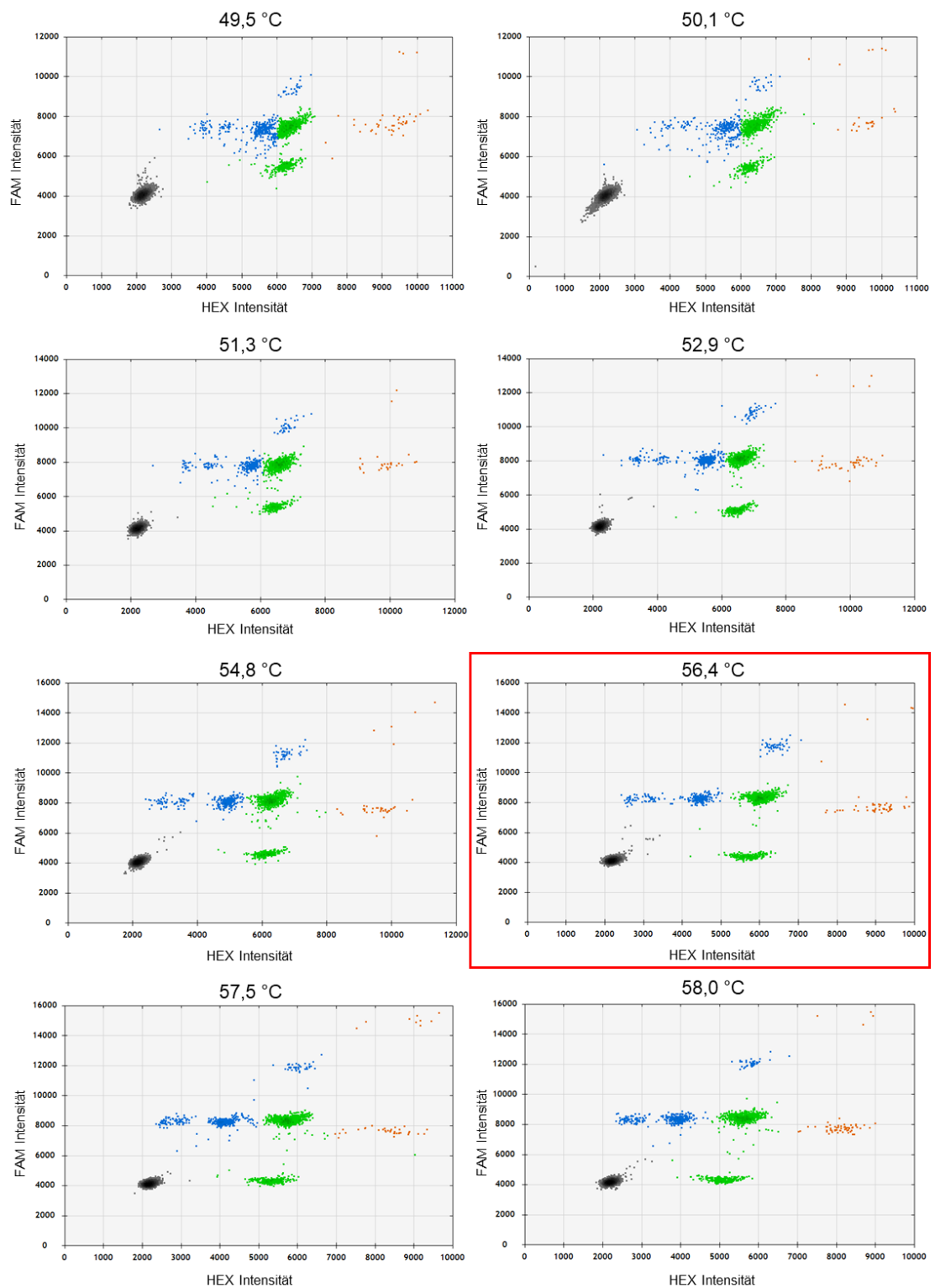


Abb. 21: Temperaturgradient zur Optimierung des Multiplex-ddPCR-Assays

Tabelle 19: Plasmaproben mit positivem *ESR1*-Mutationsstatus

Pat-Nr.	<i>ESR1</i> -Mutation	Akzeptierte Tröpfchen	WT-Tröpfchen	Mut-E380Q Tröpfchen	Mut-Ex8 Tröpfchen	MAF E380Q (%)	MAF Mut-Ex8 (%)	Konzentration E380Q (Kopien/μl)	Konzentration Mut-Ex8 (Kopien/μl)
6	Ex8	51618	8144	-	3	-	0,08	-	0,07
10	Ex8	44359	3828	-	267	-	13,39	-	7,10
15	Ex8	47614	2812	-	7	-	0,52	-	0,17
16	Ex8	46115	4795	-	7	-	0,28	-	0,18
17	Ex8	40132	5364	-	16	-	0,60	-	0,47
23	Ex8	50517	10549	-	5	-	0,10	-	0,12
26	E380Q, Ex8	52563	25251	8	812	0,05	6,21	0,27	18,80
28	Ex8	46421	33733	-	182	-	0,96	-	4,70
30	Ex8	50165	2252	-	384	-	30,53	-	9,20
31	Ex8	44622	4065	-	18	-	0,90	-	0,47
31	Ex8	41579	8757	-	13	-	0,32	-	0,37
33	Ex8	53860	35661	-	1718	-	8,71	-	38,10
35	Ex8	45437	8249	-	718	-	16,76	-	18,70
40	Ex8	44938	41587	-	6	-	0,02	-	0,16
43	Ex8	47031	8115	-	5	-	0,14	-	0,13
44	E380Q, Ex8	50676	22515	6	1618	0,04	13,19	0,14	42,60
45	Ex8	47171	6468	-	15	-	0,44	-	0,37
46	E380Q, Ex8	53263	5649	3	13	0,10	0,48	0,07	0,29
48	E380Q	54162	5031	5	-	0,18	-	0,11	-
48	E380Q, Ex8	40448	3264	79	11	4,26	0,70	0,32	2,20
60	Ex8	41468	3527	-	15	-	0,85	-	2,9
62	Ex8	48106	4389	-	4	-	0,18	-	0,1
64	Ex8	49530	4371	-	4	-	0,18	-	0,1
64	Ex8	46969	2853	-	34	2,45	-	1,91	-
66	Ex8	51792	4278	-	6	-	0,31	-	0,14
68	Ex8	48488	2552	-	9	-	0,74	-	0,85
76	E380Q	49174	15658	571	-	4,85	-	13,7	-
78	Ex8	46650	7768	-	9	-	0,12	-	0,23

Abkürzungen: Pat.-Nr. – Patientinnennummer; *ESR1* – *Estrogen receptor* 1; WT – Wildtyp; Mut – Mutation; Ex8 – Exon 8; MAF – *mutant allele frequency*

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich in den vergangenen Jahren auf unterschiedliche Weise bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Natalia Krawczyk, auf deren fachliche Begleitung und verlässliche Unterstützung ich jederzeit zählen konnte. Für ihre Geduld und den Ansporn bin ich ihr sehr dankbar.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. med. Tanja Fehm, Direktorin der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Düsseldorf, für die Möglichkeit, dieses Dissertationsprojekt umsetzen zu können.

Dem gesamten Team des Forschungslabors der Frauenklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf gilt mein herzlicher Dank. Insbesondere möchte ich mich bei Mahdi Rivandi für die gute Zusammenarbeit und seine wertvolle Hilfe während der zahlreichen Arbeitsstunden im Labor bedanken. Ein besonderer Dank geht zudem an Dr. rer. nat. André Franken für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit und seine konstruktiven Anregungen.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Dominik Böhm bedanken, der mir bei statistischen Fragestellungen kompetent und zuverlässig zur Seite stand.

Meinem Freund Luka danke ich für seine unendliche Geduld und Motivation, mit der er mir in allen Lebenssituationen eine große Stütze ist.

An dieser Stelle möchte mich außerdem bei meiner Mutter für die bedingungslose Unterstützung und die Ermöglichung meines Studiums bedanken.