

Technische Universität München

Frauenklinik und Poliklinik

Klinikum rechts der Isar

Methylierungsanalysen des BRCA1-Gens beim tripel-negativen Mammakarzinom

Christina Lutsch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.- Prof .Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Alfons Meindl

2. Prof. Dr . Marion B. Kiechle

Die Dissertation wurde am 09.10.2014 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 04.05.2016 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung und Struktur der Arbeit.....	8
2. Theoretische Grundlagen.....	8
2.1. Allgemeines zum Mammakarzinom	8
2.2. Das tripel-negative Mammakarzinom (TNBC)	10
2.2.1. Definition	10
2.2.2. Abgrenzung TNBC von basal-like Mammakarzinomen	11
2.2.3. Klinische Charakteristika des TNBC.....	11
2.2.4. Therapieoptionen	13
2.3. Die Karzinogenese	14
2.4. Das BRCA1-Gen	16
2.4.1. Aufbau und Funktion des BRCA1-Gens.....	16
2.4.2. Karzinomhäufigkeiten bei Mutationsträgerinnen	17
2.4.3. Assoziation von BRCA-1 und TNBC	17
2.5. Epigenetische Veränderungen des Erbguts.....	18
2.5.1. Methylierung	19
2.5.2. Mechanismen der Geninaktivierung durch Methylierung	20
2.5.3. Methylierung des BRCA1-Gens.....	21
2.6. Aktueller Stand der Forschung zu Methylierungen des BRCA1- Gens bei tripel-negativem Mammakarzinom.....	22
2.7. Fragestellungen der Arbeit.....	24
3. Material und Methoden	25
3.1. Material.....	25
3.1.1. Das Patientenkollektiv	25
3.1.2. Die klinischen Daten	26
3.1.3. Das analysierte DNA-Fragment	26
3.1.4. Primer	27
3.1.5. Molekularbiologische Kits	28
3.1.6. Geräte	29
3.1.7. Chemikalien	29
3.1.8. Lösungen, Puffer, Medien	31
3.1.9. Bakterien	32
3.1.10. Enzyme	32
3.1.11. Verbrauchsmaterial	33
3.2. Methoden	34
3.2.1. Bisulfit-Konvertierung und Aufreinigung der DNA.....	34
3.2.2. Herstellung einer 100% methylierten Kontroll-DNA	36
3.2.3. Methylierungsanalyse mit Hilfe des <i>Lightcycler 480 Systems</i>	36

3.2.3.1. Allgemeine Informationen zur <i>High-Resolution Melting</i> Analyse.....	36
3.2.3.2. Der LC480 Ansatz	37
3.2.4. Direkte Sequenzanalyse nach Sanger	38
3.2.5. Gelelektrophorese	39
3.2.6. Klonierung	40
3.2.6.1. Prinzip	40
3.2.6.2. Herstellung der Agar-Platten.....	41
3.2.6.3. Durchführung der Klonierung.....	41
3.2.6.4. Selektion mittels Blau/Weiß-Screening.....	42
3.2.7. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	44
3.2.7.1. Prinzip der MLPA-Analyse	44
3.2.7.2. Rechnerische Auswertung der Daten.....	46
3.2.7.3. Durchführung der MLPA-Analyse	47
3.2.8. DNA-Isolation aus Blut.....	48
3.2.9. Methoden der statistischen Auswertung	49
4. Ergebnisse.....	51
4.1. Ergebnisse der Experimente	51
4.1.1. Methylierungsanalysen am Lightcycler	51
4.1.2. Klonierung	53
4.1.3. Veränderungen der Kopienanzahl im Bereich des BRCA1-Gens.....	54
4.2. Statistische Auswertung der klinischen und der experimentell erhobenen Daten.....	57
4.2.1. Deskriptive Statistik	57
4.2.2. Kaplan-Meier-Analysen	60
4.2.2.1. Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben.....	60
4.2.2.2. Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens mit verschiedenen Faktoren	62
4.2.3. Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf den Methylierungsstatus.....	66
4.2.4. Auswertung der klinischen Daten in Hinblick auf die Kopienanzahlveränderungen des BRCA1-Gens	70
4.2.5. COX-Regression	72
5. Diskussion	76
5.1. Prävalenz der BRCA1-Promotormethylierung im tripel-negativen Patientenkollektiv	76
5.2. Zusammenhang der Methylierung mit anderen klinischen und pathologischen Faktoren.....	78

5.3.	Assoziation der Promotormethylierung mit einem LOH	79
5.4.	Auswirkungen der BRCA1-Methylierung auf die Prognose der Betroffenen.....	80
5.5.	Neue Substanzen für BRCA1-defiziente Tumoren...	83
5.6.	Schlussfolgerung	84
Zusammenfassung		85
Danksagung		87
Literaturverzeichnis		88
Tabellenverzeichnis		95
Abbildungsverzeichnis		96
Anhang		97

Abkürzungsverzeichnis

A	Desoxyadenin-5'-Monophosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
Bp	Basenpaare
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
BRCA2	Breast cancer susceptibility gene 2
C	Desoxycytidin-5'-Monophosphat
CMF	Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Methotrexat, Fluorouracil
CpG	Dinukleotid aus einem Cytosin- und einem Guanin-Rest
CR	<i>Komplettremission</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EC	Chemotherapie mit Epirubicin und Cyclophosphamid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (engl. epidermal growth factor receptor)
FEC	Chemotherapie aus Fluorouracil, Epirubicin und Cyclophosphamid
forw.	vorwärts (engl. forward)
G	Desoxyguanin-5'-Monophosphat
g	Erdbeschleunigung (engl. gravity)
HER2	Humaner epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2
HDF	High Dye Formamid
hMLH1	human mutL homolog 1
HR	Hazard Ratio
HRM	High resolution melting
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	kilobasen
kDa	Kilodalton

LOH	Verlust eines Allels (engl. loss of heterozygosity)
M	Molar
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger RNA)
MS-HRM	Methylation-sensitive high resolution melting
MSP	Methylation specific RCR
NHEJ	Non-homologous end-joining
OP	Operation
pCR	pathologische Komplettremission
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
rev.	rückwärts (engl. Reverse)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
SAS	Statistical Analysis Systems
SpSS	Statistical package for the social sciences
T	Desoxythymidin-5'-Monophosphat
TAE-Puffer	Tris- Acetat- EDTA-Puffer
TNBC	Tripel-negatives Mammakarzinom (engl. Triple-negative breast cancer)
U	Desoxyuracil-5'-Monophosphat
x-gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

1. Einleitung und Struktur der Arbeit

Die vorliegende Arbeit ist als Dissertation im Fach Medizin an der Technischen Universität München angefertigt worden. Ihre Erstellung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Frauenklinik und der Pathologie des Klinikums rechts der Isar. Thema dieser Arbeit ist die Methylierungsanalyse des BRCA1-Gens beim tripel-negativen Mammakarzinom.

Die Arbeit gliedert sich in 5 Kapitel. Der Einleitung schließt sich das Kapitel über die theoretischen Grundlagen und die Fragestellungen der Arbeit an. In Kapitel 3 werden die verwendeten Materialien aufgelistet und die Methoden dargestellt. Daraufhin werden in Kapitel 4 die Ergebnisse der Experimente sowie der Prüfstatistik dargelegt. Im abschließenden 5. Kapitel erfolgt die Diskussion der Ergebnisse und Einordnung in den Stand der Forschung. Abschließend ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Aspekte der Arbeit angefügt.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Allgemeines zum Mammakarzinom

Das Mammakarzinom hat mit weltweit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr die höchste Inzidenz der malignen Tumoren bei Frauen. Allerdings bestehen bezüglich der Neuerkrankungsrate einzelner Länder erhebliche Unterschiede. In Entwicklungsländern tritt Brustkrebs selten auf, wohingegen in westlichen Industrieländern wie Deutschland jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an diesem Tumor erkrankt (Robert-Koch-Institut, 2012). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die geografischen und ethnologischen Unterschiede Folge der unterschiedlichen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten sind.

Im Jahr 2008 wurde in Deutschland bei 71 660 Frauen ein maligner Tumor der Brustdrüse diagnostiziert (Robert-Koch-Institut, 2012). Bei jeder zweiten Erkrankten tritt das Mammakarzinom vor dem 65. Lebensjahr auf, bei jeder zehnten Patientin sogar vor dem 45. Geburtstag, also in einem Alter, in dem die meisten anderen bösartigen Tumorerkrankungen nur sehr selten entstehen (Robert-Koch-Institut, 2012). Außerdem kommen dem Brustkrebs die meisten krebisbedingten Todesfälle bei Frauen zu. Laut Robert-Koch-Institut (2012) starben 2008 in der Bundesrepublik 17.209 Frauen und 136 Männer an einem Mammakarzinom. Unter dem Begriff Mammakarzinom ist eine sehr heterogene Gruppe von Tumoren zusammengefasst, die sich unter anderem hinsichtlich ihrer Histologie, ihrem klinischen Verhalten und ihrer Prognose deutlich voneinander unterscheiden.

Histologisch werden die malignen Brusttumoren je nach Ursprungsgewebe in das duktaie, das mit 70- 80% das häufigste invasive Karzinom der Brust darstellt, sowie das lobuläre (ca.10%) und seltene Entitäten wie das medulläre, das tubuläre, das muzinöse oder das papilläre Karzinom unterteilt (Kiechle, 2007).

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der für Tumoren üblichen TNM-Klassifikation, wobei T für die Tumorgröße, N für den Nodalstatus und M für die Fernmetastasierung steht. Eine detaillierte Stadieneinteilung der Mammakarzinome ist in Lehrbüchern der Gynäkologie zu finden (Kiechle, 2007).

Neben dem Alter der Patientin, der TNM-Klassifikation, dem histologischen Typ und dem Grading, also dem Grad der Differenzierung der Tumorzellen, sind der Steroidrezeptorgehalt und der HER2 (humaner epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor 2)-Status des Tumors wichtige prognostische Faktoren, mit denen der Krankheitsverlauf abgeschätzt und eine Vorhersage über Rezidivwahrscheinlichkeiten und Mortalitäten gegeben werden kann (Harbeck et al., 2002). Welche Bedeutung die Ausbildung eines tripel-negativen Brusttumors für die Patientin hat, soll im Abschnitt 2.2 dargelegt werden.

2.2. Das tripel-negative Mammakarzinom (TNBC)

2.2.1. Definition

Da Östrogen und Progesteron über zelluläre Rezeptoren stimulierend auf das Wachstum von normalen sowie von einigen malignen Brustdrüsenzellen wirken und dem medikamentös entgegengesteuert werden kann, wird routinemäßig bei jedem Mammakarzinom der Steroidhormonrezeptorgehalt des Tumors bestimmt. Immunhistochemisch werden semiquantitativ durch Untersuchung am Kryostat- oder Paraffinschnitt mit Hilfe von Antikörpern der Östrogen- und der Progesteronrezeptorgehalt der Zellkerne gemessen (Böcker W. , 2004). Zeigen mehr als 1% der Tumorzellkerne die für das verwendete Chromogen typische Anfärbung, wird der Tumor als rezeptorpositiv gewertet (Hammond et al., 2010).

Ein weiterer routinemäßig bestimmter Parameter ist der sog. HER2/NEU-Status des Mammakarzinoms. Das HER2/NEU-Gen kodiert für einen Wachstumsfaktorrezeptor und ist bei ca. 25-30% der invasiven Mammakarzinome amplifiziert (Kiechle, 2007). Diese Überexpression führt zu einer entsprechenden Wachstumsstimulation der Tumorzellen. Klinisch präsentieren sich HER2/NEU positive Karzinome als hochmaligne, wobei sie gut auf die Gabe von Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den überexprimierten Rezeptor, in Kombination mit einer systemischen Chemotherapie ansprechen (Böcker W. , 2004).

Ist ein Tumor nun bezüglich Östrogen- und Progesteronrezeptoren negativ und zeigt zudem keine Überexpression des HER2/NEU-Gens wird er als „tripel-negativ“ bezeichnet. Diese Gruppe von Tumoren zeigt ganz typische klinische Merkmale, die im Abschnitt 2.2.3 erläutert werden.

Zuvor soll noch eine begriffliche Abgrenzung der tripel-negativen Karzinome zu den „basal-like“ Mammatumoren vorgenommen werden, da diese beiden Subgruppen sich in vielen Aspekten ähneln, und tatsächlich auch die Mehrzahl der „basal-like“ Tumore tripel-negativ sind.

2.2.2. Abgrenzung TNBC von basal-like Mammakarzinomen

Die Abgrenzung der tripel-negativen Karzinome von den basal-like Mammakarzinomen wurde detailliert in Sorlie et al. (2001) untersucht. Die sog. „basal-like“ Mammakarzinome, die ihren Namen der Ähnlichkeit ihres Genexpressionsmusters mit den basalen, myoepithelialen Zellen der Brust verdanken, zeigen einige Gemeinsamkeiten mit den tripel-negativen Tumoren, dennoch sollten laut dieser Studie die Begriffe *basal-like* und *tripel-negativ* nicht synonym verwendet werden. Ein Großteil der basal-like Karzinome ist zwar tripel-negativ, und somit in dem Kollektiv der tripel-negativen Karzinome zu finden, bei Expressionsanalysen findet man aber zudem eine vermehrte Expression von Zytokeratinen der basalen Zellen und des EGFR (*epidermal growth factor receptor*), was sie zu einer eigenständigen Subgruppe macht. Ein kleinerer Part der basal-like Tumoren zeigt das typische basale Expressionsmuster, ist aber nicht tripel-negativ, woraus sich eine gemeinsame Schnittmenge der tripel-negativen und der basal-like Tumoren ergibt.

Die angesprochenen Gemeinsamkeiten der tripel-negativen und der basal-like Tumoren sind darüber hinaus auch im klinischen Erscheinungsbild zu finden. Sie zeigen beispielsweise ebenfalls ein sehr aggressives Wachstumsverhalten, hohes histologisches Grading und ein frühes Erkrankungsalter.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Tumorproben nicht nach Zytokeratinexpressionsmustern untersucht, wodurch in dem behandelten Kollektiv der tripel-negativen Karzinome möglicherweise eine Vielzahl von basal-like Tumoren zu finden sind.

2.2.3. Klinische Charakteristika des TNBC

Mit knapp 15% an der Gesamtzahl der Mammakarzinome stellt das tripel-negative eine relativ kleine, aber sehr heterogene Subgruppe der Brusttumoren dar (Daudt et al., 1996; Sorlie et al., 2001; Sorlie et al., 2003). Patientinnen mit TNBCs haben eine relativ schlechte Prognose, was sich deutlich daran zeigt, dass, obwohl nur ca. 15% aller malignen

Brusttumoren tripel-negativ sind, überproportional viele Mammakarzinomsterbefälle Frauen sind, die an einem solchen Tumor gelitten haben (Schneider et al., 2008).

TNBCs werden deutlich häufiger bei der klinischen Untersuchung oder Selbstpalpation der Brust entdeckt, als durch die Mammografie oder Ultraschall, was ihr aggressives und schnelles Wachstum belegt (Dent et al., 2007). Dadurch sind diese Tumoren bei Erstdiagnose auch meist größer als andere Mammakarzinome. Beim histologischen Grading werden sie überdurchschnittlich oft als schlecht- bzw. undifferenziert (G3) eingestuft (Dent et al., 2007). Zudem sind Patientinnen mit einem TNBC bei Erstdiagnose jünger als der Durchschnitt aller Patientinnen mit Brustkrebs. 2008 lag das mittlere Erkrankungsalter für Brustkrebs in Deutschland bei 65 Jahren (Robert-Koch-Institut, 2012). In allen groß angelegten TNBC-Studien lag das mittlere Erkrankungsalter bei TNBC-Patientinnen deutlich darunter, und zwar je nach Studie zwischen dem 53. und 55. Lebensjahr (Bauer et al., 2007; Dent et al., 2007; Pogoda et al., 2013).

Die Wahrscheinlichkeit einen positiven Nodalstatus zu haben folgt beim Mammakarzinom grundsätzlich der Tumorgöße. Kleinere Tumore sind also seltener mit tumorbefallenen Lymphknoten assoziiert, als große Raumforderungen. Bei den tripel-negativen Tumoren kann man diesen Zusammenhang allerdings nicht nachweisen. Schon kleine TNBCs sind häufig nodalpositiv (Dent et al., 2007).

Betrachtet man die Follow-up Daten der großen Studien, fällt auf, dass das TNBC mit einer hohen Rezidivrate in den ersten drei Jahren nach initialer Therapie vergesellschaftet ist, zusammen mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall als beim Mammakarzinom allgemein. Wenn Fernmetastasen auftreten, sind diese in erster Linie in Gehirn und Lunge zu finden, seltener in Knochen oder Leber. Dafür treten nach den ersten drei Jahren nach Therapie kaum noch Rezidive auf (Dent et al., 2007). Obwohl tripel-negative Karzinome sehr chemosensitiv sind, haben sie dennoch eine schlechte Prognose mit einer hohen Rate an tumorbedingten Sterbefällen

(Liedtke et al., 2008). Welche Therapieoptionen einer Patientin mit einem TNBC derzeit angeboten werden können, wird im nächsten Abschnitt erläutert.

2.2.4. Therapieoptionen

Als Basis der Therapie aller nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome wird die operative Entfernung des Tumors angesehen, wobei - unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien - entweder eine Mastektomie durchgeführt werden kann, oder eine brusterhaltende Tumoroperation mit anschließender Bestrahlung möglich ist. Hinsichtlich des Überlebens sind beide Strategien als gleichwertig anzusehen (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1995). Dabei ist die Exzision im Gesunden (R0) mit einem minimalen Resektionsrand von 1mm essenziell wichtig für die Prognose der Patientin (AWMF, 2012), da ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Resektionsstatus und der Lokalrezidivrate besteht (Houssami et al., 2010). Ebenfalls sollte während der Operation der Sentinel Lymphknoten aufgesucht und pathologisch untersucht werden und bei Tumorbefall gegebenenfalls eine Axilladisektion angeschlossen werden (Kuehn et al., 2005).

Je nach Steroidrezeptorstatus folgt eine antihormonelle Behandlung. HER2/NEU-amplifizierte Tumoren werden zusätzlich mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den überexprimierten Wachstumsfaktorrezeptor behandelt. Diese äußerst wirksamen Therapieansätze sind bei Patientinnen, deren Tumor weder Östrogen- oder Progesteronrezeptoren noch einen positiven HER2/NEU-Status zeigen, obsolet. Derzeit steht den TNBC-Patientinnen als einzige medikamentöse Option die Chemotherapie zur Verfügung. Anthrazykline und Taxane gelten momentan als die wirksamsten Substanzen in der Therapie dieses malignen Brustkrebses (AWMF, 2012; Liedtke et al., 2008; Carey et al., 2007; Rouzier et al., 2005). In diesem Zusammenhang formulierte Gluz 2009 das TNBC-Paradoxon, welches besagt, dass TNBC-Patientinnen ein sehr gutes Ansprechen auf Chemotherapeutika mit hohen komplett-

Remissions (CR) -Raten zeigen, insgesamt aber trotzdem kürzere Überlebensdaten haben als nicht-TNBC-Patientinnen. Die Frauen, die nach der Chemotherapie eine pCR zeigen, haben eine exzellente Prognose. Diejenigen, bei denen noch Tumorresiduen nachweisbar sind, haben ein signifikant kürzeres Überleben als Patientinnen mit ähnlicher Situation, die nicht an einem TNBC leiden (Gluz et al., 2009).

Für diese Patientinnen, die nach Chemotherapie nicht in Remission sind und deshalb verglichen mit nicht-TNBC-Patientinnen eine sehr schlechte Prognose haben, muss auf molekularer Ebene nach spezifischen Charakteristika gesucht werden, um ihnen neue erfolgsversprechende Therapieoptionen anbieten zu können.

Um Tumore molekulargenetisch zu untersuchen und Unterschiede zwischen den TNBCs zu finden, ist es wichtig, die Tumorentstehung zu kennen.

2.3. Die Karzinogenese

Ursächlich für die Krebsentstehung im Allgemeinen ist entweder eine Aktivierung von Onkogenen oder eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Onkogene sind zelluläre Gene, die aus einem Protoonkogen durch Mutationen entstehen, und so einen Zugewinn an Funktion (*gain of function*) erhalten. Die Genprodukte der Onkogene können die Transformation einer Zelle zu einer Krebszelle mit unkontrolliertem Wachstum bedingen. Sie sind unter anderem an Transportprozessen, Signaltransduktionswegen und bei der Proliferation der Zelle beteiligt. Bei Mutation oder Translokation, wobei das Onkogen unter die Kontrolle einer aktiven Promotorsequenz gerät, kann es zu einer konstitutiven Aktivierung des Gens und damit zu einer Überfunktion des entsprechenden Signalweges kommen. Typische Onkogene kodieren zum Beispiel für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktor-Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren oder Rezeptortyrosinkinasen. Onkogene haben auf zellulärer Ebene einen dominanten Effekt, das heißt

eine Mutation auf einem Allel genügt, um eine Veränderung des Phänotypes zu bewirken (Schaaf, 2007).

Tumorsuppressorgene sind ebenfalls zelluläre Gene, die in gesunden Zellen aktiv sind, deren Genprodukte das Zellwachstum, die Proliferation bzw. den Fortschritt im Zellzyklus (*sog. Gatekeeper-Gene*) kontrollieren, die Zelle gegebenenfalls in Apoptose schicken, oder die genetische Stabilität durch DNA-Reperaturmechanismen (*sog. Caretaker-Gene*) sichern. Eine Mutation in einem Tumorsuppressorgen, die zu Funktionsverlust (*loss of function*) führt, begünstigt somit unkontrolliertes Zellwachstum und -teilung und damit die Tumorentstehung (Deininger, 1999). Tumorsuppressorgene verhalten sich auf zellulärer Ebene rezessiv,

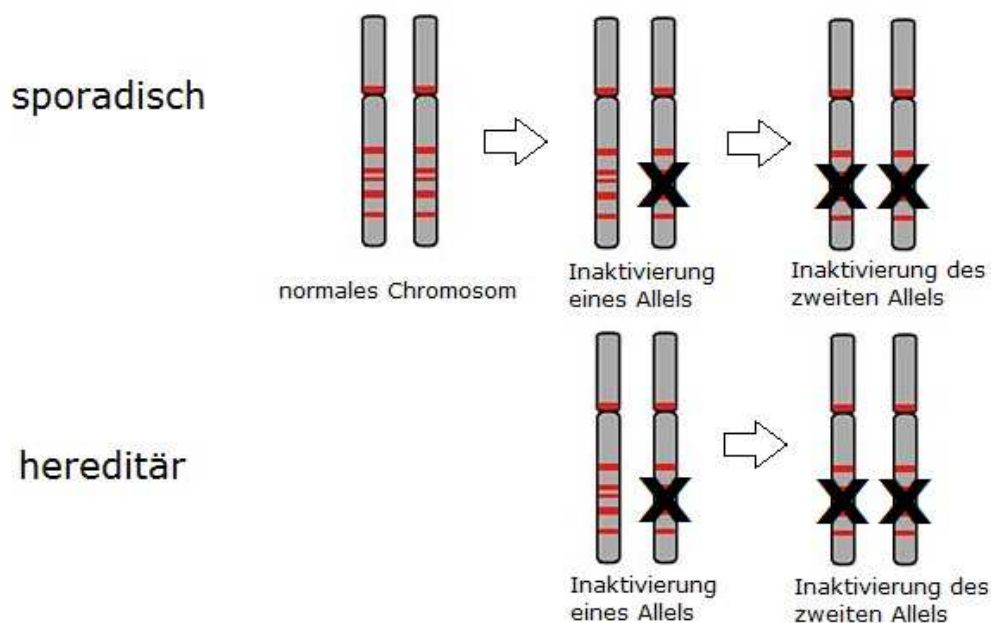


Abb. 1: 2-Hit-Hypothese von Knudson. Eigene Darstellung.

das heißt, es müssen beide Allele defekt sein, damit die Zelle zu einer Tumorzelle transformiert („second hit-Hypothese“, Knudson (1971)). Das erste Ereignis, welches zum Funktionsverlust eines Allels führt, ist meist eine Keimbahn- oder eine sporadische Mutation. Solange das andere Allel aber normal arbeitet, kommt es nicht zur Tumorentstehung. Erst wenn ein 2. Ereignis (*sog. second hit*) eintritt und damit auch das verbleibende Allel funktionsunfähig wird, entsteht ein Tumor (siehe Abbildung 1).

Das zweite Ereignis kann eine weitere sporadische Mutation oder eine epigenetische Veränderung, wie z.B. eine geninaktivierende Promotor-Hypermethylierung, sein.

Bei erblichen Fällen kommt ein mutiertes Allel aus der Keimbahn eines Elternteils, was dazu führt, dass der Nachkomme in jeder Körperzelle nur noch ein funktionierendes Allel aufweist. Die Wahrscheinlichkeit, dass durch somatische Mutation oder epigenetische Mechanismen das gesunde Allel ausgeschaltet wird, ist drastisch erhöht, was auch das frühere Auftreten der erblichen Tumoren erklärt (M. Jungck, 1999).

Eines der Tumorsuppressorgene ist das BRCA1-Gen, welches unter anderem bei der Entstehung von Brustkrebs eine Rolle spielen kann.

2.4. Das BRCA1-Gen

2.4.1. Aufbau und Funktion des BRCA1-Gens

Groß angelegte Studien zeigten, dass Verwandte 1. Grades von Patientinnen mit Brustkrebs etwa doppelt so häufig ebenfalls ein Mammakarzinom entwickelten, wie Frauen ohne positive Familienanamnese. Dies legte die Vermutung nahe, dass erbliche Faktoren eine Rolle spielen könnten.

Im Jahr 1990 wurde von der Forschergruppe um J.M. Hall das erste dieser Prädispositionsgene für den Brustkrebs entdeckt und BRCA1 (*breast cancer gene1*) genannt (Schaaf, 2007). Es liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 17q (17q21) und ist für ca. 3% aller Mammakarzinome verantwortlich. Ebenso viele Tumore bedingt das 1994 von Stratton und Wooster (Institute of Cancer Research, UK) entdeckte BRCA2-Gen (Miki et al., 1994).

Das BRCA1-Gen erstreckt sich über 81kb und untergliedert sich in 24 Exons, von denen 22 für das Protein kodieren. Das mRNA-Transkript ergibt nach der Translation ein 1863 Aminosäuren großes Protein mit einem Molekulargewicht von 220kDa. Die Produkte der BRCA Gene finden sich

vor allem in sich teilenden Zellen und konnten in Gewebe von Mamma, Ovar, Thymus und Testes nachgewiesen werden (Miki et al., 1994). Beide Gene kodieren für Proteine, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind und an DNA-Reparaturmechanismen teilnehmen. BRCA1 repariert mittels homologer Rekombination und *non-homologous end-joining (NHEJ)* DNA-Doppelstrangbrüche.

2.4.2. Karzinomhäufigkeiten bei Mutationsträgerinnen

Ca. 5-10% aller Brustkrebsfälle sind auf genetische Mutationen zurückzuführen (Daudt et al., 1996). Keimbahnmutationen in den *breast cancer susceptibility genes* (BRCA1 und BRCA2) sind für den Großteil der vererbten Mammakarzinome verantwortlich. In Familien, in denen gehäuft Brustkrebs auftritt, sind in 15-45% Keimbahnmutationen im BRCA1 gefunden worden. Bei familiärem Auftreten von Mamma- und Ovarialkarzinomen sind sogar 60-80% der Frauen von geerbten Mutationen im BRCA1-Gen betroffen. Die Trägerin einer Mutation im BRCA1-Gen hat ein Lebenszeitrisiko von 60-80% (Easton et al., 1993) einen Brusttumor und 20-40% Risiko ein Ovarialkarzinom (Easton et al., 1995) zu entwickeln.

Das BRCA2-Gen zeigt bei Mutation ähnliche Lebenszeitrisiken für Brust- (60-85%) und Ovarialkrebs (10-20%) wie das BRCA1-Gen, es wurde allerdings auch mit einem gehäuften Auftreten von Prostata-, Pankreas-, Darm-, Gallenblasen-, Gallengangs-, Magen- und schwarzem Hautkrebs in Assoziation gebracht (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999).

2.4.3. Assoziation von BRCA-1 und TNBC

Betrachtet man die Tumoren der BRCA1-Mutationsträgerinnen, sind diese häufiger tripel-negativ als die Karzinome von Frauen mit einem Wildtyp BRCA1-Gen (Byrski et al., 2008; Li et al., 2008; Musolino et al., 2007). Ca. 70% der BRCA1- mutierten Tumore sind vom tripel-negativen Subtyp, aber nur rund 15% im Gesamtkollektiv (Lakhani et al., 2005; Foulkes et al., 2003). Zudem ähneln sich die BRCA1-assozierten Tumoren und die

sporadischen tripel-negativen in ihrem biologischen Verhalten und ihrer Prognose. Verglichen mit BRCA1-Wildtyp TNBCs tritt die Erkrankung bei Patientinnen mit BRCA1-Mutation noch früher auf (Gonzalez-Angulo et al., 2011). Hinsichtlich des Gradings, der Histologie und des Nodalstatus verhalten sich beide Gruppen sehr ähnlich.

Patientinnen mit BRCA1-mutierten Mammatumoren haben ohne adjuvante Chemotherapie eine höhere tumorbedingte Sterblichkeit als sporadische Brustkarzinome (Bordeleau et al., 2010). Werden diese Tumoren allerdings mit der passenden Chemotherapie behandelt, zeigen Patientinnen mit BRCA1-Mutation eine signifikant bessere 5-Jahres-Überlebensrate und ein längeres rezidivfreies Intervall als Frauen ohne diese Genveränderung (Gonzalez-Angulo et al., 2011; Lee et al., 2011).

Einige Studien haben erbracht, dass bei einem Teil der TNBCs, die vom Phänotyp und dem klinischen Verhalten her BRCA1-mutiert sein könnten, bei denen aber bei Testung keine Mutation gefunden werden konnte, das BRCA1-Gen durch andere Mechanismen abgeschaltet sein könnte (Turner and Reis-Filho, 2006; Turner et al., 2007). Zum Beispiel können epigenetische Veränderungen des Erbguts Gene abschalten (Esteller, 2008) ohne dass eine Mutation vorliegen muss.

2.5. Epigenetische Veränderungen des Erbguts

Unter Epigenetik versteht man Vererbung von Zelleigenschaften, die von der eigentlichen DNA-Sequenz unabhängig sind.

Heutzutage sind verschiedene epigenetische Mechanismen bekannt. Zu den Wichtigsten gehören zum einen die Methylierung der DNA, welche eine zentrale Rolle bei der Expression von Genen spielt und zum anderen die Modifikation der Histone, die den Kondensationsgrad des Chromatins und damit ebenfalls die Steuerung der Genexpression beeinflusst (Schaaf, 2007). Da die Methylierung im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, wird diese im Anschluss ausführlich behandelt, für weitere Informationen zu anderen

epigenetischen Veränderungen wird auf Lehrbücher der Humangenetik verwiesen.

2.5.1. Methylierung

Unter DNA-Methylierung versteht man das kovalente Anfügen von Methylgruppen an die 5-Carbonposition einer Cytosinbase. Beim Menschen sind 6 verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMTs) bekannt. Am wichtigsten sind die Isoformen 1 und 3, da ihr Fehlen schon in der Embryonalentwicklung zu erheblichen Störungen führt (Knippers, 2006). Die DNMT-1 folgt dem Replikationskomplex und fügt Methylgruppen an den neusynthetisierten DNA-Strang an, wenn der abgelesene Strang auch eine Methylierung enthält. Sie ist also für die Erhaltung von Methylierungen zuständig (Knippers, 2006). Die DNMT-3a/3b bindet Methylgruppen an Cytosinbasen, die vorher unmethyliert waren. Sie ist damit für Neumethylierungen verantwortlich. Unter Zuhilfenahme von S-Adenosylmethionin als Methylgruppendedonator fügen die DNA-Methyltransferasen Methylgruppen fast ausschließlich an Cytosinbasen an, die in der 5'-CpG-3' Basenabfolge vorliegen. Die Verteilung dieser CpG-Inseln variiert innerhalb des menschlichen Genoms stark. Während wenige CpG Dinukleotide über das gesamte Genom verteilt sind, kommt es bei mehr als 50% aller menschlichen Gene zu einer stromaufwärts gelegenen CpG Dinukleotidhäufung (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Normalerweise sind diese CpG-Inseln im Promotorbereich der zu transkribierenden Gene unmethyliert (Antequera and Bird, 1993). Eine Methylierung an dieser Stelle bedeutet eine Inaktivierung der Transkription (Stefansson et al., 2011). Physiologisch kommt diese Art der Stilllegung von Genen als dauerhafte Maßnahme zum Beispiel bei der Ausschaltung des 2. X-Chromosoms bei Frauen vor.

2.5.2. Mechanismen der Geninaktivierung durch Methylierung

Wie beeinflusst eine Methylgruppe nun die Transkription? Nach heutigem Wissensstand sind verschiedene Mechanismen daran beteiligt. Zum einen kommt es durch Methylierung in der Promotorsequenz zur Verdrängung von Transkriptionsfaktoren, die normalerweise an die betroffene Sequenz binden würden (Watt and Molloy, 1988). Ein anderer Mechanismus ist, dass die Methylierung eine Bindung von Proteinen, mit sogenannten Methyl-CpG-Bindedomänen induziert, die eine erhöhte Affinität für methylierte DNA aufweisen. Diese Proteine rekrutieren wiederum Moleküle, die die Transkription blockieren und durch Modifikation von Histonen zu einer Verdichtung des Chromatins und damit ebenfalls zur Inaktivierung führen (Boyes and Bird, 1991).

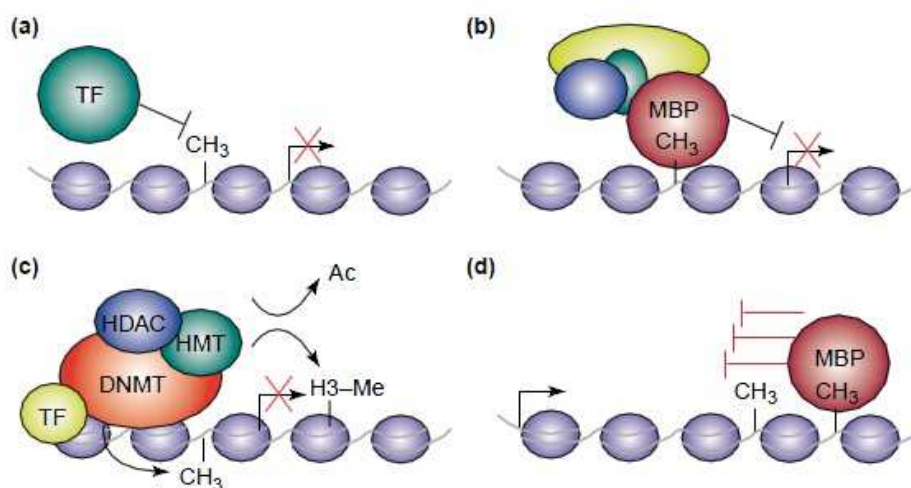


Abb. 2: Mechanismen Methylierungs-vermittelter Genrepression. (a) direkte Inhibition der Transkription durch Verhinderung der Bindung von Transkriptionsfaktoren (TF) (b) Proteine mit Methyl-CpG-Bindedomänen (MBP) binden an methylierte DNA und rekrutieren verschiedene Moleküle, die die Transkription verhindern und die Chromatinstruktur beeinflussen können (c) Zusätzlich können DNMTs mit Histonmethylasen (HMT) und Histondeacetylasen (HDAC) verknüpft sein, wobei DNA methyliert wird, die durch Histonmodifikation bereits reprimiert ist. (d) Eine Methylierung im Gen kann ebenfalls durch Veränderung der Chromatinstruktur und Bindung von Methyl-CpG-Bindeproteinen zur Inaktivierung führen (Klose and Bird, 2006).

Eine Methylierung im Gen kann ebenfalls durch Veränderung der Chromatinstruktur und Bindung von Methyl-CpG-Bindeproteinen zur Inaktivierung führen. Außerdem können DNMTs mit Histon-modifizierenden Molekülen interagieren und damit ebenfalls die Transkription hemmen. Abbildung 2 veranschaulicht die verschiedenen Möglichkeiten der Inaktivierung von Genen durch Methylgruppen.

Bei Krebszellen kann man im Gegensatz zu normalen Zellen spezifische Veränderungen im Methylierungsmuster finden. Im Promotorbereich bestimmter Gene kann es durch Hypermethylierung zu Inaktivierung und damit zum Verlust der Genexpression kommen. Andererseits gibt es aber auch eine genomweite Hypomethylierung von Krebszellen, bei der der Gehalt an methylierten CpG-Stellen herabgesetzt ist.

2.5.3. Methylierung des BRCA1-Gens

Mitte der 1990er Jahre wurde im Rahmen der Kolonkarzinomforschung eine Promotormethylierung des hMLH1-Gens als Ursache dafür beschrieben, dass diese Tumoren das hMLH1-Genprodukt nicht exprimieren, ähnlich den Karzinomen, die eine Mutation in diesem Gen aufweisen (Kane et al., 1997; Herman et al., 1998).

Manel Esteller untersuchte im Jahr 2000 den Einfluss von Hypermethylierung im Promotorbereich des BRCA1-Gens auf die Tumorentstehung beim Mammakarzinom. Experimente an DNA-Proben aus verschiedenen gesunden Geweben, wie z.B. aus Lymphozyten, der Brust, dem Ovar oder der Lunge zeigten, dass die Promotorregion dieses Gens normalerweise vollständig unmethyliert vorliegt. Sind in einem Mammakarzinom Methylgruppen an die CpGs der Promotorregion gebunden, resultiert, genau wie beim Kolonkarzinom beschrieben, eine herabgesetzte bis fehlende Expression des Genprodukts, was im Fall BRCA1-Gens eine DNA-Reparaturstörung bedeutet (Esteller et al., 2000; Rice et al., 2000; Lips et al., 2011; Bal et al., 2012).

DNA-Methylierung stellt also, neben einer Mutation, eine weitere Möglichkeit der Geninaktivierung dar. Gemäß der *Second-Hit-Hypothese*

von Knudson für Tumorsuppressorgene kann die Hypermethylierung des BRCA1-Gens für einen *Hit* verantwortlich sein. Die Forschergruppe um Manel Esteller fand außerdem eine Assoziation von Promotormethylierung des BRCA1-Gens und Patientinnen mit einem LOH (*loss of heterozygoty*), also einem Verlust von Genmaterial meist durch Deletion, in diesem Gen. Diese stellt dann den zweiten *Hit* gemäß der Hypothese dar. Bei 20% der Mammakarzinompatientinnen mit einem LOH konnte eine Methylierung des BRCA1-Gens nachgewiesen werden. Beim Ovarialkarzinom waren es in dieser Studie sogar 31% (Esteller et al., 2000).

2.6. Aktueller Stand der Forschung zu Methylierungen des BRCA1-Gens bei tripel-negativem Mammakarzinom

In den letzten Jahren wurden einige Studien zur Methylierungsanalysen des BRCA1 Promotors in unselektiertem Mammakarzinom-Patientenkollektiven durchgeführt. Es wurde eine Methylierungshäufigkeit zwischen 7% und 30% gefunden. Meist ist auch eine Assoziation zwischen Methylierung und negativem Hormonrezeptorstatus beschrieben (Catteau and Morris, 2002; Esteller et al., 2000; Krasteva et al., 2012; Singh et al., 2011).

Nach sorgfältiger Literaturrecherche findet man bezüglich der Prävalenz von epigenetischen Veränderungen in der tripel-negativen Subgruppe sehr unterschiedliche Angaben. Xu et al. veröffentlichten 2013 eine Studie über die Auswirkung der BRCA1-Methylierung auf die Effektivität einer adjuvanten Chemotherapie bei TNBCs und Nicht-TNBCs. 31% der 167 tripel-negativen Tumoren zeigten eine Methylierung in der *methylation-specific PCR (MSP)* und 24% der Nicht-TNBCs (Xu et al., 2013).

Die Forschergruppe um T. Ignatov publizierten ebenfalls 2013 eine Vergleichsstudie, in der 70 TNBCs mit 70 Nicht-TNBCs hinsichtlich ihres Methylierungsstatus und ihrer Überlebenszeiten verglichen wurden. Die Methylierungsanalysen wurden ebenfalls mit der MSP durchgeführt. Es

wurde eine Methylierung von 65,2% gefunden, die sich in beiden Gruppen kaum voneinander unterschied (Ignatov et al., 2013).

Die BRCA1-Expression bei tripel-negativen Tumoren wurde von Galizia et al. (2010) untersucht. Dazu wurden 44 TNBCs und 68 Kontrollen mittels MSP auf Methylierungen analysiert. Bei 31,8% der TNBCs und 20,6% der Nicht-TNBCs konnte eine Promotormethylierung nachgewiesen werden. Bei 21,4% der methylierten und nur 6% der unmethylierten Tumoren war das BRCA1-Gen inaktiviert. Die letzten beiden Studien wurden an sehr kleinem Stichprobenumfang durchgeführt, was die erhaltenen Prävalenzen infrage stellt.

Auch besteht Uneinigkeit darüber, ob die Methylierung mit klinischen und pathologischen Faktoren assoziiert ist oder nicht. Xu et al. fanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen Faktoren und der Methylierung. Allerdings wären hier auch Tendenzen interessant, die vielleicht nur aufgrund der kleinen Stichprobe keine Signifikanzen ergeben. Bei Wei et al. (2012) wird hingegen eine Assoziation zwischen Grading, Tumorgröße und Methylierung beschrieben. Dort wurde allerdings ein unselektiertes Patientengut und keine TNBCs untersucht. Die Forschergruppe um Ignatov stellte hierzu keine Korrelationsanalysen an.

Gibt es gemäß der 2-Hit-Hypothese von Knudson neben der Methylierung ein anderes Ereignis, das zur Inaktivierung des BRCA1-Gens und damit zur Krebsentstehung führt? Einige Studien zeigten, dass die Methylierung bei Patientinnen mit einer Mutation keine Rolle spielt (Vasilatos et al., 2009). Der Verlust eines Allels (LOH) wird von einigen Autoren als häufige genetische Veränderung bei sporadischen Brustkrebs beschrieben (Cropp et al., 1994; Johnson et al., 2002).

2012 wurde von Okada et al. publiziert, dass LOHs am BRCA1-Locus bei 42,5% der Tumoren gefunden wurden und dass diese unter anderem mit Hormonrezeptornegativität vergesellschaftet sind. Zudem hatten Frauen mit LOH signifikant schlechtere Überlebenszeiten (Okada et al., 2012).

Wei veröffentlichte 2005, dass Tumoren mit einer Methylierung im BRCA1-Gen mit geringeren Kopienanzahlen dieses Gens assoziiert sind. Bislang wurde aber nicht untersucht, ob eine Methylierung auch bei TNBCs mit LOH assoziiert ist (Wei et al., 2005).

Wie sich die Promotormethylierung auf die Prognose der tripel-negativen Frauen auswirken könnte, wurde in den zuvor zitierten Studien von Xu und Ignatov untersucht. Beide kamen zu einem ähnlichen Ergebnis, nämlich dass tripel-negative Tumoren mit Methylierung mit besseren Überlebenszeiten assoziiert sind. Bei nicht-TNBCs und den TNBCs ohne Chemotherapie wurde in diesen Untersuchungen keine Assoziation zwischen Methylierung und Überleben gefunden.

Basierend auf diesem Hintergrund ergaben sich für das tripel-negative Kollektiv folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

2.7. Fragestellungen der Arbeit

Durch die Analyse eines größeren Kollektivs von tripel-negativen Tumorproben sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- Wie hoch ist der Prozentsatz der Methylierungsereignisse und LOHs unter den tripel-negativen Mammakarzinomen?
- Welche klinischen Faktoren haben Einfluss auf die Prognose der TNBCs?
- Können klinische Faktoren definiert werden, die auf eine Methylierung der Promotorregion des BRCA1-Gens hinweisen?
- Gibt es eine Assoziation von LOH des BRCA1-Gens und einer Hypermethylierung im Kollektiv der tripel-negativen Mammakarzinome?
- Wie wirkt sich eine solche epigenetische Veränderung in der Tumorzelle auf den Therapieverlauf aus?

3. Material und Methoden

Im vorhergegangenen Kapitel wurden die Fragestellungen dieser Arbeit erläutert. Um diese zu beantworten, wurden insgesamt 176 DNA-Proben von Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom auf Methylierung und Gendosisveränderung untersucht. Die verwendeten Materialien und Methoden werden in diesem Kapitel beleuchtet.

3.1. Material

3.1.1. Das Patientenkollektiv

Das Brustkrebsgewebe der tripel-negativen Karzinome wurde in dem Zeitraum zwischen 1999 und 2009 in verschiedenen deutschen Zentren durch Tumorextraktion im Rahmen der Brustkrebstherapie gewonnen und in der gynäkologischen Abteilung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München in flüssigem Stickstoff gelagert. Alle Patientinnen haben sich im Vorhinein damit einverstanden erklärt, dass ihr Tumorgewebe dort aufbewahrt und zu Forschungszwecken verwendet werden dürfe.

Eingeschlossen wurden alle Mammakarzinomproben, die als tripel-negativ klassifiziert worden waren, also alle die nach dem Remmele-Score $\leq 3/12$ Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus aufwiesen und gleichzeitig Her2/Neu 0 oder 1+ klassifiziert waren. Das ergab ein Kollektiv von 176 DNA-Proben. Sechs Proben mussten im Nachhinein von der Auswertung ausgeschlossen werden. Darunter waren zwei, die in einer erneuten Hormonrezeptorstatusbestimmung doch nicht tripel-negativ waren und drei, die neoadjuvant behandelt worden sind und damit die DNA durch die vorangegangene Chemotherapie möglicherweise schon Schaden genommen hatte. Eine Probe wurde ausgeschlossen, weil die DNA aus Metastasengewebe gewonnen wurde, also nicht dem Primärtumor zugehörig war. Für die Auswertung stand somit ein Kollektiv von 170 nicht-neoadjuvant behandelten, primären Mammakarzinomen zur

Verfügung. Durch die Pathologen des Krankenhauses wurden die Gewebe histologisch klassifiziert. Um den Anteil des Normalgewebes in der DNA-Probe möglichst gering zu halten, wurde durch Makrodetektion ein Teil des Tumors gewonnen und anschließend die DNA aus den Kernfraktionen isoliert. Durch dieses Verfahren hatte jede Probe eine variable DNA-Konzentration, die durch Verwendung des NanoDrop Spectralphotometer Peqlab, Erlangen bestimmt wurde.

3.1.2. Die klinischen Daten

Die klinischen Daten unserer Patientinnen, wie Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße etc., die für die Prüfstatistik von Bedeutung waren, durften freundlicherweise der Mammakarzinom-Datenbank des Klinikums rechts der Isar in München entnommen werden.

3.1.3. Das analysierte DNA-Fragment

Analysiert wurde ein 103bp langes DNA-Fragment in der Promotorregion des BRCA1-Gens, das über den Start der mRNA, der in der Genbanksequenz U37574 bei 1581bp liegt, hinausgeht. Die Primer (siehe

Bisulfit modifizierte DNA-Sequenz aus der Genbank U37574

```

1441 GAGTTTCGAG AGACGTTTGG TTTTTTTTGT TTTTTTTATT TTTTGATTGT ATTTTGATTT
      -78bp                -55bp                -37bp      -29bp      -21bp
1501 CGTATTTTGA GAGGTTGTTG TTTAGCGGTA GTTTTTTGGT TTTCTGGTA ACGGAAAAGC
      >>>>>>> forward Primer >>>>>
      -19bp                +8bp      +14/16bp +19bp      +27bp
1561 GCGGGAATTA TAGATAAATT AAAATTGCGA TTGCGCGCG TGAGTTCGTT GAGATTTTTT
      L>START mRNA
      +44bp                +75bp
1621 GGACCGGGGA TAGGTTGTGG GGTTTTTTAG ATAAATTGGGT TTTTGCGTTT AGGAGGTTTT
      << <<<<<<<<<<<Reverse Primer << <<<<
1681 TATTTTTTGT TTTGGGTAAA GGTAGTAGAG TTTCGGGAAA GGGATAGGGG GTTTAAGTGA
  
```

Abb. 3: Bisulfit-modifizierte Promotorsequenz des BRCA1-Gens. Start der mRNA (rot) liegt bei Base 1581. Die Stellen, an die die verwendeten Primer binden wurden gelb markiert, die CpG-Inseln mit möglicher Methylierung wurden blau hinterlegt.

Tabelle 1) wurden so gewählt, dass sie möglichst viele CpG-Inseln der Promotorregion erfassen. Der Vorwärts-Primer bindet an der Bisulfit-modifizierten DNA an den Basen von -56 bis -78 vom Transkriptionsstart aus gezählt, der Rückwärts-Primer in der Region von +49 bis +75bp. In diesem Bereich befinden sich 11 CpG-Dinukleotide, die eine Methylierung aufweisen können, was in Abbildung 3 zu sehen ist.

3.1.4. Primer

Die BRCA1 Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion aus Martinsried, Deutschland bezogen. Sie wurden so gewählt, dass sie an der Bisulfit-modifizierten DNA im Bereich der Promotorregion des Gens binden und in der PCR eine starke Bande ergeben.

Die M13 Primer, die für die Klonierung verwendet wurden, waren Bestandteil des TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen. In Tabelle 1 sind die Primer mit den entsprechenden Sequenzen aufgeführt.

Tab. 1: Verwendete Primer und deren Sequenz

Primer	Sequenz
BRCA1_meth for2	5´-TAT TTT GAG AGG TTG TTG TTT AG-3´
BRCA1_methrev	5´ - TAT CTA AAA AAC CCC ACA ACC TAT C- 3´
M13 forw	5´ - GTA AAA CGA CGG CCA G-3´
M13 rev	5´ - CAG GAA ACA GCT ATG AC-3´

3.1.5. Molekularbiologische Kits

Die molekularbiologischen Kits der folgenden Tabelle wurden zur Durchführung der Versuche verwendet. Dabei wurde stets streng nach den Herstellerangaben verfahren.

Tab. 2: Verwendete molekularbiologische Kits mit Herstellerangaben.

Kit	Hersteller
BigDye Terminator v 1.1.Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems by life technologies, Carlsbad, USA
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
EpiTect HRM PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Salsa MLPA Kit	MRC-Holland, Amsterdam, Niederlande
TOPO TA Cloning kit	Invitrogen by life technologies, Hamburg, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
DNA Methylation EIA Kit	Cayman Chemical Company, Michigan, USA

3.1.6. Geräte

In folgender Tabelle werden die Gerätschaften, die bei der Durchführung der Versuche verwendet wurden, inklusive der Hersteller gelistet.

Tab. 3: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben

Geräte	Hersteller
ABI PRISM Sequencer 3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Biofuge pico	Heraeus, Osterode, Deutschland
Feinwaage	Kern, Balingen Deutschland
Gel Dokumentationssystem UV solo Gelelektrophorese Apperatur Power Supply	Biometra, Göttingen, Deutschland
Light Cycler® 480 Roche	Consort, Turnhout, Belgien Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Multifuge 3L-R Thermo Scintific	Heraeus, Osterode, Deutschland
Nanodrop Spectralphotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research, Massachusets USA
Vortex Mixer VM-300	Migge, Heidelberg, Deutschland
Thermoshake TH05	Gerhardt, Königswinter, Deutschland

3.1.7. Chemikalien

In Tabelle 4 werden die verwendeten Chemikalien und Reagenzien sowie deren Hersteller angeführt.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben

Chemikalien, Reagenzien	Hersteller
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Diaco, Triest, Italien
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DNA Molekular Weight Marker V	Rouch Diagnostics, Mannheim, Deutschland
dNTP Set 100mM Solution	Fermentas GmbH, Leon-Rot, Deutschland
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	
Ethanol 100%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid 1mg/ml	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Orange G	Carl Roth + Co KG Karlsruhe, Deutschland
PeqGold Universal Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH Erlangen, Deutschland
Titripelx® III (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylencyanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

3.1.8. Lösungen, Puffer, Medien

Tabelle 5 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Lösungen, Puffer und Medien. Es wird jeweils die Herstellungsweise mit aufgeführt.

Tab. 5: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien mit dem jeweiligen Herstellungsverfahren

Lösungen, Puffer, Medien	Herstellung
Auftragspuffer	200mg Ficoll (25%), 10ml TE Puffer, Bromphenolblau, orange, grün, Verdünnung der Stammlösung mit TE Puffer auf 1:5
Ethanol 77%	39ml Alkohol 100%, 50ml Aqua dest.
dNTP-Lösung	4µl dATP, 4µl dGTP, 4µl dCTP, 4µl dTTP wurden in 186µl dH ₂ O gelöst, Lagerung bei -20 °C
Elektrophoresegel	75g Agarose, 60 ml TE Puffer, 15µl Ethidiumbromid
IPTG-Stocklösung (Isopropyl-β-D-Thiogalctosidase; 100 mM),	238 mg IPTG wurden in 10 ml dH ₂ O gelöst, steril gefiltert und in 1 ml Aliquots bei -20 °C gelagert
Längenstandard	100µl DNA molecular weight Marker V, 150µl TE Puffer, 1800µl Auftragspuffer, Lagerung der Aliquots bei -20°C.
LB-Medium	10g NaCl, 10g Tryptone, 5g Select Yeast Extract mit H ₂ O auf 1000ml auffüllen
SOB-Medium	5g Hefeextrakt, 20g Trypton, 0,6g Natriumchlorid, 0,2g Kaliumchlorid, mit H ₂ O auf 1000ml auffüllen, autoklavieren und vor Gebrauch dem Nährmedium je 10mM Magnesiumchlorid und Magnesiumsulfat

	zugegeben. pH 7,0
SOC-Medium	SOB-Medium, 20mM Glucose
10x TBE-Puffer	510g Tris-Base, 275g Borsäure, 372gEDTA, pH 8,0 mit H ₂ O auf 5000 ml auffüllen
TE-Puffer	10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7,4
50x TEA-Puffer	242g Tris-Base, 57,1ml Essigsäure, 100ml EDTA pH 8,0 mit H ₂ O auf 1000ml auffüllen
X-Gal-Stocklösung (40mg/ml)	(5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- Galaktosidase, 40 mg/ml in DMF) 400 mg X-Gal wurden in 10 ml Dimethylformamid gelöst, Lagerung in einem lichtundurchlässigen Gefäß bei -20 °C

3.1.9. Bakterien

Für die Klonierung der DNA wurde der in folgender Tabelle angeführte Bakterienstamm verwendet.

Tab. 6: Verwendeter Bakterienstamm mit Herstellerangabe

Bakterium	Hersteller
One Shot TOP10F⁺ Chemically Competent E.Coli	Invitrogen by life technologies, Hamburg, Deutschland

3.1.10. Enzyme

Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Rahmen verschiedener Versuche wurde das in Tabelle 7 gelistete Enzym verwendet.

Tab. 7: Verwendetes Enzym

Enzym	Hersteller
AmpliAq Gold® DNA Polymerase	Applied Biosystems, California, USA

3.1.11. Verbrauchsmaterial

Materialien, die bei der täglichen Laborarbeit verbraucht werden, sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Tab. 8: verwendetes Gebrauchsmaterial inklusive Herstellerangaben

Material	Hersteller
LC®480 Multiwell Platte 96	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
LC®Sealing Folie	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Microseal A Film	Biozym Scientific GmbH Deutschland Obendorf
Microtubes 1,5 µl	Sarstedt AG&Co Deutschland Nümbrecht
Multiply®Pro Gefäß 0,5ml	Sarstedt AG&Co Deutschland Nümbrecht
MultiScreen®FilterPlates Millipore	Millipore, Carrigtwohill, Ireland
PCR-Softstrips 0,2ml farblos	Biozym Scientific GmbH Deutschland Obendorf
Pipetten, Pipet lite Rainin(10µl, 100µl, 1000µl)	Mettler-Toledo GmbH, Deutschland Gießen
Pipettenspitzen (1000µl, 200µl, 100µl, 10µl) ungestopft, RNase free	Sarstedt AG&Co Deutschland Nümbrecht
Pipettenspitzen (10µl, 200µl) gestopft	Biozym Scientific GmbH Deutschland Obendorf
Thermowell 96 Well Plate Model (P)	Corning Incorporated, Netherlands

3.2. Methoden

3.2.1. Bisulfit-Konvertierung und Aufreinigung der DNA

Bei der Bisulfitkonversion reagieren unmethylierte Cytosinbasen durch Behandlung des DNA-Einzelstranges mit Natrium-Bisulfit zu Uracil, wobei eine Methylierung die Basen vor der Reaktion schützt, und so das vorhandene Cytosin bestehen bleibt (Shapiro and Weisgras, 1970; Wang et al., 1980). Die chemische Reaktion, bei der Cytosine zu Uracil konvertiert werden, ist in Abbildung 4 dargestellt.

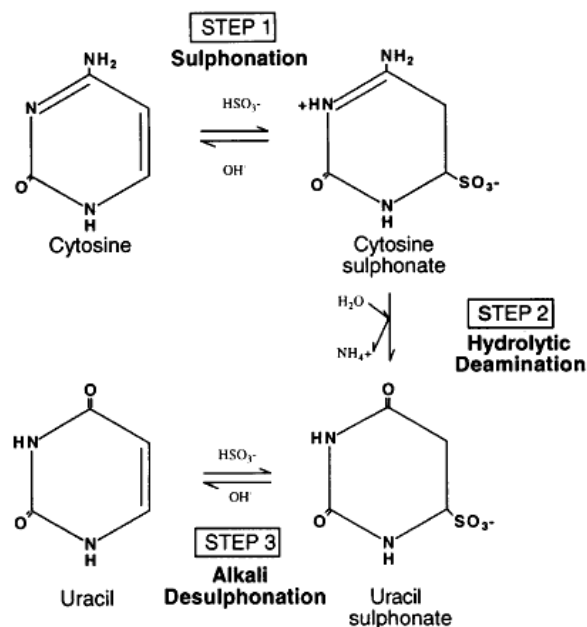


Abb. 4: Schematische Darstellung der Konvertierungsreaktion durch Natriumbisulfit. Zuerst kommt es zu einer Addition von Bisulfit an die 5-6 Doppelbindung des Cytosins. Durch hydrolytische Desaminierung im Schritt 2 wird das Cytosin-Bisulfit-Derivat zu einem Uracil-Bisulfit-Derivat. Zuletzt wird das Molekül desulphoniert, was es zu Uracil macht (Clark et al., 1994).

Auf diese Art und Weise wird die epigenetische Information Methylierung in eine genetische Information übersetzt. Durch eine Sequenzanalyse kann nun der Methylierungszustand der DNA ermittelt werden.

Die Bisulfitkonvertierung der DNA wurde mithilfe des EpiTect Bisulfit Kits der Firma Qiagen durchgeführt, wobei den Anweisungen des mitgelieferten Handbuchs Folge geleistet wurde.

500ng DNA wurden bis zu einem Gesamtvolumen von 20µl mit DNA/RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Dazu wurden 85µl Bisulfit Mix und 35µl DNA Protect Puffer pipettiert, kurz durch den Vortexrüttler gemischt und danach mit folgendem Programm in den PCR-Block (PTC-200 Thermo Cycler, MJ Research) gegeben: 5 min Denaturierung bei 95°C, 25 min Inkubation bei 60°C, 5 min Denaturierung bei 95°C, 85 min Inkubation bei 60°C, 5 min Denaturierung bei 95°C, 175 min Inkubation bei 60°C, danach 20°C bis zur Entnahme der Proben.

Die Aufreinigung der bisulfitbehandelten DNA erfolgte ebenfalls nach den Anweisungen des Handbuchs. Dazu wurden die Proben kurz zentrifugiert und in 1.5ml Eppendorfgefäße umpipettiert und nach Zugabe von 560µl des Puffer BL gevortext und nochmals kurz zentrifugiert. Die Ansätze wurden dann jeweils in ein EpiTect *spin column* (Qiagen) übertragen und 1min bei maximaler Geschwindigkeit in der Biofuge pico der Firma Heraeus zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Auffangteil des *spin columns* wurde nach jedem nun folgenden Schritt verworfen. Nach Zugabe von 500µl Puffer BW wurde wieder 1 min lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, dann 500µl Puffer BD dazugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Minute Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit wurden noch zweimal hintereinander 500µl Puffer BW dazugegeben und wieder 1 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert.

Die offenen *spin columns* wurden in saubere 1,5 ml Röhrchen gestellt und 5 min bei 56°C inkubiert. Die Elution der DNA erfolgte in 2 Schritten: Zuerst 20µl Puffer EB in die Mitte der Membran geben und 1 min bei 12.000 rpm zentrifugieren. Danach nochmals 20µl Puffer EB dazupipettieren und bei 13.000 rpm, also bei maximaler Geschwindigkeit, noch einmal 1 min zentrifugieren.

Die so gewonnenen bisulfitkonvertierten und gereinigten 40µl DNA wurden in eine 20µl und zwei 10µl Portionen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2. Herstellung einer 100% methylierten Kontroll-DNA

Um die Sensitivität der Methylierungsanalyse, also die Fähigkeit des Lightcyclers, methylierte von unmethylierter DNA im Hintergrund zu unterscheiden und nicht zuletzt, um semiquantitativ den Methylierungsgrad der zu untersuchenden Proben abzuschätzen, wurde vor der Analyse der unbekanntenen Proben eine 100% methylierte DNA nach folgendem Verfahren hergestellt:

In einem 0.2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde 1µg DNA einer gänzlich unmethylierten Probe, was zuvor durch eine Sequenzanalyse (siehe unten) bestätigt wurde, mit 3µl SAM (1:10 verdünnt), 1µl Methylase (1:4 verdünnt), 2µl 10* NE und so viel Wasser versetzt, dass der Gesamtansatz ein Volumen von 20µl hatte.

Nach 4h Inkubation des Ansatzes im PCR-Block bei 37°C wurden 3µl SAM dazugegeben und erneut 4h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde nochmals 3µl SAM und 1µl Methylase (1:4 verdünnt) hinzugefügt und bei 37°C über Nacht in der Maschine belassen. Am nächsten Morgen wurde die Probe 20min lang bei 65°C hitzeinaktiviert.

Mit dieser vollmethylierten DNA wurde durch Zugabe von unmethylierter DNA derselben Probe eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 100%, 50%, 25%, 12.5%.

3.2.3. Methylierungsanalyse mit Hilfe des *Lightcycler 480 Systems*

3.2.3.1. Allgemeine Informationen zur *High-Resolution Melting* Analyse

Der *Lightcycler 480* ist ein vielseitiges Gerät für molekulare Analysen. Eine Funktion ist die *High-Resolution Melting* Analyse. Dies ist ein Verfahren,

welches im Anschluss an eine PCR Schmelzeigenschaften der DNA nutzt, um Sequenzunterschiede zu detektieren.

Zuerst wird die bisulfitbehandelte DNA amplifiziert, wobei Primer verwendet wurden, die an unmethylierte DNA binden. Die Primer waren deshalb so ausgesucht, dass sie außerhalb der CpG-Inseln liegen.

Nach der Amplifikation der DNA erfolgt die Schmelzkurvenanalyse, welcher das Prinzip zugrunde liegt, dass bei der vorher durchgeführten Bisulfitreaktion die unmethylierten Cytosinbasen in Uracil umgeschrieben wurden und nun in der PCR mit Adenin gepaart wurden und nicht wie in der methylierten DNA Cytosin mit Guanin.

Die unterschiedlichen Schmelzkurven der methylierten und unmethylierten DNA kommen nun dadurch zustande, dass Adenin und Uracil (bzw. Thymin) nur 2 Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, wohingegen Cytosin und Guanin 3 dieser Bindungen eingehen. Daher schmilzt die unmethylierte bisulfitbehandelte DNA, also ohne Cytosin, schon bei niedrigeren Temperaturen als die mit Methylierungen.

Um diesen Prozess zu verfolgen, werden fluoreszierende, DNA interkalierende Farbstoffe verwendet, die nur an doppelsträngiger DNA binden. Schmilzt der Doppelstrang auf, können die Farbstoffmoleküle sich nicht mehr anlagern und damit nimmt das Fluoreszenzsignal stark ab.

3.2.3.2. Der LC480 Ansatz

Für die Analyse im *Lightcycler* wurde jede Probe doppelt angelegt, jeweils ein Leerwert dazu genommen, um Kontamination auszuschließen, und die oben beschriebene Reihe an Positivkontrollen (100%, 50%, 25%, 12,5%, unmethyliert) mitgeführt.

In eine *Lightcycler 480 Multiwell Plate 96* (weiß) wurden die einzelnen Komponenten der Reaktion pipettiert.

Je Probe wurden 12,5µl EpiTect HRM Mastermix (Qiagen), 1µl *forward* Primer (10µM), 1µl *reverse* Primer (10µM) 7,5µl Wasser und 3µl DNA mit einer Konzentration von 12,5ng/µl, also einem Gesamtvolumen von 25µl

in die Platte pipettiert, anschließend mit einer *LightCycler 480 sealing foil* bedeckt, in den *Lightcycler* gestellt und der Lauf unter folgenden Bedingungen gestartet:

Das Reaktionsvolumen beträgt 25µl, Präinkubation 10min bei 95°C, Amplifikation in 55 Zyklen jeweils 10s bei 95°C, 15s bei 64°C und 20s bei 72°C, für die Schmelzkuvenanalyse 1 min bei 95°C gefolgt von 1 min bei 40°C und 1s bei 65°C.

Die resultierenden Schmelzkurven wurden in dem Analyseprogramm des *Lightcyclers* einer Normalisierung unterzogen.

3.2.4. Direkte Sequenzanalyse nach Sanger

Um die Resultate der LightCycler-Untersuchung zu verifizieren, wurden stichprobenartig Sequenzanalysen der bisulfitbehandelten DNA durchgeführt.

Gearbeitet wurde mit dem *Sequencer 3130xL Genetic Analyzer* von *Applied Biosystems* (Darmstadt, Deutschland), der nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger die Basenabfolge der DNA untersucht. Dafür wurde zuerst eine PCR in 0,2ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt:

6µl der bisulfitkonvertierten DNA mit einer Konzentration von 12,5ng/µl wurden versetzt mit 5µl 10x PCR Puffer, 5µl dNTPs (8mM), 2µl Magnesium (25mM), 2µl Primer forw. (10µM), 2µl Primer rev. (10µM), 27.6µl Aqua dest., 0,4µl TaqPolymerase (2,5U/µl) (*AmpliTaq Gold*, *Applied Biosystems*). Im *Thermalcycler* lief die PCR unter folgenden Bedingungen ab: (1) 95°C für 5 min, (2) 95°C für 30s, (3) 55°C für 30s, (4) 72°C für 45s, 50 Zyklen ab Schritt (2), danach 5 min auf 72°C und 10°C bis zur Entnahme der Proben. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese in 1,5%igem Agarosegel in TAE-Puffer aufgetrennt und mit dem *UV-Solo* von *Biometra* detektiert. Mit den Proben, die eindeutige PCR-Banden bei ca. 150bp gezeigt haben, wurde die Sequenzanalyse fortgeführt.

Die PCR-Produkte wurden mit 120µl Aqua dest. über eine *MultiScreen Filter Plate* gereinigt. Mit 30µl destilliertem Wasser wird die nun getrocknete und gereinigte DNA rückgelöst.

Für das *Cyclin* wurde 8µl der so gewonnenen DNA mit 1,7µl BigDye und 0,4µl Primer forw. in eine PCR-Platte gegeben. Die Reaktion lief im *Thermalcycler* unter folgenden Bedingungen ab: 30s bei 95°C, 15s bei 52°C, 4 min bei 60°C, diese drei Schritte 27-mal wiederholen und schließlich 10 min bei 10 °C halten.

Für das Fällern wurden 125µl von 77%igem Alkohol zu jeder Probe gegeben und 20 min lang inkubiert. Dann wurde in der Multifuge 3L-R, Heraeus, Osterode, 30min bei 3000g zentrifugiert, 100µl vom 77%igem Ethanol dazugeben und nochmals 10 min bei 3000g zentrifugiert. Danach wurde bei 600g 1 min lang umgedreht zentrifugiert. Mit 80µl Wasser wurde die DNA wieder aufgelöst.

In eine *Sequencing plate* wurden 1,5µl DNA und 28,5µl Aqua dest. pipettiert und in den Sequenzer platziert.

Für jede Probe müssen die Bedingungen angegeben werden: Application: Sequencing Analysis, Results Group : Sequencing, Instr.-Prot.1: Seq-E-V1-IPS1, Analys.Prot.: SEQANAL-BDV1.1

3.2.5. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, mit dem man Moleküle entsprechend ihrer Größe und Ladung auftrennen kann. Unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes wandern negativ geladene Teilchen, wie beispielsweise DNA, in einem Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt, Richtung Anode, positive Moleküle analog dazu zur Kathode. Das Gel wirkt als Molekularsieb, wobei kleine Teilchen schneller und damit in einer bestimmten Zeit auch weiter durch das Gel laufen, als große.

Die Durchwanderungsgeschwindigkeit hängt von mehreren Faktoren ab. Zum einen von der Größe, der Konformation und der Ladung der Moleküle, aber auch von der Porengröße des Agarosegels und schließlich noch von der angelegten Spannung.

Gleich große Fragmente bilden Banden, die mit dem im Gel befindlichen, DNA-interkalierenden Ethidiumbromid, unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können.

Zur Herstellung des Gels wurden 1,5g Agarose auf 100ml TAE-Puffer gegeben, in einem Erlenmeyerkolben durch Aufkochen gelöst und nach Zugabe von 3µl Ethidiumbromid, der Kolben so lange geschwenkt, bis sich das Ethidiumbromid verteilt hat und dann in Gelkammern mit Taschenkämmen gegossen. Nach Auskühlen des Gels wurde es in die Elektrophoreseapparatur gegeben und mit TAE-Puffer bedeckt.

Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 7µl Auftragspuffer versetzt, um ein Auswaschen der Probe aus den Kammern zu verhindern und um die Lauffront der DNA direkt verfolgen zu können. In jede Tasche des Gels wurden 10µl der zu analysierenden Probe gegeben und unter einer Spannung von 120 Volt und einer Stromstärke von 100mA 20 min lang laufen gelassen. Zusätzlich wurde eine Tasche mit einem DNA-Längenstandart, bei dem die Größe der einzelnen Fragmente bekannt ist, versehen, um hinterher die Größe der zu untersuchenden Fragmente abschätzen zu können. Am Ende wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer genommen und die Banden im *UV-Solo* von Biometra mit UV-Licht detektiert.

3.2.6. Klonierung

3.2.6.1. Prinzip

Mit der Klonierung kann man DNA-Fragmente, die in einer PCR hergestellt wurden, in Plasmidvektoren einbringen und durch bakterielle Vermehrung vervielfältigen.

Die *TaqPolymerase* addiert während der PCR an das 3'-Ende des entstandenen DNA-Strangs ein überhängendes Desoxyadenosin (A). Der hier verwendete linearisierte Vektor hat an seinem 3'-Ende einen Basenüberhang aus einem Desoxythymidin (T). Diese komplementären Enden ermöglichen, nach dem Prinzip der *sticky-ends*, den Einbau des

DNA-Fragments in den Vektor. Die Topoisomerase I aus dem Vaccinia-Virus bindet an Doppelstrang-DNA und ligiert die überhängenden Basenpaare spezifisch nach einer 5'CCCTT-Sequenz, die Teil des Vektors ist. Die Topoisomerase I ist kovalent an das 3'Phosphat des Vektors gebunden. Diese Bindung wird durch einen 5'-Hydroxylrest des DNA-Fragments attackiert, wodurch die Topoisomerase die Vektor-DNA freigibt und somit das DNA-Fragment mit dem Vektor ligiert.

Für die Klonierung wurde das TOPO TA Cloning System von Invitrogen verwendet, welches sich vor allem durch ein einfaches Protokoll und eine hohe Transformationseffizienz auszeichnet. Als Vektor wird hier das Plasmid pCR2.1-TOPO verwendet und in die kompetenten Zellen, Escherichia coli (E.coli) TOP10F', transformiert.

3.2.6.2. Herstellung der Agar-Platten

5g Tryptone, 2,5g Hefeextrakt, 5g NaCl mit 500ml Aqua dest. wurden in einem Erlenmeyerkolben vermischt, in 2 Kolben a 250ml aufgeteilt, damit der Agar beim Autoklavieren nicht überkocht, und autoklaviert. Pro 250ml Medium wurden 500µl Ampicillin (25µg/µl) und 10µl IPTG (100mM) und 250µl x-gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) (40mg/ml) in Dimethylformamid dazugegeben, 6-7 Platten gegossen und über Nacht trocknen gelassen.

3.2.6.3. Durchführung der Klonierung

Die Anwendung des *TOPO TA Cloning Kits* erfolgte streng nach den Anweisungen des Herstellers Invitrogen.

Für die Herstellung des Ligationsansatzes wurden 4µl frisches PCR-Produkt, 1µl Salt-Solution und 1µl Topo-Vektor in ein Eppendorfgefäß pipettiert, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach auf Eis gestellt.

Für die Transformation, bei der die DNA in die Wirtszellen eingebracht wird, wurden die kompetenten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, je 3µl des Ligationsansatzes dazugegeben, vorsichtig gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. In diesem Schritt lagern sich die Plasmide an die Bakterienwand an. Anschließend setzte man die Bakterien für 30s in einem 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock aus, der die Zellmembran für die Plasmide permeabel macht. Mit einer abgeschnittenen 1000µl Pipettenspitze wurden die Bakterien in sterile, mit 250 µl SOC-Medium versetzte Falconröhrchen umpipettiert, danach wurden die Falconröhrchen verschlossen und 60 min bei 37°C und 200rpm geschüttelt. Mit jeder Probe wurden 2 Agarplatten beimpft, eine mit 200µl und eine weitere mit 50µl. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

3.2.6.4. Selektion mittels Blau/Weiß-Screening

Die Selektion der transformierten Bakterienklone erfolgte mithilfe des traditionellen Blau/Weiß Screenings, welches auf folgendem Prinzip beruht:

Auf dem Vektor ist eine β -Galaktosidase kodiert, die das im Medium befindliche x-Gal umsetzt. Bei dieser Umsetzung entsteht ein blauer Farbstoff. Die erfolgreiche Insertion des DNA-Fragments zerstört den Leserahmen der β -Galaktosidase und damit die Entstehung des blauen Farbstoffs. Ein positiver Transformant ist also weiß, weil das *lac*-Gen durch den Einbau der DNA unterbrochen wurde, die Klone, die das Fragment nicht aufgenommen haben, sind blau (siehe Abbildung 5).

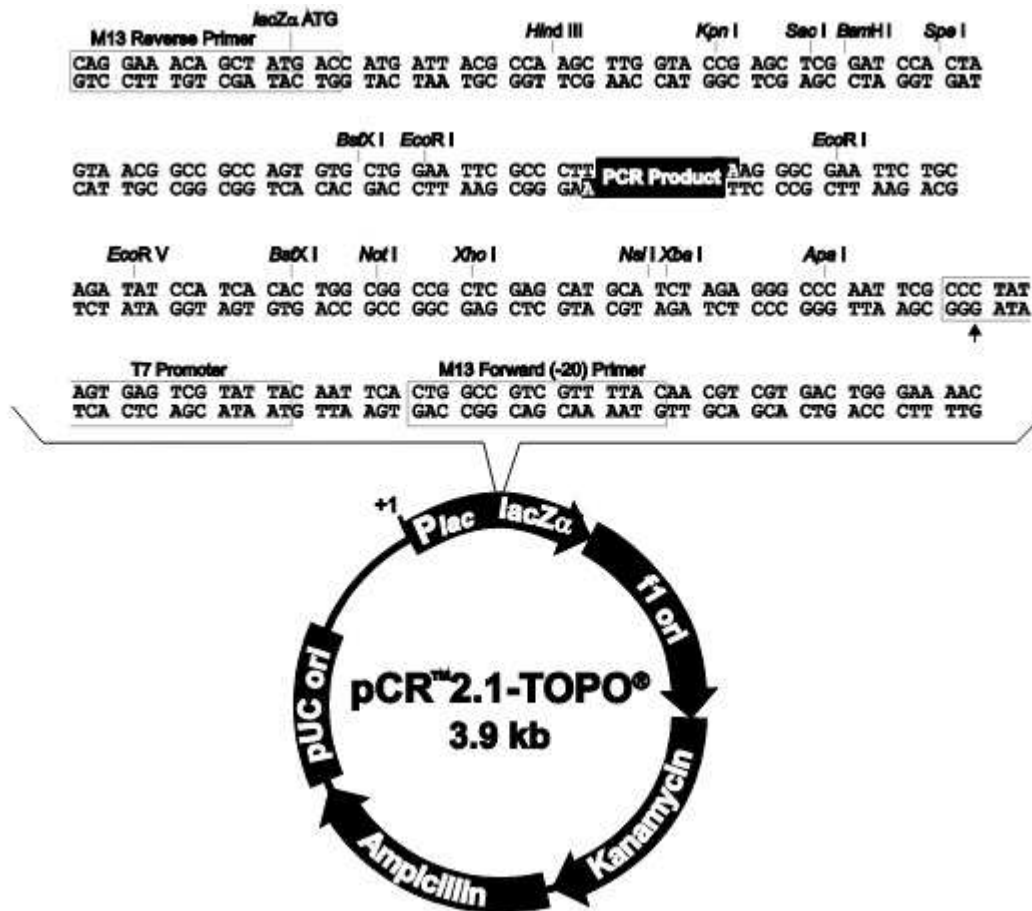


Abb. 5: **Aufbau des Plasmidvektors pCR 2.1.** Der Vektor enthält das für die Galaktosidase kodierende lacZ Gen, sowie Resistenzgene für Ampicillin und Kandamycin (invitrogen, Instruction manual, version U)

Von den weißen Klonen wurden 20-26 Stück pro Probe gepickt und in mit 200µl Aqua dest. gefüllte Eppendorfgefäße gegeben. Bei 95°C wurden sie 10 min im Thermalcycler denaturiert.

Es folgte nun eine Sequenzanalyse der einzelnen Proben mit dem oben beschriebenen Verfahren zur Sequenzanalyse, jedoch mit einem leicht modifizierten PCR-Ansatz: bei einem Gesamtvolumen von 30µl wurden jeweils 3µl Puffer und dNTPs (8mM), 1,2µl Magnesium (25mM), je 1,2µl M13 Primer forw. und rev. (10µM), 17µl Aqua dest., 0,4µl AmpliTaq Gold (2,5U/µl) und 3µl der denaturierten DNA unbekannter Konzentration in eine PCR-Platte pipettiert und unter folgenden Bedingungen laufen gelassen:

10 min bei 95°C, dann 30 sek bei 95°, gefolgt von 30 sek bei 59° und 45 sek bei 72°. Die Schritte 2-4 (von 30 sek bei 95° bis 45 sek bei 72°) wurden 35 mal durchgeführt und anschließend 10 min auf 72° aufgeheizt, um im letzten Schritt 15 min auf 12° abzukühlen.

Mittels Gelelektrophorese (siehe oben) wurden die Banden detektiert, die 400-450 bp lang sind. Mit diesen Proben wurde die Sequenzanalyse nach obigem Schema fortgesetzt.

3.2.7. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

3.2.7.1. Prinzip der MLPA-Analyse

Die MLPA-Analyse ist eine Methode zur Detektion von Kopienanzahlveränderungen von bis zu 50 verschiedenen DNA-Fragmenten in einem Ansatz. In einer Multiplex-PCR erfolgt die gleichzeitige Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Längen zwischen 100 und 500 bp, die nachher in einer Kapillarelektrophorese separiert und quantifiziert werden können.

Grundlegend für die MLPA-Technik ist, dass nicht die Proben-DNA amplifiziert wird, sondern spezielle Sonden, die an die zu vermehrenden DNA-Abschnitte gebunden haben.

Pro DNA-Fragment binden zwei Oligonukleotide, die als Sondengemisch vorliegen, im Bereich der Zielsequenz. Falls die Sondenhybridisierung erfolgreich war, verbindet im nächsten Schritt eine Ligase die beiden Sondenanteile miteinander. In der nachfolgenden PCR werden nur die Sonden amplifiziert, bei denen es zu einer Hybridisierung und Ligation gekommen ist. Die Primersequenz ist bei jeder Sonde eines Sondengemischs die gleiche und als Linker an die spezifische Sondensequenz angehängt. Die PCR-Produkte eines Sondengemisches unterscheiden sich in ihrer Länge, da jede Sonde zusätzlich zur Primersequenz eine Füllsequenz, die sogenannte Stuffer-Sequenz aufweist, die für jede Sonde unterschiedlich lang ist (Schouten et al., 2002). Das Funktionsprinzip der MLPA-Technik ist in Abbildung 6 dargestellt.

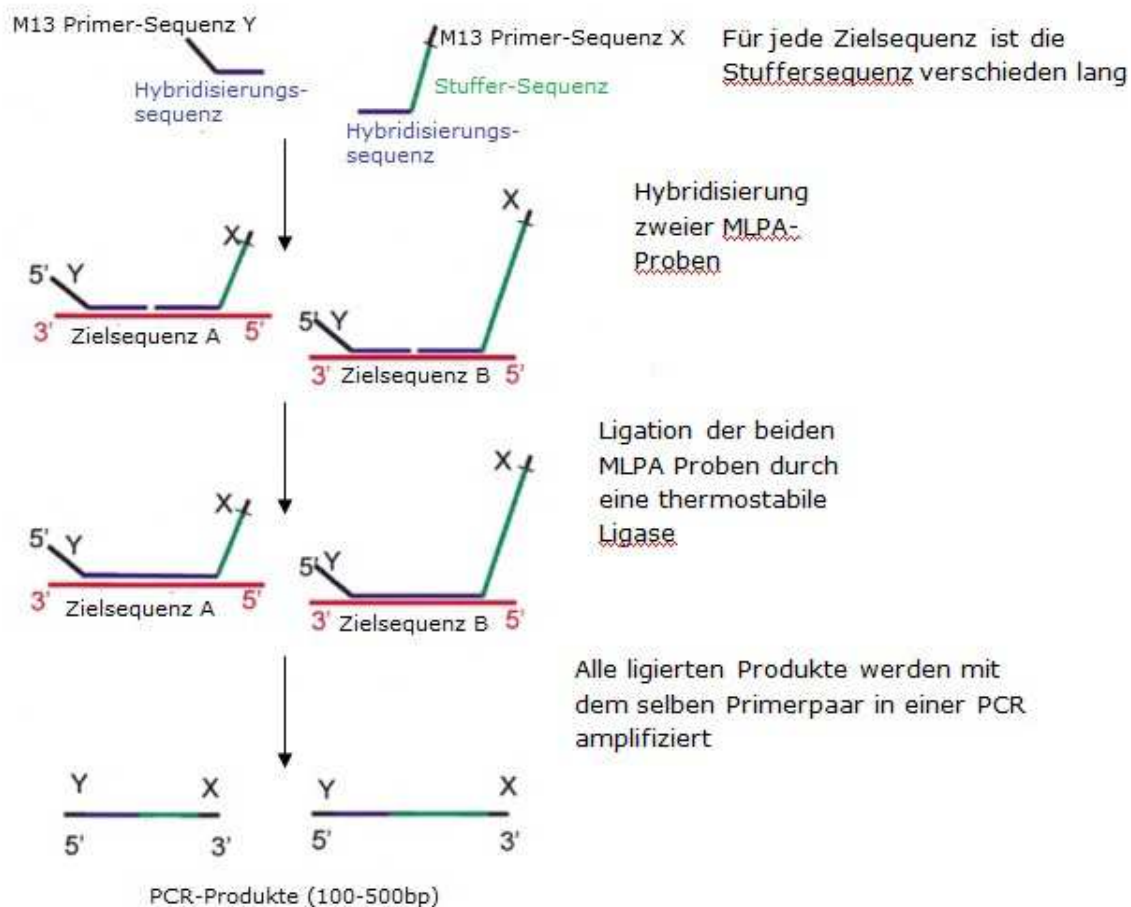


Abb. 6: Funktionsprinzip der MLPA. Zunächst erfolgt die Hybridisierung der forward und reverse Primer an die jeweilige Zielsequenz. Im nächsten Schritt werden direkt benachbarte MLPA-Proben durch eine thermostabile Ligase verknüpft. Hat eine Ligation stattgefunden, wird in der folgenden PCR das MLPA-produkt amplifiziert. Da für jede Zielsequenz die Stuffersequenz unterschiedlich lang ist, können im Anschluss die PCR-Produkte in einer Kapillarelektrophorese der Fragmentlänge nach aufgetrennt werden (verändert nach Schouten et al., 2002).

Man verwendet fluoreszenzmarkierte M13 Primer, wodurch die Fragmente in einer Kapillarelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Mit der automatischen Analysesoftware GeneMapper4.0 kann so die Intensität der Fragmente quantifiziert werden.

3.2.7.2. Rechnerische Auswertung der Daten

Im Anschluss an die Analyse im Sequenzer erfolgt eine Verrechnung zwischen Kontroll- und Zielsequenzen sowie zwischen Kontroll- und Patientenproben.

Dosisveränderungen werden durch Reduktion oder Vergrößerung der Peakhöhen oder -flächen erkennbar.

Bei jeder Präparation wurde die DNA von 5 Kontrollproben, die aus EDTA-Blut von 5 nicht-erkrankten Probandinnen gewonnen wurde, mitgeführt. Für jedes Exon wurde der Mittelwert der Kontrollproben ermittelt und als Referenz für die zu analysierenden Tumorproben genommen, wodurch präparationsbedingte Schwankungen und Fehler eliminiert werden. Durch die Division der Peakfläche jedes Exons einer Tumorprobe durch die gemittelte Peakfläche desselben Exons der Kontrollen erhielt man den prozentualen Wert der Exonkopien im Vergleich zu den Referenzwerten.

Für die endgültige Auswertung der Deletionsanalysen wurde für jede Tumorprobe der Mittelwert der Peakflächen aller Exons errechnet und durch den entsprechenden Mittelwert der Kontrollen geteilt. Allerdings ist der Anteil des Normalgewebes, welcher in jeder DNA-Präparation aus Tumorgewebe enthalten sein kann, unbekannt, deshalb kann kein exakter Schluss auf die Deletionen im Tumor zugelassen werden. Durch Makrodissektion durch den Pathologen der Klinik, der die DNA aus den Tumoren isoliert hat, wurde der Anteil an Normalgewebe jedoch minimalisiert. Bei einer Probe, die eine Reduktion der Dosis auf 75% zeigt, kann, wenn dennoch Normalgewebe ohne Deletion mitpräpariert wurde, auch eine gravierendere Deletion des Genabschnittes im Tumor vorliegen, als die eigentliche Prozentzahl vermuten ließe. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit darauf verzichtet, eine genaue Prozentzahl der Deletion anzugeben.

3.2.7.3. Durchführung der MLPA-Analyse

Verwendet wurde das SALSA MLPA Kit für das BRCA1 Gen von MRC-Holland, Niederlande. Die MLPA-Analyse wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Kit enthält Sonden für 26 DNA-Fragmente im BRCA1-Gen und 9 Kontrollsequenzen außerhalb des BRCA1-Gens.

Jeweils 100ng einer Tumor-DNA wurde in einem 0,2 ml PCR-Gefäß mit soviel AE-Puffer versetzt, dass man ein Gesamtvolumen von 5µl erhielt. Im PCR-Block wurde die DNA 5 min bei 98°C denaturiert und vor dem Öffnen des Gerätes auf 25°C heruntergekühlt. Währenddessen wurde ein Hybridisierungs-MasterMix hergestellt, der pro Probe 1,5µl MLPA Puffer und 1,5µl probemix enthalten sollte. Nach dem Vortexen des Master-Mixes wurden jeweils 3µl davon zu jeder Probe pipettiert und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Die Inkubation erfolgte erst 1 min bei 98°C dann 16-20 Stunden bei 60°C.

Am nächsten Tag wurde für die Ligation ein Ligase Master Mix vorbereitet, der 3µl Ligase-65 Puffer A, 3µl Ligase-65 Puffer B und 25µl destilliertes Wasser enthalten sollte. Nach gründlichem Mischen durch Vortexen wurde noch pro Ansatz 1µl Ligase-65 dazugegeben und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Der PCR-Block wurde auf 54°C eingestellt und jeweils 32µl des Ligasegemischs zu jedem Ansatz gegeben. Danach erfolgte eine Inkubation bei 54° für 15 min, gefolgt von einer fünfminütigen Hitzeinaktivierung der Ligase bei 98°C und anschließender Pause bei 15°C. Für die PCR-Reaktion wurden neue 0,2ml Eppendorfgefäße beschriftet und mit jeweils 4µl SALSA PCR Puffer und 26µl destilliertem Wasser versehen. Bei Raumtemperatur wurden je 10µl des Ligationsproduktes in das entsprechende PCR-Gefäß gegeben und bei 60°C in den Thermozykler gestellt, bis der Polymerase Master Mix vorbereitet war. Dafür wurde pro Probe 2µl SALSA PCR-Primer, 2µl SALSA Enzyme dilutions Puffer, 5,5µl Wasser und 0,5µl SALSA Polymerase in einem Eppendorfgefäß vorsichtig gemischt. Davon wurden je 10µl zu den im Thermozykler befindlichen Proben gegeben und das PCR-Programm sofort gestartet:

35 mal 95°C für 30 s, 60°C für 30 s und 72°C für 60s. Am Ende folgt eine Inkubation bei 72°C für 20 min und eine Pause bei 15°C bis zur Entnahme der Proben.

Für die Analyse im Sequenzer wurden 9µl HighDye Formamid (HDF), 0,5µl ROX Längenstandart und je 1,5µl der Probe in eine PCR-Platte gegeben, mit einer entsprechenden Folie verschlossen und im PCR-Block 3min bei 95°C denaturiert und auf 4°C abgekühlt. Die kompletten 11µl wurden in die Sequenzerplatte pipettiert und der Lauf unter der *GeneMapper-Software* mit der Option Fragmentanalyse gestartet.

3.2.8. DNA-Isolation aus Blut

Mithilfe des *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen) wurde aus Blutproben von 5 freiwilligen Probandinnen DNA extrahiert, die als Negativkontrollen für die MLPA-Analyse dienten.

20µl der Qiagen-Protease wurde in ein 1,5ml Mikrozentrifugengefäß gegeben und mit 200µl EDTA-Blut gemischt. Dazu wurden noch 200µl Puffer AL pipettiert und 15s stoßweise gevortext. Der gesamte Ansatz wurde 10min bei 56°C inkubiert, kurz zentrifugiert und mit 200µl 96-100% Ethanol versetzt. Erneut wurde 15s stoßweise mit dem Vortexrüttler vermischt und kurz zentrifugiert. Der gesamte Ansatz wurde nun in ein *QIAamp Spin Column* umpipettiert und bei 8000rpm 1 min erneut zentrifugiert. Die *Spin Columns* wurden in neue *Collection Tubes* gestellt und das Filtrat verworfen. Danach wurden 500µl Puffer AW1 dazugegeben und wiederum bei 8000rpm 1min zentrifugiert. Die *Spin Columns* wurden erneut in saubere *Collection Tubes* gegeben und das Filtrat verworfen. Daraufhin wurden 500µl Puffer AW2 dazupipettiert und auf 13000rpm 3min abzentrifugiert. Um die Pufferrückstände zu eliminieren, wurde das *Spin Column* in ein neues *Collectiontube* gestellt und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit, also 13000 rpm zentrifugiert. Die *Spin Columns* wurden in sterile 1,5 ml Eppendorfgefäße gestellt, mit 200µl Puffer AE 1min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich bei 8000rpm 1 min zentrifugiert.

3.2.9. Methoden der statistischen Auswertung

Zur Beantwortung der unter Punkt 1.7 vorgestellten Fragestellungen erfolgte die statistische Auswertung dieser Arbeit mithilfe des Statistikprogramms SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Version 22.0 von IBM, die uni- und die multivariate COX-Regression der Methylierung wurde mit SAS (Statistical Analysis Systems) gerechnet.

Die Methylierung ging in die statistische Auswertung als dichotome Variable (ja/nein) ein, weil, bedingt durch die Analysemethode, nur ein Schätzwert der Methylierung angegeben werden konnte.

Da beim hereditären Mammakarzinom das Auftreten des Tumors vor dem 50. Lebensjahr eine klinische Bedeutung hat, wurde eine Variable eingefügt, in der die Patientinnen in <50 Jahre und ≥ 50 Jahre unterteilt wurden. Zur statistischen Berechnung des Zusammenhangs zwischen nominalen und metrischen Faktoren wurde der T-Test für unabhängige Stichproben herangezogen. Für kategoriale Variablen wurde der χ^2 -Test nach Pearson berechnet.

Überlebensanalysen nach Kaplan und Meier wurden durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit schätzen zu können, dass ein definiertes Ereignis in einem bestimmten Zeitintervall nicht eintritt. Zur Verdeutlichung der Streuung der Ergebnisse um den Mittelwert wird der Standardfehler angegeben. Das globale Signifikanzniveau wurde auf $\alpha=0,05$ festgelegt, demnach markieren p-Werte $\leq 0,05$ signifikante Ergebnisse. Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand von Kaplan-Meier-Überlebenskurven. Ob die ermittelten Unterschiede in den untersuchten Gruppen statistische Signifikanz erreichen, wurde anhand der p-Werte der Log Rank-Tests entschieden. Da der Log Rank proportionale Hazards voraussetzt, wurde für den Fall, dass sich die Kurven schneiden, der Likelihood-Test zur Entscheidung über die Signifikanz herangezogen.

Mit uni- und multivariaten Regressionsmodellen nach Cox wurde berechnet, ob einige wichtige klinische Faktoren und der Methylierungsstatus tatsächlich einen Effekt auf das Gesamtüberleben bzw. das rezidivfreie Intervall haben. Da in der Gruppe der methylierten

Tumore kein Rezidiv aufgetreten ist, musste für die Berechnung des Effekts der Methylierung im rezidivfreien Intervall die Cox-Regression mit der Korrektur nach Firth herangezogen werden. Die Interpretation und Entscheidung der Signifikanz erfolgte in diesem Falle anhand des 95%-Konfidenzintervalls.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Experimente

4.1.1. Methylierungsanalysen am Lightcycler

Nachdem, wie oben beschrieben, mit einer vollmethylierten Probe eine Verdünnungsreihe mit 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5%, 6,75% und 0% Methylierung hergestellt worden ist, wurden 170 Bisulfit-behandelte Tumor-DNA Proben mittels der *High Resolution Melting Analyse* des *Lightcycler 480* auf Methylierungen untersucht. Die Abbildung 7 zeigt eine solche Lightcycler-Analyse der Verdünnungsreihen.

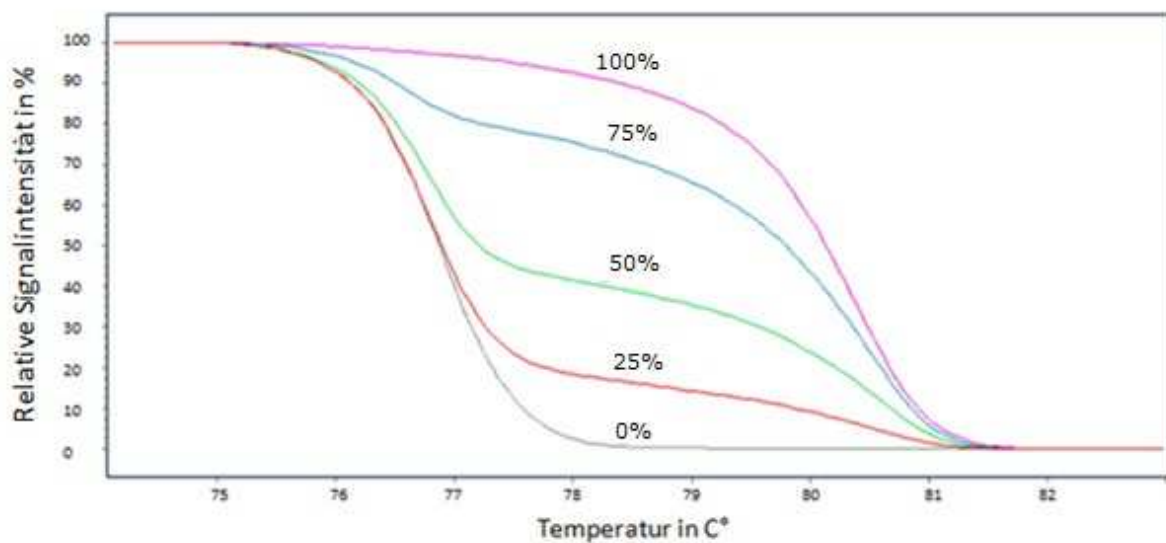


Abb. 7: Analyse des Methylierungsstatus anhand einer Verdünnungsreihe der Positivkontrollen auf dem Lightcycler 480. Die Proben mit höherem Methylierungsgrad zeigen erst bei höheren Temperaturen ein Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge. Bei unmethylierten Proben liegt die Schmelztemperatur, bei der 50% der Doppelstränge aufgeschmolzen sind bei ca. 77°C, bei der vollmethylierten Probe bei ca. 80°C. Der Übersicht halber wurden die Kurven der 12,5% und 6,75% nicht mit aufgeführt.

In jedem Lauf wurde die komplette Verdünnungsreihe mitgeführt, um den Methylierungsgrad der zu untersuchenden Proben in Relation zu den Positivkontrollen abschätzen zu können.

Insgesamt zeigten 44 von 170 untersuchten Tumorproben im *Lightcycler 480* eine Methylierung zwischen 12,5% und 100%. Da ein klinischer Effekt der Methylierung erst bei einer bestimmten Anzahl von methylierten CpGs auftreten wird, wurde in den unteren Methylierungsbereichen nur bis 12,5% analysiert.

Für das p15-Gen konnte, im Rahmen der Leukämieforschung, bei Promotormethylierungen zwischen 30% und 40% eine komplette Inaktivierung der Transkription nachgewiesen werden (Cameron et al., 1999). In dieser Arbeit wurde also ein Cut-off bei 20% gewählt, um bei der Auswertung in der Gruppe der Methylierten nur solche Tumoren zu haben, bei denen es mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer reduzierten bis fehlenden Transkription des BRCA1-Gens gekommen ist. Außerdem zeigten die Patientinnen mit einem Methylierungsgrad von <20% klinisch eher den Phänotyp wie die nicht-methylierten. Bei 25 Proben wurde eine Methylierung von $\geq 20\%$ gesehen, die genaue Verteilung ist in Tabelle 9 dargestellt. 19 Proben lagen unter 20% und wurden somit zu den nicht-methylierten Proben gerechnet. Insgesamt zeigte das Gesamtkollektiv somit eine Methylierungshäufigkeit von 15%.

Tab. 9: Aufstellung der Methylierungsergebnisse (N=170).

Methylierung	Häufigkeit
50-100	16
20-49	9
0-19	145

4.1.2. Klonierung

Um die Ergebnisse der *Lightcycler*-Untersuchung zu verifizieren, wurden stichprobenartig einige bisulfit-behandelte DNA-Proben einer Klonierung unterzogen.

Der Bereich der Promotorregion des BRCA1-Gens, der in dieser Arbeit genauer untersucht wurde, enthält 11 CpG-Stellen (siehe Abb.2), an welchen eine Methylierung potenziell möglich ist. Diese CpGs liegen -55 bp bis +44 bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt. Den Methylierungsstatus der Klone zeigt Abbildung 8. Methylierte CpG-Dinukleotide werden in dieser Darstellung durch einen schwarzen Kreis, unmethylierte durch einen weißen Kreis symbolisiert.

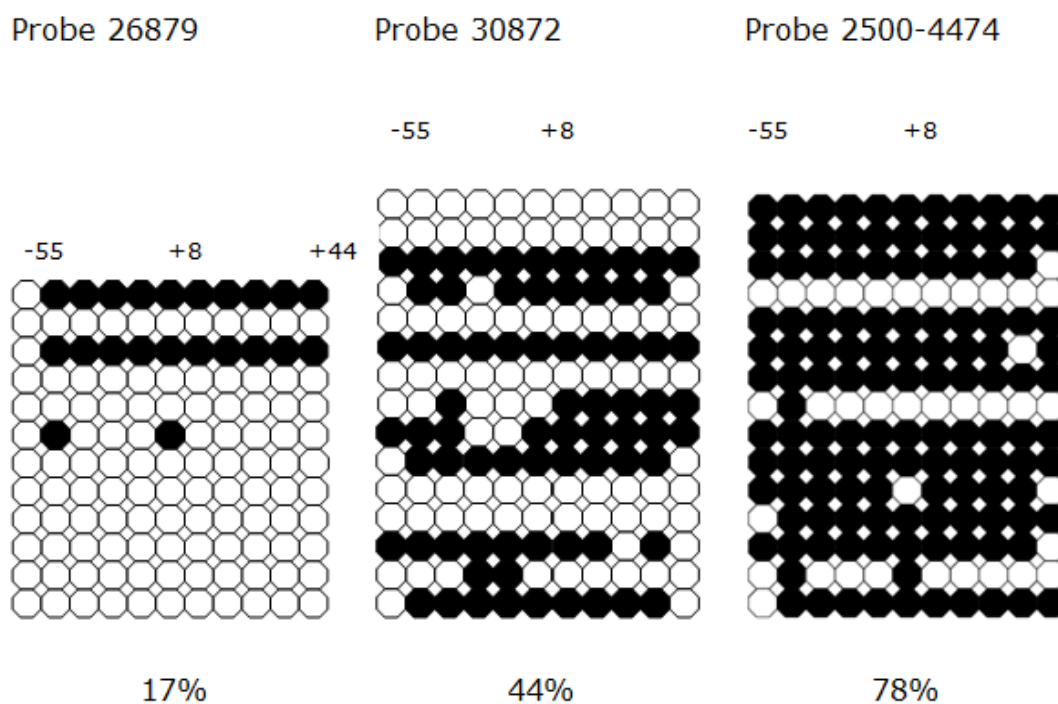


Abb. 8: Ergebnisse der Klonierung. Horizontal wurden die 11 CpG-Dinukleotide aufgetragen, die in der DNA-Sequenz relativ zum Startpunkt der mRNA im Bereich von 55Basen in 5'-Richtung bis 44 Basenpaare in 3'-Richtung liegen. Auf der vertikalen Achse wurden die einzelnen Klone dargestellt. Mit schwarzen Kreisen wird eine Methylierung der CpG-Stelle symbolisiert.

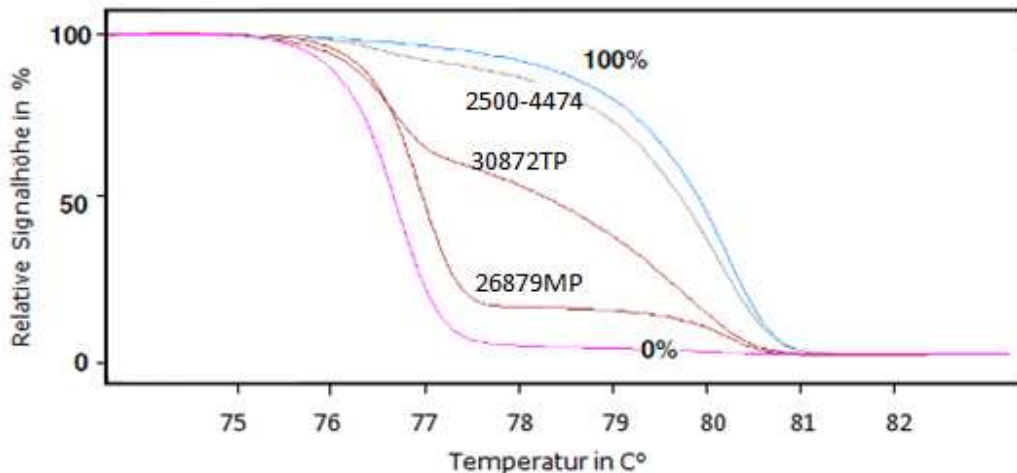


Abb. 9: Darstellung der Methylierung der klonierten Proben auf dem Lightcycler 480. Die 100% methylierte und eine unmethylierte Probe wurden der Anschaulichkeit wegen mitlaufen gelassen. Die Probe 2500-4474 zeigt auf dem *Lightcycler* eine Methylierung von ca. 80%, die Probe 30872TP etwa 40% und die Probe 26879MP ungefähr 15% Methylierung.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen, dass die Ergebnisse der *LightCycler*-Untersuchung als verlässlich und relativ exakt eingestuft werden können. Die Sequenzanalyse der Klone erbrachte außerdem, dass methylierte Klone häufig an allen CpG-Stellen der Promotorregion eine Methylgruppe tragen.

4.1.3. Veränderungen der Kopienanzahl im Bereich des BRCA1-Gens

Mittels der MLPA-Methode wurden die Kopienanzahlen der 24 Exons des BRCA1-Gens im Gewebe der tripel-negativen Tumoren auf Amplifikationen und Deletionen untersucht. Alle Tumorproben, die im Vergleich zu den gesunden Kontrollproben, einen Abfall der Kopienzahlen auf 85% oder weniger zeigten, wurden als deletiert gewertet, diejenigen, die mindestens 115% der Gendosis aufwiesen, wurden als amplifiziert angesehen. Dabei wurden Veränderungen teilweise über den gesamten Bereich der 24 Exons des BRCA1-Gens gefunden, oder nur in Teilen der kodierenden Regionen. Von den 120 untersuchten Gewebeproben wiesen 53 eine Deletion (44,2%) und 4 eine Amplifikation (3,3%) des BRCA1-Gens auf. Bei 63 analysierten Proben (52,5%) konnte keine Dosisveränderung dieses Gens

festgestellt werden (siehe dazu auch Tabelle 10). Die Abbildungen 10A, 10B und 10C zeigen jeweils die prozentualen Anzahlen der Kopien für jedes Exon, wobei unveränderte Tumorzellen zwei Kopien einer Zielsequenz und damit 100% der Gendosis enthalten. Jedes Diagramm ist das Resultat der Analyse einer Tumorprobe.

Tab. 10: Aufstellung der Kopienanzahlveränderungen.

Gendosisveränderung	Häufigkeit (n=120)
Deletion	53 (44,2%)
Amplifikation	4 (3,3%)
Normale Gendosis	63 (52,5%)

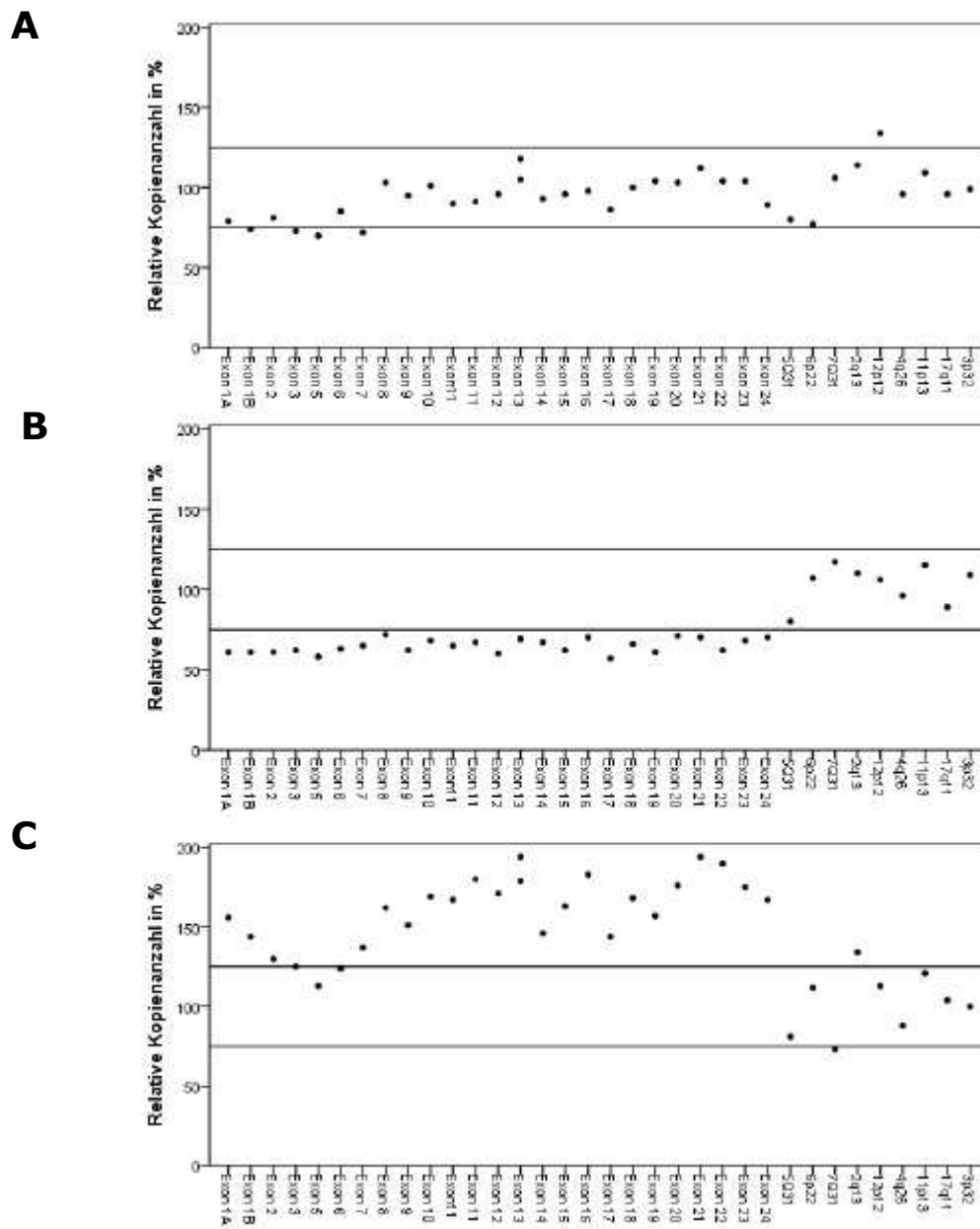


Abb. 10: Analyse der Kopienanzahl im BRCA1-Gen mittels MLPA. Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der Kopienanzahl der 24 Exons des BRCA1-Gens und 9 Kontrollsequenzen außerhalb des BRCA1-Gens sind in Abbildung A dargestellt für eine Patientin ohne Kopienanzahlveränderung und in Abbildung B für eine Patientin mit einer Deletion über alle Exons des BRCA1-Gens und in Abbildung C für eine Patientin mit einer Amplifikation. Die Linien wurden der Übersichtlichkeit wegen bei 75% und 125% angelegt.

4.2. Statistische Auswertung der klinischen und der experimentell erhobenen Daten

4.2.1. Deskriptive Statistik

Die Tabelle 11 zeigt die Aufschlüsselung des Kollektivs nach wichtigen klinischen Parametern.

Tab. 11: Klinische Parameter des Patientenkollektivs

Klinischer Parameter	N=170	%
Alter		
<50	56	33,5
>50	111	66,5
Unbekannt	3	
Median	57,6 Jahre	
Menopausenstatus		
Prämenopausal	47	30,1
Perimenopausal	5	3,2
Postmenopausal	104	66,7
Unbekannt	14	
Tumorgröße		
pT1	76	45,8
pT2	76	45,8
pT3	6	3,6
pT4	8	4,8
Unbekannt	4	
Nodalstatus		
N0	90	55,6
pN1	55	34,0
pN2	12	7,4
pN3	5	3,0
unbekannt	8	
Metastasen		
M0	138	88,5
M1	18	11,5
Unbekannt	14	
Grading		
G1	7	4,3
G2	35	21,5
G3	121	74,2
Unbekannt	7	
Histologie		
Invasiv duktal	128	76,2
Lobulär	9	5,4
Medullär	11	6,5
Andere	20	11,9

	Unbekannt	2	
Therapie			
	Keine	35	23
	Anthrazyklin/Taxan-haltig	100	62
	CMF	26	
	Andere/Unbekannt	10	

Das Kollektiv umfasst 170 Patientinnen mit tripel-negativem Mammakarzinom mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 57,6 Jahren. Prämenopausal waren zum Zeitpunkt der Tumordiagnose 47, perimenopausal 5 und postmenopausal 104. Die 5 perimenopausalen Patientinnen wurden bei der statistischen Auswertung zu der prämenopausalen Gruppe gerechnet, weil das Ovar in der Perimenopause, zwar unregelmäßig, aber dennoch Hormone produziert, die Patientinnen also zum Zeitpunkt der Tumorentstehung noch unter Hormoneinfluss des Ovars standen.

Bezüglich der Tumorgöße hatten 76 Frauen (45,8%) einen pT1 Tumor, also einen Tumor, der 2cm in seiner größten Ausdehnung nicht überschreitet. Unter einem pT2 (2-5cm) Tumor litten 76 Patientinnen (45,8%), 6 (3,6%) hatten eine pT3 (>5cm) Wucherung und 8 Patientinnen (4,8%) sogar einen Knoten mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, sprich einem pT4 Tumor.

Die Erfassung des Nodalstatus ergab, dass 90 Patientinnen (55,6%) zum Operationszeitpunkt keine regionären Lymphknotenmetastasen hatten (N0), 55 Frauen (34,0%) wiesen einen Tumorbefall in beweglichen, ipsilateralen axillären Lymphknoten auf (N1), einen N2-Status, also Metastasen in ipsilateralen, axillären Lymphknoten, die aber untereinander oder an andere Strukturen fixiert sind, hatten 12 Patientinnen (7,4%), einen Befall von supra- oder infraclavikulären Lymphknoten oder von Lymphknoten entlang der A. mammaria interna (N3) zeigte sich bei 5 Frauen (3,0%). Bei 8 Patientinnen des Kollektives war der Nodalstatus unbekannt.

Eine Fernmetastasierung bestand in 18 Fällen (11,5%) zum Zeitpunkt der

Diagnosestellung, 138 Frauen (88,5%) waren frei von Fernmetastasen und bei 14 Patientinnen liegen diesbezüglich keine Daten vor.

Beim histologischen Grading ergaben 74,2% (121 Patientinnen) einen G3, 21,5% (35 Patientinnen) einen G2 und 4,3% (7 Patientinnen) einen G1 Tumor.

Hinsichtlich des histopathologischen Subtyps wurde bei 128 Frauen (76,2%) ein invasiv duktales Karzinom gefunden, was insgesamt, also nicht nur bei den tripel-negativen Mammakarzinomen die häufigste Form darstellt. 6,5% (11 Frauen) zeigten ein medulläres Karzinom, 5,4% (9 Frauen) hatten einen lobulären Tumor. Insgesamt 20 Tumore mit seltenen Entitäten wurden zu den *sonstigen* gerechnet.

132 Patientinnen erhielten eine Chemotherapie, 35 Frauen hatten diese Art der Therapie nicht bekommen. Nach dem FEC-Schema (5-Fluorourazil, Epirubicin und Cyclophosphamid) wurden 43 Frauen therapiert, 26 erhielten eine Chemotherapie mit CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil), 38 Frauen bekamen Epirubicin und Cyclophosphamid (EC), eine nicht näher spezifizierte Anthrazyklin-Taxan Chemotherapie erhielten 9 Frauen und weitere 10 Patientinnen befanden sich in Therapiestudien mit experimentellen Chemotherapien und -kombinationen und werden deshalb zu den „sonstigen“ gerechnet. Insgesamt erhielten also 100 Patientinnen eine Chemotherapie, die ein Anthrazyklin enthielt. Bei 5 Patientinnen konnte die Medikamentenkombination der Chemotherapie nicht ermittelt werden.

Es lagen von 150 Patientinnen Daten bezüglich des Überlebens bzw. des Rezidivstatus vor. In einer Follow-up Zeitspanne von bis zu 262 Monaten, wobei der Median bei 63 Monaten liegt, sind 31 Frauen verstorben, was einem prozentualen Anteil von 20,7% entspricht. Insgesamt hatten von diesen Patientinnen bis zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung 34, also 22,7%, ein Rezidiv.

Allerdings muss bei der Betrachtung der Statistik bedacht werden, dass ein Großteil der Patientinnen bei der statistischen Auswertung zensiert wurde, was bedeutet, dass sie zum letzten Beobachtungszeitpunkt kein

Rezidiv hatten bzw. nicht verstorben waren, allerdings kürzer beobachtet wurden als andere Patientinnen des Kollektivs. Das kommt dadurch zustande, dass der Beobachtungszeitraum jeder Patientin bei Operation beginnt, also in den Jahren zwischen 1999 und 2009, und mit der letzten Tumornachsorge vor Ende der Datenerhebung endet und somit bei jeder Patientin unterschiedlich lang ist. Zum Beispiel waren nach 63 Monaten 50% der Patientinnen des Kollektivs aus der Beobachtung ausgeschieden, 29 Frauen durch das Eintreten des Ereignisses, der Rest durch einen kürzeren Beobachtungszeitraum.

4.2.2. Kaplan-Meier-Analysen

4.2.2.1. Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs für das rezidivfreie Intervall und das Gesamtüberleben

Die Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs ergibt, dass 12 Monate nach der Tumoroperation 95,2% der Patientinnen rezidivfrei waren, bei einem Standardfehler von 1,8%. Nach 2 Jahren waren es noch 88,1%, nach 3 Jahren 81,5% und nach 5 Jahren immerhin noch 75,8%. Die dazugehörigen Standardfehler können Tabelle 12 entnommen werden.

Tab. 12: Überlebensanalyse für das rezidivfreie Intervall.

Beobachtungszeit in Monaten	Rezidivfreie Patientinnen in %	Standardfehler in %
12	95,2	1,8
24	88,1	2,7
36	81,5	3,3
60	75,8	3,8

Analysiert man nun auch das Gesamtüberleben der 170 Patientinnen nach Kaplan und Meier, zeigt sich, dass das erste Jahr nach OP 97,3% der

Frauen überlebten, das zweite Jahr 93,2%. Fünf Jahre postoperativ lebten noch 78,6% der Patientinnen.

In den ersten drei Jahren nach Operation sind schon 19 der insgesamt 31 beobachteten Todesfälle eingetreten. Nach 5 Jahren mussten 29 Sterbefälle gezählt werden, danach wurden die Ereignisse deutlich weniger. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit an tripel-negativem Brustkrebs zu sterben für Patientinnen, die die ersten 5 Jahre nach der Tumoroperation überlebt haben, deutlich abnimmt. Siehe hierzu Abbildung 11 und Tabelle 13.

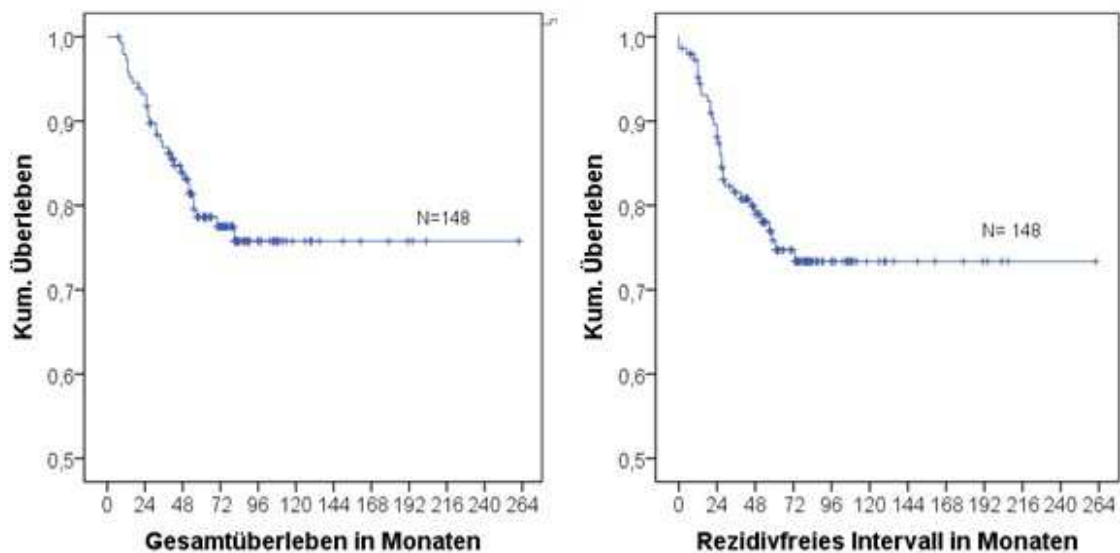


Abb. 11: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls. Die Abbildungen zeigen durch das steile Abfallen der Kurven, dass die Sterbefälle bzw. die Rezidive in einem Zeitraum von ca. 60 Monaten nach initialer Tumoroperation eintraten, nach 72 Monaten verstarb schließlich keine Patientin mehr und es trat auch kein Rezidiv mehr auf. Ein senkrechter Strich steht für den Zeitpunkt, an dem eine Patientin zensiert wurde.

Um herauszufinden, ob bestimmte klinische Parameter oder Tumoreigenschaften das rezidivfreie Intervall bzw. das Gesamtüberleben beeinflussen, wurden weitere Kaplan-Meier-Analysen mit Hinblick auf mögliche Einflussfaktoren durchgeführt.

Tab. 13: Überlebensanalyse für das Gesamtüberleben.

Beobachtungszeit in Monaten	Überlebende Patientinnen in %	Standardfehler in %
12	97,3	1,3
24	93,2	2,1
36	86,9	2,8
60	78,6	3,6

4.2.2.2. Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens mit verschiedenen Faktoren

Da von einigen klinischen Parametern, wie beispielsweise der Tumorgroße oder dem Nodalstatus, allgemein bekannt ist, dass sie die Prognose der Patientin maßgeblich beeinflussen, wurden die erhobenen Überlebensdaten hinsichtlich der wichtigsten Faktoren mittels Kaplan-Meier-Analyse untersucht.

Die Überlebensanalyse bei Betrachtung der Tumorgroße ergab, dass Patientinnen mit Tumoren der Größe pT1 das beste Überleben hatten, wohingegen sich mit zunehmender Größe des Karzinoms die Prognose der Patientin verschlechterte. Frauen mit Raumforderungen der Ausdehnung pT4 sind, bis auf eine Ausnahme, alle innerhalb von 72 Monaten verstorben, vergleiche hierzu Abbildung 12.

Abbildung 13 zeigt die Analyse der Überlebensdaten hinsichtlich des Nodalstatus. In dem vorliegenden Patientenkollektiv unterscheiden sich die Sterbefälle bei Frauen ohne befallene Lymphknoten (N0) nur unwesentlich von denen, die bei Operation einen Nodalstatus von N1 hatten, wohingegen die Kurven der Frauen mit höherem Nodalstatus (N2 oder N3) früh steil abfallen, das Mortalitätsrisiko also höher war.

Hinsichtlich des Alters wurden die Patientinnen in eine Gruppe < 50 Jahre und eine Gruppe mit Frauen ≥ 50 Jahre eingeteilt. Frauen, die bei

Tumoroperation jünger als 50 Jahre waren, zeigten bei einem signifikanten $p=0,002$ ein längeres Überleben und rezidivfreies Intervall ($p=0,045$), wie in Abbildung 14 zu sehen ist.

Da der Menopausenstatus eng mit dem Alter der Frauen zusammenhängt, ergibt sich für die Kaplan-Meier-Kurven mit dem Vergleich prä- bzw. perimenopausal und postmenopausal ein zu Abbildung 14 sehr ähnliches Bild, mit ebenfalls signifikant längerem Gesamtüberleben bei den prämenopausalen Patientinnen als bei den älteren und damit eher postmenopausalen Frauen.

Patientinnen, die sich einer postoperativen Chemotherapie unterzogen haben, zeigten tendenziell längere Überlebenszeiten als diejenigen, die keine Chemotherapie erhalten haben, der Unterschied erreichte allerdings bei einem $p= 0,072$ im Log Rank-Test keine statistische Signifikanz. Abbildung 16 veranschaulicht die Auswirkung der Chemotherapie auf das Gesamtüberleben bzw. das rezidivfreie Intervall nach initialer Tumoroperation.

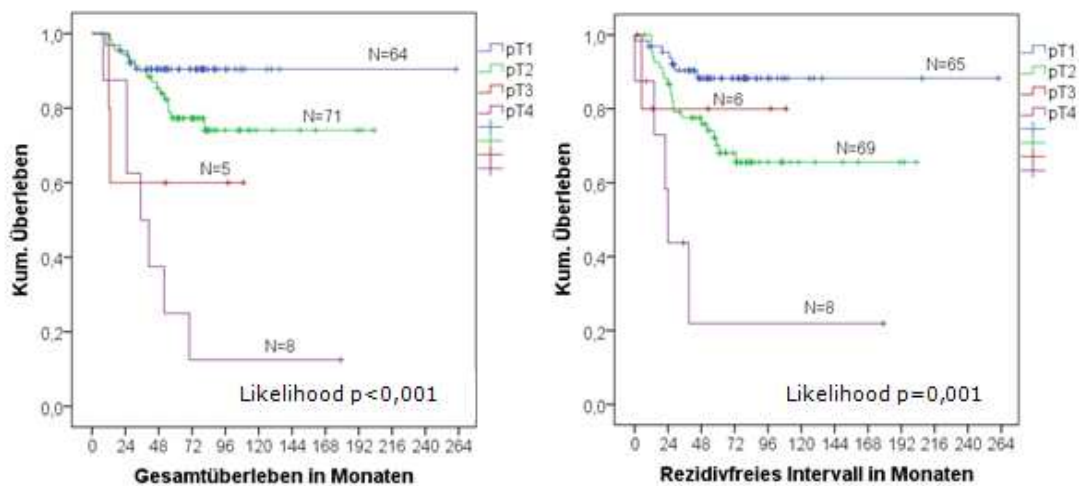


Abb. 12: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich der Tumorgroße. Wie erwartet, zeigten Frauen mit pT1 Tumoren das beste Überleben, Patientinnen mit einem Karzinom der Ausdehnung pT4 das schlechteste. Dass Tumoren der Größe pT3 beim rezidivfreien Intervall eine günstigere Prognose zu haben scheinen als pT2-Raumforderungen, liegt an der kleinen Fallzahl von N=6.

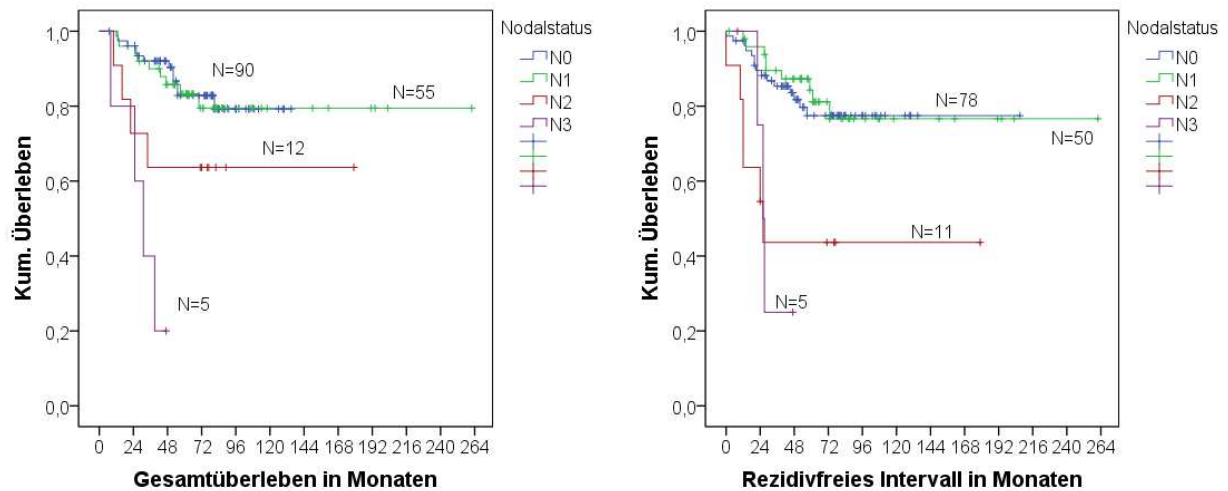


Abb. 13: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich des Nodalstatus. Patientinnen, die keine befallenen Lymphknoten (N0) und diejenigen, die einen Nodalstatus von N1 hatten, schienen sich hinsichtlich des Gesamtüberlebens kaum zu unterscheiden. Anfangs kam es in beiden Gruppen zu einigen Sterbefällen. Frauen mit dem Status N3 zeigten deutlich schlechteres Überleben.

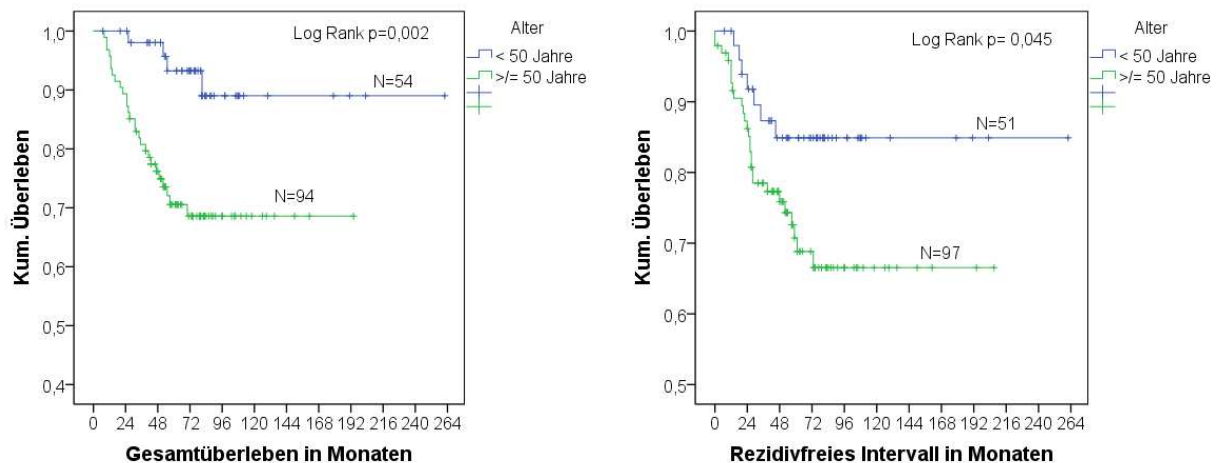


Abb. 14: Kaplan-Meier-Kurven des Gesamtkollektivs hinsichtlich des Alters der Patientinnen. (A) Frauen unter 50 Jahre zeigten signifikant (Log Rank $p=0,002$) längere Überlebenszeiten als Patientinnen, die bei Tumoroperation älter als 50 Jahre waren. (B) Auch bei Betrachtung des rezidivfreien Intervalls ergab sich ein signifikant ($P=0,045$) längeres rezidivfreies Intervall bei der Gruppe <50 Jahre im Vergleich zu den Frauen, die > oder = 50 Jahre waren.

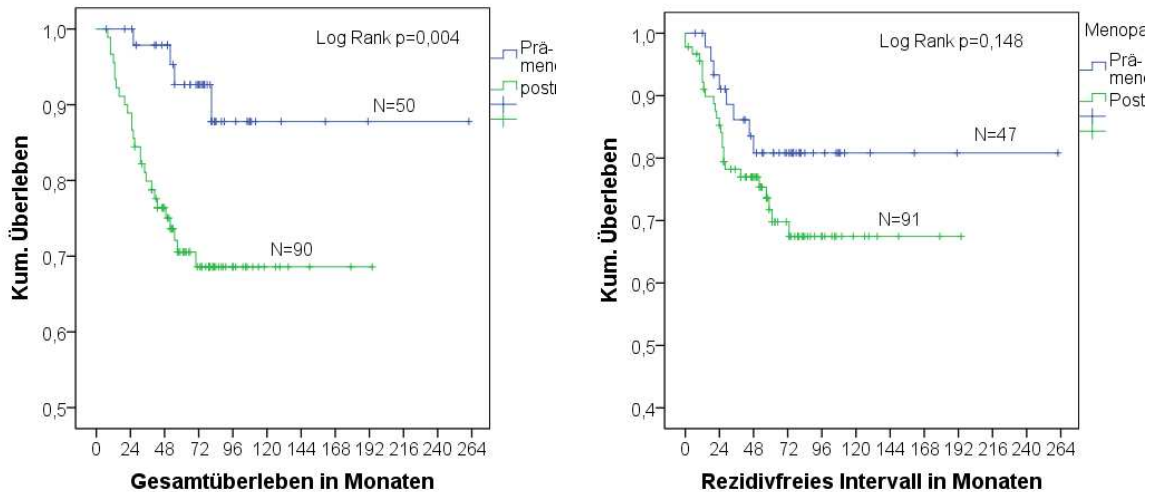


Abb. 15: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich des Menopausenstatus. Prä- und perimenopausale Frauen zeigten signifikant bessere Überlebenszeiten als postmenopausale Patientinnen (Log Rank $p=0,004$). (B) Bei der Analyse des rezidivfreien Intervalls konnte eine Tendenz zum längeren Intervall bei prämenopausalen Frauen gesehen werden, allerdings erreichte dies keine statistische Signifikanz.

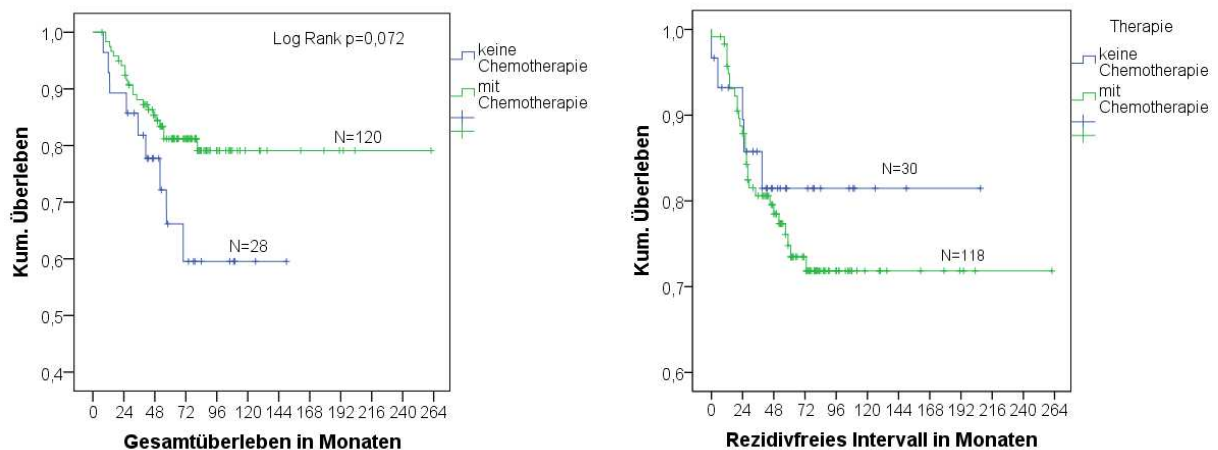


Abb. 16: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs bei Patientinnen mit und ohne interkalierende Chemotherapie. Frauen, die sich einer Chemotherapie unterzogen haben, zeigten deutlich längeres Überleben, als diejenigen, die keine Chemotherapie erhalten haben.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass die Tumorgröße, der Nodalstatus und das Alter der Patientin (<50 Jahre vs. >50 Jahre) signifikante Effekte sowohl auf das Gesamtüberleben, als auch auf das rezidivfreie Intervall der Frauen mit tripel-negativem Karzinom zeigen. Frauen in der Prämenopause haben nur hinsichtlich des Gesamtüberlebens einen signifikanten Vorteil gegenüber den postmenopausalen Patientinnen. Beim rezidivfreien Intervall lässt sich diese Tendenz auch ablesen. Der Faktor „adjuvante Chemotherapie“ erreicht keine Signifikanz.

Da die Fragestellungen dieser Arbeit auf den Methylierungsstatus der Promotorregion des BRCA1-Gens und dessen Auswirkungen auf die Prognose der jeweiligen Patientin abzielen, wird im folgenden Absatz die statistische Auswertung der Patientendaten im Hinblick auf den Methylierungsstatus vorgenommen.

4.2.3. Auswertung der klinischen Daten im Hinblick auf den Methylierungsstatus

Zur Klärung der Frage, ob es klinische und pathologische Faktoren gibt, die für die Anwesenheit einer Methylierung im BRCA1-Gen sprechen, wurde das Kollektiv durch die Methylierung in zwei Gruppen unterteilt und hinsichtlich der möglichen Faktoren untersucht.

Die Anwesenheit von mindestens 20% Methylierung im Tumorgewebe zeigte einen inversen Zusammenhang mit dem Alter. Im Durchschnitt waren Frauen mit einer Methylierung im Tumorgewebe 49 Jahre bei Operation im Vergleich zu 59 Jahren bei Patientinnen ohne eine solche epigenetische Veränderung der Promotorregion. Der Altersunterschied von 10 Jahren war bei einem $p=0,003$ im T-Test statistisch signifikant.

Außerdem zeigt sich im χ^2 -Test nach Pearson, dass Patientinnen mit Methylierung im Tumor häufig prämenopausal sind. Von den 24 Methylierungsereignissen (bei einer Patientin fehlen hier die Daten) konnten 13 (54%) bei prämenopausalen Frauen nachgewiesen werden, hingegen waren nur 26 % der Frauen ohne Methylierung prämenopausal.

Die Methylierung korreliert signifikant mit dem Menopausenstatus im χ^2 -Test nach Pearson bei exakter 2-seitiger Betrachtung mit einem p-Wert von 0,023.

Weitere Analysen ergaben, dass die Gruppe der Patientinnen mit Methylierung sich bezüglich der Tumorgröße und dem Nodalstatus nicht von der Gruppe der unmethylierten unterscheidet. Metastasen traten bei den Methylierten nicht auf, in der Vergleichsgruppe der Unmethylierten allerdings bei 13,6%, was aber statistisch, bei einem $p=0,076$ im χ^2 -Test nach Pearson, keine Signifikanz erreichte. Hinsichtlich des Tumorgradings waren 92% der Methylierten G3 klassifiziert, und nur 71% der Unmethylierten. Dieser Unterschied war ebenfalls nicht signifikant.

Beim Vergleich der beiden Gruppen bezüglich des histologischen Typs fiel auf, dass 88% der Methylierten vom duktalem Typ waren, allerdings auch 12% vom medullären Typ. In der Vergleichsgruppe waren 76% duktal und nur 4% medullär. Die Unterschiede in den Histologien erreichten bei einem $p= 0,223$ keine statistische Signifikanz.

Tab. 14: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Kreuztabellen.

	Methylierung >20%		Unmethyliert		Pearson χ^2 -Test exakte Signifikanz zweiseitig p=
	N=	%	N=	%	
Menopausenstatus					0,023
Prä-/ perimenopausal	13	54,2 %	38	29,7 %	
Postmenopausal	11	45,8 %	90	70,3 %	
Tumorgröße pT					0,751
1	12	48,0 %	62	46,3 %	
2	12	48,0 %	61	45,5 %	
3	1	4,0 %	4	3,0 %	
4	0		7	5,2%	

Nodalstatus					0,610
negativ	18	64,0 %	71	54,6 %	
positiv	9	36,0 %	59	45,4 %	
Metastasen					0,076
Ja	0		17	13,6 %	
Nein	24	100 %	108	86,4 %	
Grading					0,075
G1	0		7	5,3 %	
G2	2	8,0 %	31	23,7 %	
G3	23	92,0 %	93	71,0 %	
Histologie					0,223
Duktal	22	88,0 %	103	76,3 %	
Lobulär	0		7	5,2 %	
Tubulär	0		2	1,5 %	
Medullär	3	12,0 %	6	4,4 %	
Muzinös	0		1	0,7 %	
Sonstige	0		16	11,9 %	

Die Kaplan-Meier-Analyse der 141 Follow-up Daten des Gesamtkollektivs hinsichtlich des Methylierungsstatus (positiv= >20%) zeigt, dass eine Promotormethylierung des BRCA1-Gens mit signifikant (Log Rank $p=0,013$) längerem rezidivfreiem Überleben assoziiert ist, was Abbildung 17 verdeutlicht. Von 141 auswertbaren Überlebensdaten war bei 120 Tumoren der Promotor unmethyliert. In dieser Gruppe traten 32 Ereignisse, also Rezidive, auf. Bei den 21 methylierten Mammakarzinomen hingegen war kein Ereignis zu verzeichnen. Es zeichnete sich ein protektiver Effekt der Promotormethylierung für das Auftreten von Rezidiven ab.

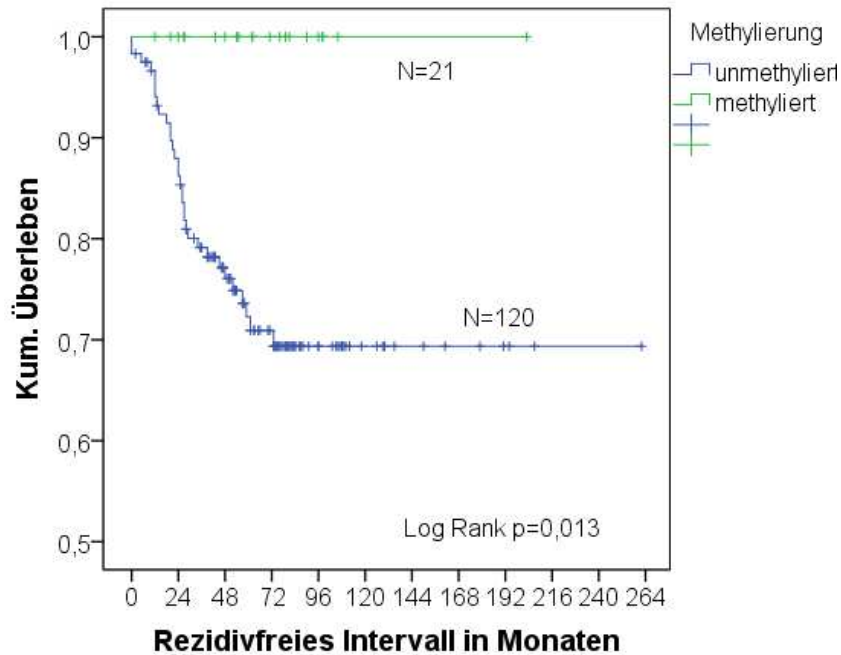


Abb. 17: Kaplan-Meier Überlebensfunktion zum Rezidivfreien Intervall hinsichtlich der Methylierung. Die Patientinnen mit einer BRCA1 Promotormethylierung (grüne Linie) zeigten ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall im Gegensatz zu den Frauen ohne Methylierung (blaue Linie). Zugrunde liegen 141 Follow-up Daten. Bei 120 unmethylierten Proben traten 39 Ereignisse, also Rezidive auf, bei 21 methylierten Tumoren hingegen war kein Ereignis zu verzeichnen.

Wenn man das Gesamtüberleben betrachtet, zeichnet sich ebenfalls ein protektiver Effekt der Promotormethylierung des BRCA1 Gens ab, dieser erreicht aber keine statistische Signifikanz. Für die Kaplan-Meier-Analysen des Gesamtüberlebens lagen 142 auswertbare Daten zum Überleben der Patientinnen vor. Von 119 Frauen ohne Methylierung sind im Laufe der Beobachtung 27 verstorben, was einem Prozentsatz von 22,7% entspricht. Bei der Subgruppe der Patientinnen mit Methylierung (n=23) sind 2 Frauen, also 8,7%, verstorben. Die Abbildung 18 zeigt, dass bei den methylierten Frauen weniger verstorben sind, als in der unmethylierten Vergleichsgruppe, dieser Effekt ist bei einem Log Rank p-Wert von 0,126 aber nicht signifikant.

Frauen mit Promotormethylierung sind also meist jünger, haben Tumoren, die schlecht bzw. undifferenziert sind und haben eine deutlich bessere Prognose als Patientinnen ohne Methylierung.

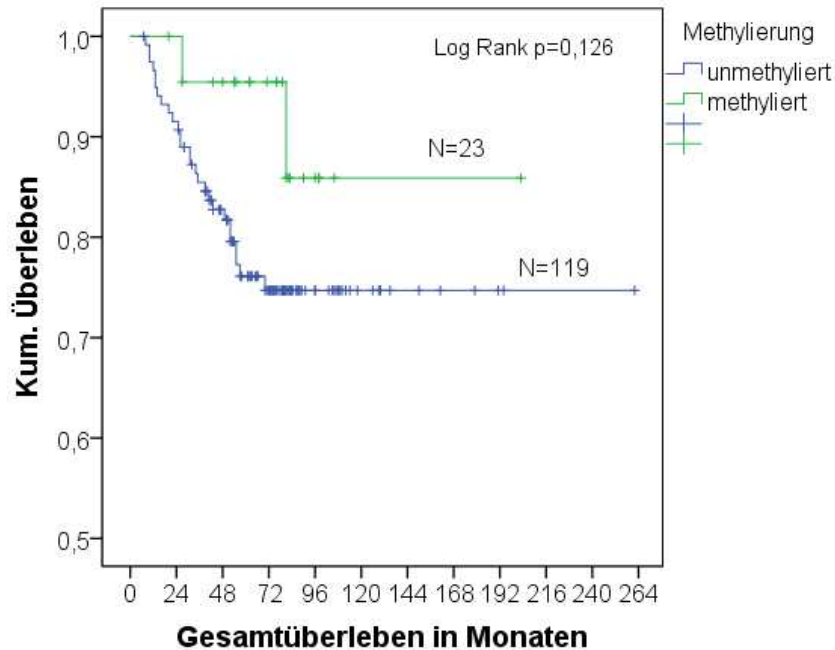


Abb. 18: Kaplan-Meier Überlebensfunktion zum Gesamtüberleben hinsichtlich der Methylierung. Zugrunde liegen 142 auswertbare Patientendaten zum Gesamtüberleben. Von 119 unmethylierten Tumorpatientinnen (blaue Linie) sind im Laufe der Beobachtungen 27 verstorben (22,7%), in der Gruppe der Patientinnen mit Promotormethylierung, n=23 (grüne Linie) nur 2 (8,7%). Ein positiver Effekt der Promotormethylierung auf das Gesamtüberleben lässt sich tendenziell erkennen, ist aber statistisch nicht signifikant.

4.2.4. Auswertung der klinischen Daten in Hinblick auf die Kopienanzahlveränderungen des BRCA1-Gens

Bei der statistischen Auswertung der Daten des Patientenkollektivs hinsichtlich der Kopienanzahlveränderungen im BRCA1-Gen konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen gefunden werden. Es wurde die Gruppe mit Gendosisveränderungen derjenigen mit normaler Gendosis gegenübergestellt. Da die Anzahl der Tumoren mit einer Amplifikation sehr klein ist (N=4), wurde auf eine separate Analyse verzichtet. Untersucht wurde, ob ein Zusammenhang zwischen Kopienanzahlveränderung und Alter, Tumorgroße, Nodalstatus, Grading, Rezidiv und Tod besteht. Bei 12 von 22 Frauen (54,5%) mit

Promotormethylierung im Tumor wurden Gendosisveränderungen gefunden, bei den im Tumor unmethylierten waren es nur 44,8%. Der Unterschied ist statistisch bei einem $p=0,212$ im exakten χ^2 -Test nach Pearson nicht signifikant.

Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens in der Kaplan-Meier Analyse (siehe Abbildung 19 links) zeigte sich, dass Patientinnen ohne eine Deletion im BRCA1-Gen ein geringfügig besseres, statistisch ebenfalls nicht signifikantes, Überleben aufwiesen. 5 Jahre postoperativ lebten noch 79,1% der Patientinnen ohne Gendosisveränderungen, aber nur noch 72,1% der Frauen mit Deletionen im BRCA1-Gen (siehe Tabelle 19 im Anhang).

Beim Auftreten von Rezidiven liefern die Überlebenstabellen nach Kaplan-Meier ähnliche Ergebnisse wie beim Gesamtüberleben, was in Abbildung 19 (rechts) veranschaulicht ist. Die genauen Zahlen sind in Tabelle 20 im Anhang aufgeführt. Die Unterschiede zwischen den beiden verglichenen Gruppen erreichten keine statistische Signifikanz.

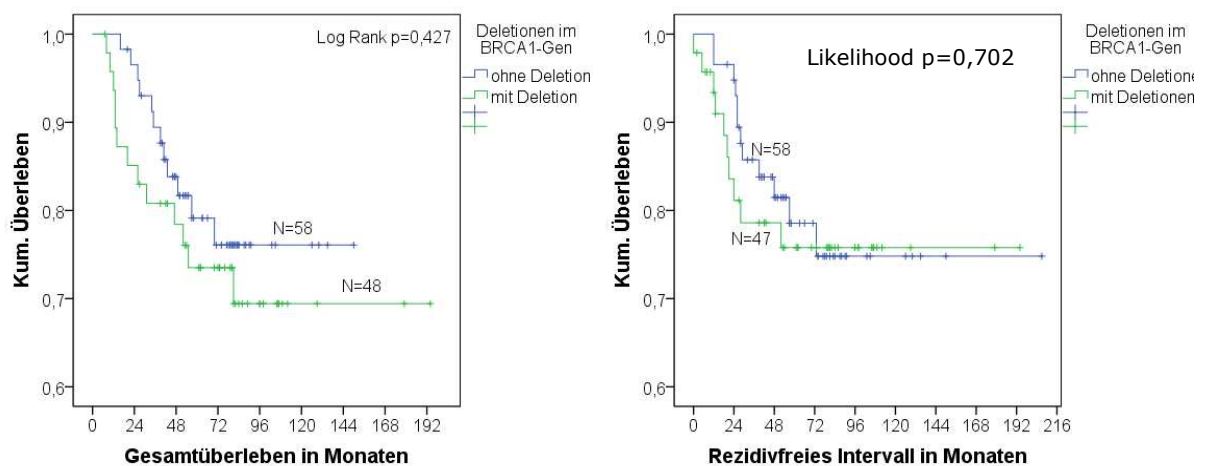


Abb. 19: (links) Kaplan-Meier-Analysen des Gesamtüberlebens und (rechts) des rezidivfreien Intervalls mit dem Faktor der Kopienanzahlveränderungen im BRCA1-Gen.

4.2.5. COX-Regression

Zur Klärung der Frage, ob ein Faktor tatsächlich einen Effekt auf das Gesamtüberleben bzw. das rezidivfreie Intervall hat, lässt sich ein Regressionsmodell nach Cox berechnen. In Tabelle 15 sind die univariaten COX-Regressionen des rezidivfreien Intervalls hinsichtlich einiger wichtiger Faktoren dargestellt. Für den Faktor der Promotormethylierung musste aufgrund der Datenlage eine Cox-Regression nach Firth berechnet werden, welche die Methylierung mit einem Hazard Ratio von 0,081 (Konfidenzintervall 0,001-0,570) als signifikanten Faktor ermittelte. Das bedeutet eine Risikoreduktion für das Auftreten eines Rezidivs bei Frauen mit einer Methylierung in der BRCA1-Promotorregion von 91,9% gegenüber der unmethylierten Vergleichsgruppe. Die Faktoren Tumorgröße und Nodalstatus zeigen ebenfalls einen signifikanten ($p < 0,05$) Zusammenhang mit dem rezidivfreien Intervall. Bei Patientinnen mit einer Raumforderung der Größe pT3 oder pT4 ist das Risiko ein Rezidiv zu erleiden 3,424 mal so hoch wie in der Vergleichsgruppe (pT1 oder pT2). Bezüglich des Nodalstatus ergab die univariate COX-Regression, dass mit höherem Nodalstatus das Risiko des Rezidivs zunimmt. Frauen mit einem Lymphknotenbefall von N2 haben verglichen mit der Gruppe mit N0 ein 4,215 fach höheres Risiko ein Rezidiv zu bekommen.

Tab. 15: Prognostische Faktoren für das rezidivfreie Intervall bei TNBC.

Variable	N	Univariate Analyse	
		Hazard Ratio [95% Konfidenzintervall]	P-Wert
Alter	148		
<50 J. vs. >50J		2,284 [0,994-5,250]	0,052 n.s.
Menopausenstatus	138		
Post vs. Prä/peri		1,783 [0,804-3,956]	0,155 n.s.
Tumorgröße	148		
pT3/4 vs. pT1/2		3,424 [1,413-8,300]	0,006

Nodalstatus	144		0,001
N1 vs. N0		0,862 [0,377-1,972]	0,726 n.s.
N2 vs. N0		4,215 [1,629-10,904]	0,003
N3 vs. N0		5,705 [1,618- 20,118]	0,007
Chemotherapie	148		
nein vs. ja		1,324 [0,512-3,423]	0,562 n.s.
Methylierung	141		
>20% vs. <20%		0,081 [0,001-0,570]	signifikant
BRCA1-Defizienz	74		
Ja vs. nein		0,237 [0,054-1,033]	0,055 n.s.

Um die prognostische Bedeutung der Promotormethylierung unter dem Einfluss der in der univariaten COX-Regression als relevant gefundenen Faktoren auf das rezidivfreie Intervall zu untersuchen, wurde ein multivariates COX-Regressionsmodell angewandt. In die multivariate Analyse wurden die Methylierung, der Nodalstatus und die TumorgroÙe eingeschlossen. Die statistischen Berechnungen ergaben, dass die Promotormethylierung im BRCA1-Gen (HR 0,096, Konfidenzintervall 0,001-0,687) und der Nodalstatus (pN) unabhängige prognostische Faktoren für das rezidivfreie Intervall sind.

Die TumorgroÙe zeigte in diesem multivariaten Cox-Regressionsmodell mit einem HR von 2,008 (Konfidenzintervall 0,605-5,404) einen Effekt auf das rezidivfreie Überleben, wobei keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Eine genaue Aufstellung der untersuchten Faktoren und die dazugehörigen HRs sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Die univariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben erbrachte, dass das Alter, der Menopausenstatus, die TumorgroÙe und der Nodalstatus signifikante Effekte auf die Überlebenszeit der Patientinnen haben. Die Chemotherapie, die Methylierung und die Kopienanzahlveränderungen weisen bei Anwesenheit jeweils auf eine Risikoreduktion hinsichtlich des

Ereignisses Tod hin, sind aber nicht signifikant. Tabelle 17 enthält die genauen Zahlen der multivariaten Analysen des Gesamtüberlebens.

Tab. 16: Multivariate Cox-Regression nach Firth für das rezidivfreie Intervall.

Variable	N	Multivariate Analyse	
		Hazard Ratio [95% Konfidenzintervall]	Signifikanz
Tumorgröße	137		
pT1/2 vs. pT3/4		2,008 [0,605-5,404]	-
Nodalstatus	137		+
N0 vs. N1		0,679 [0,267-1,578]	-
N0 vs. N2		3,225 [1,141-8,091]	+
N0 vs. N3		4,386 [1,087-13,442]	+
Methylierung	137		
<20% vs. >20%		0,096 [0,001-0,687]	+

Tab. 17: Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben.

Variable	N	Multivariate Analyse	
		Hazard Ratio [95% Konfidenzintervall]	P-Wert
Tumorgröße	138		
pT1/2 vs. pT3/4		4,767 [1,921-11,829]	0,001
Nodalstatus	138		0,008
N0 vs. N1		0,807 [0,316-2,057]	0,653
N0 vs. N2		1,750 [0,545-5,625]	0,347
N0 vs. N3		6,992 [2,052-23,825]	0,002
Methylierung	138		
<20% vs. >20%		0,440 [0,103-1,891]	0,270

Auch für das Gesamtüberleben wurde ein multivariates Cox-Regressionsmodell angewandt, was die Tumorgröße und den Nodalstatus als prognostische Effektoren auf die Überlebenszeit ermittelte. Die

Methylierung scheint bei einem HR von 0,440 auch auf das Gesamtüberleben einen positiven Effekt zu haben, der sich aber nicht als signifikant erwies. Tabelle 18 zeigt die univariate Regression für das Gesamtüberleben.

Tab. 18: Prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben bei TNBC.

Variable	N	Univariate Analyse	
		Hazard Ratio [95% Konfidenzintervall]	P-Wert
Alter	147		
<50 J. vs. >50J		4,484 [1,567-12,830]	0,005
Menopausenstatus	139		
Prä/peri vs. Post		4,123 [1,438-11,823]	0,008
Tumorgröße	147		
pT1/2 vs. pT3/4		5,878 [2,700-12,799]	<0,001
Nodalstatus	143		<0,001
N0 vs. N1		1,090 [0,459-2,587]	0,846 n.s.
N0 vs. N2		2,562 [0,825-7,954]	0,104 n.s.
N0 vs. N3		10,884 [3,387- 34,972]	<0,001
Chemotherapie	148		
CTX vs. keine CTX		0,497 [0,229-1,081]	0,078 n.s.
Methylierung	141		
<20% vs. >20%		0,343 [0,082-1,445]	0,145 n.s.
BRCA1-Defizienz	76		
Ja vs. nein		0,369 [0,106-1,286]	0,118 n.s.

5. Diskussion

5.1. Prävalenz der BRCA1-Promotormethylierung im tripel-negativen Patientenkollektiv

Da es durch Methylierung im Promotorbereich von Genen zur deren Inaktivierung und damit zu fehlender Expression des Gens kommen kann, wurde in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die Methylierung des BRCA1-Gens in der Subgruppe der tripel-negativen Mammakarzinome gelegt. Das BRCA1-Gen ist für homologe Rekombination bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zuständig und ist bei einem Teil der Mammakarzinome für die Krebsentstehung von entscheidender Bedeutung.

Ziel der Experimente zu dieser Arbeit war es, herauszufinden, wie hoch die Prävalenz der epigenetischen Veränderungen und von genomischen Rearrangements im BRCA1-Gen in der Subgruppe der tripel-negativen Mammakarzinome ist und welche Auswirkungen diese Veränderungen auf die Prognose der betreffenden Patientin haben.

Die *methylation sensitive-high resolution melting Analyse (MS-HRM)* konnte durch Klonierung und Sequenzierung der bisulfitbehandelten DNA als verlässliches Instrument für die Bestimmung der Methylierungsereignisse eingestuft werden, was auch durch die Forschergruppe um Migheli et al., die die MS-HRM Analyse als ähnlich verlässliches Verfahren wie die *pyrosequencing-Methode* identifiziert haben, bestätigt wurde (Migheli et al., 2013).

In dem untersuchten Kollektiv zeigte sich bei 44 von 170 analysierten DNA-Proben eine Methylierung (25,9%). Allerdings wurde für die statistische Auswertung ein Cut-off gewählt, der nur Tumoren mit >20% methylierten CpGs als positiv einstuft, da niedrigere Methylierungslevel nicht mit reduzierter Transkription assoziiert sind (Cameron et al., 1999). Danach verblieben 25 Proben mit einer deutlichen ($\geq 20\%$ methylierte CpGs) Promotormethylierung, woraus sich eine Methylierungshäufigkeit in

diesem TNBC-Kollektiv von 15% ergibt. In einer groß angelegten Studie, die von Xu et al. 2013 durchgeführt wurde, ergab sich bei der Analyse von 206 TNBCs eine Methylierungsprävalenz in der BRCA1 Promotorregion von 31% (Xu et al., 2013). Galizia et al. publizierten 2010 eine ähnliche Methylierungshäufigkeit unter den von ihnen untersuchten TNBCs, nämlich 31,8% (Galizia et al., 2010). Die Forschergruppe um Ignatov veröffentlichte kürzlich eine Untersuchung, bei der die Methylierungen im TNBC-Kollektiv noch höher lagen, nämlich bei 66,2%. Allerdings wurden auch 64,2% Methylierung in nicht-tripel-negativen Karzinomen gemessen, was weit über den mehrheitlich publizierten 7-30% liegt. Alle drei angeführten Untersuchungen wurden nicht wie in dieser Arbeit mit MS-HRM analysiert, sondern mittels der *methylation specific-PCR (MSP)*.

All diese Angaben liegen deutlich über den bei diesem Kollektiv gemessenen 15%. Das kann einerseits an einem höheren Anteil von angrenzendem Normalgewebe, in dem die BRCA1-Promotorregion unmethyliert ist, liegen, der bei der Präparation des Tumors mitgewonnen wurde. Der Anteil des Normalgewebes wurde aber durch Makrodissektion durch den Pathologen des Klinikums minimalisiert. Das in geringen Mengen mitpräparierte Normalgewebe kann eventuell dazu geführt haben, dass Tumoren unter den Cut-off von 20% gerutscht sind und damit als unmethyliert gewertet wurden, in Wirklichkeit aber >20% Methylierung aufweisen.

Andererseits ist die unterschiedliche Prävalenz sicherlich auch auf die Analysemethode zurückzuführen, da die MSP im Gegensatz zur MS-HRM ein nicht-quantitatives Verfahren darstellt, was auch niedrige Methylierungslevel misst, die nicht mit Transkriptionsminderung assoziiert sind (Cameron et al., 1999). Der Cut-off von 20% in dieser Arbeit schließt die niedrigen Methylierungslevel aus, was zu einer geringeren Methylierungsprävalenz führt. Zudem ist die *methylation specific-PCR* anfällig für falsch-positive Ergebnisse (Kristensen et al., 2008; Shaw et al., 2006), was sich wiederum in einer höheren Prävalenz niederschlagen kann.

Wenn man all diese Dinge berücksichtigt, liegen die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen 15% und die Prävalenzen der kürzlich veröffentlichten Studien wahrscheinlich in einem ähnlichen Bereich.

5.2. Zusammenhang der Methylierung mit anderen klinischen und pathologischen Faktoren

Die Patientinnen mit Methylierung zeigten in diesem Kollektiv einige klinische und pathologische Auffälligkeiten. Im Durchschnitt waren sie bei Diagnosestellung 10 Jahre jünger, häufiger prämenopausal und litten häufiger an schlecht bzw. undifferenzierten Tumoren (G3) als die Vergleichsgruppe, was insgesamt den Merkmalen von BRCA1-Mutationsträgerinnen entspricht und zeigt, dass eine Geninaktivierung durch Methylierung einen ähnlichen Phänotyp wie eine Mutation im BRCA1-Gen bedingen kann (Catteau and Morris, 2002; Esteller et al., 2001). Diese Assoziation zwischen Methylierung und klinischen Eigenschaften ist im Einklang mit anderen Studien, wie zum Beispiel der von Wei et al. aus dem Jahr 2005 (Wei et al., 2005).

Bei Betrachtung des histologischen Subtyps fiel auf, dass die methylierten Tumoren zu 88% duktale und zu 12% medulläre Karzinome waren. In der Gruppe der nicht-methylierten lag der Anteil der medullären Karzinome nur bei 4%. Das ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Manel Esteller, dass BRCA1-methylierte Karzinome häufiger vom medullären Subtyp sind (Esteller et al., 2000).

Die Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich anderer wichtiger klinischer Faktoren wie der Tumorgöße und des Nodalstatus ergab, wie erwartet, dass die Rezidivrate und die Todesfälle mit steigender Tumorgöße zunahmten. Das scheinbar längere rezidivfreie Intervall bei pT3 Tumoren im Vergleich zu pT2 Tumoren (vgl. Abbildung 12) ist vermutlich der kleinen Fallzahl der pT3 Raumforderungen von N=6 und der sehr kurzen Beobachtungszeit dieser Patientinnen geschuldet. Die Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs für den Nodalstatus erbrachte sowohl beim

Gesamtüberleben als auch beim rezidivfreien Intervall, dass Karzinome ohne Lymphknotenbeteiligung (N0) und N1 klassifizierte Tumoren sich erstaunlicherweise kaum voneinander unterscheiden. N2 und N3 Tumore zeigten erwartungsgemäß deutlich schlechtere Überlebenszeiten mit frühen Sterbe- und Rezidivfällen.

Hinsichtlich Tumorgöße und Nodalstatus unterschieden sich die Patientinnen mit und ohne Methylierung nicht voneinander, was auch den Beobachtungen in den oben vorgestellten Untersuchungen von Ignatov und Xu entspricht.

5.3. Assoziation der Promotormethylierung mit einem LOH

Für sporadische Mammakarzinome wurde eine Assoziation zwischen der Promotormethylierung und einem *loss of heterozygosity* durch Deletion in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben (Wei et al., 2005; Esteller et al., 2000; Birgisdottir et al., 2006). Außerdem fanden einige Autoren einen Zusammenhang zwischen LOH und Hormonrezeptornegativität (Okada et al., 2012; Rhiem et al., 2010; Osorio et al., 2002). Die LOH-Prävalenzen bei sporadischen Brusttumoren werden in diversen Studien zwischen 20% und 52% angegeben (Okada et al., 2012; Rhiem et al., 2010). Um zu überprüfen, ob im tripel-negativen Kollektiv eine Häufung dieser genomischen Veränderungen und ein Zusammenhang mit der Methylierung nachgewiesen werden kann, wurde in dieser Arbeit die Häufigkeit von Rearrangements mittels MLPA-Analyse untersucht.

44,2% der untersuchten TNBCs besaßen genomische Rearrangements im BRCA1-Gen, welche allerdings keine Assoziation mit klinischen und pathologischen Merkmalen hatten. Bei den Überlebensanalysen nach Kaplan und Meier konnten die Beobachtungen von Rhiem et al. und Okada et al., nämlich dass LOHs mit signifikant schlechterem Gesamtüberleben und rezidivfreiem Intervall vergesellschaftet sind, nicht belegt werden. Zwar lässt sich in Abbildung 19 beim Gesamtüberleben eine Tendenz für schlechteres Überleben bei Frauen mit einer BRCA1-Deletion ablesen,

dieser Unterschied ist aber statistisch nicht signifikant. Bei Analyse des rezidivfreien Intervalls konnte für die allelische Imbalance kein Unterschied bei Patientinnen mit und ohne LOH im BRCA1-Gen gefunden werden.

Jedoch lag die Prävalenz für Veränderungen der Kopienanzahl in der Subgruppe der methylierten Tumoren etwas höher, nämlich bei 54,5%. Das legt die Vermutung nahe, dass es eine Assoziation von Methylierung und LOH, wie in einigen Studien beschrieben, geben könnte. In diesem Kollektiv konnte aber kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden werden.

5.4. Auswirkungen der BRCA1-Methylierung auf die Prognose der Betroffenen

Die letzte aus 1.7 noch unbeantwortete Fragestellung ist die nach dem Effekt der BRCA1-Methylierung auf die Prognose der Betroffenen. Die Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs erbrachte, wie bei tripel-negativen Tumoren erwartet, dass die meisten Rezidive und Sterbefälle innerhalb eines Zeitraums von 5 Jahren nach Diagnosestellung eintraten. Nach diesem Zeitraum nahm die Zahl der Ereignisse deutlich ab. Interessanterweise zeigte sich bei Betrachtung der Rezidivereignisse im Hinblick auf die BRCA1-Methylierung, dass diese einen prognostisch sehr günstigen Effekt auf das rezidivfreie Intervall ausübt. In der Gruppe der Methylierten trat im Beobachtungszeitraum kein Rezidiv auf, allerdings waren die Beobachtungszeiten in dieser Gruppe gering.

Das bestätigt die Beobachtung von Xu et al., die zeigt, dass bei den tripel-negativen Tumoren die Methylierten ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall haben als die Unmethylierten, wohingegen die 10-Jahres-Überlebensrate im Gesamtkollektiv bei Frauen mit Methylierung schlechter war als ohne Methylierung (Xu et al., 2013). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Forschergruppe um T. Ignatov im Jahr 2013 (Ignatov et al., 2013). In der Gruppe der TNBCs hatten Patientinnen mit BRCA1-

Methylierung ein längeres rezidivfreies Intervall als Frauen ohne Methylierung, dagegen konnte bei den Nicht-TNBCs keine Assoziation zwischen der Promotormethylierung und der Länge des rezidivfreien Zeitraums festgestellt werden.

In der univariaten Cox Regression für das rezidivfreie Intervall konnten die Tumorgröße, der Nodalstatus und die Promotormethylierung als unabhängige, prognostisch wichtige Faktoren ausgemacht werden, wobei das Risiko für ein Rezidiv mit steigender Tumorgröße und höherem Nodalstatus zunimmt. Die Methylierung hingegen scheint einen protektiven Effekt auszuüben. In der multivariaten Analyse konnten die Methylierung und der Nodalstatus als signifikante Effektoren auf das rezidivfreie Intervall ausgemacht werden. Die Tumorgröße hatte in diesem Modell keinen signifikanten Einfluss mehr auf das Ereignis Rezidiv.

Es ergab sich bei einer Hazard Ratio von 0,096 (Konfidenzintervall 0,001-0,687) eine Risikoreduktion für das Ereignis Rezidiv von 90,4% durch eine BRCA1-Promotormethylierung $\geq 20\%$. Die beiden großen Studien von Ignatov et al. und Xu et al. fanden ebenfalls die BRCA1-Methylierung als unabhängigen prognostisch günstigen Faktor im Hinblick auf das rezidivfreie Intervall, allerdings lagen die Hazard Ratios höher, nämlich bei 0,224 bzw. 0,45. Das liegt möglicherweise daran, dass in dieser Arbeit bei der Cox Regression mit dem Faktor Methylierung eine Korrektur nach Firth gerechnet werden musste. Zu beachten ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zudem, dass die absolute Zahl an methylierten Proben für eine statistische Auswertung klein ist (25 Methylierungsereignisse) und dass je nach Eintritt des Karzinoms bis zur Beendigung der Beobachtungszeit zur statistischen Auswertung nur kurze Follow-up-Zeiten berücksichtigt werden konnten. Außerdem sind für die Auswertung alle Methylierungsfälle zensiert worden, was bedeutet, dass die Beobachtungszeit endete bevor ein Rezidiv beziehungsweise ein Todesfall eintrat. Auch im Hinblick auf das Gesamtüberleben scheint die Methylierung einen protektiven Effekt auszuüben (siehe Abbildung 16),

der in dieser Untersuchung allerdings keine statistische Signifikanz erreichte.

Verschiedene Studien zeigten den Effekt der Chemotherapie bei TNBCs und beschrieben diese Subgruppe als sehr chemosensitive Entität (Carey et al., 2007; Liedtke et al., 2008). Trägt man dem Verlust der homologen Rekombination in BRCA1-defizienten Zellen Rechnung, kann erwartet werden, dass DNA-schädigende Medikamente, wie Anthrazykline und Cyclophosphamid, in dieser Subgruppe hohe Zytotoxizität entwickeln (Gluz et al., 2009; Kennedy et al., 2004). Ähnliches zeigte die Studie von Gonzalez-Angulo et al., die ein längeres rezidivfreies Intervall nach adjuvanter anthrazyklinbasierter Chemotherapie bei TNBCs mit BRCA1/2 – Mutationen belegte. Lee et al (2011) konnte hingegen kein besseres Outcome für BRCA1-defiziente nach Anthrazyklintherapie zeigen.

In unserem tripel-negativen Kollektiv zeigten die Patientinnen, die sich einer adjuvanten Chemotherapie unterzogen haben ein besseres Überleben, als diejenigen ohne Chemotherapie. Allerdings fällt bei genauerer Betrachtung der Gruppen auf, dass sie sich auch hinsichtlich anderer Faktoren unterscheiden. Die Patientinnen ohne Chemotherapie hatten ein Durchschnittsalter von 71 Jahren, im Gegensatz zu 54 Jahren bei Frauen mit adjuvanter Chemotherapie. Außerdem litten 28% der Patientinnen in der Gruppe ohne Chemotherapie an einem Tumor der Ausdehnung pT3 oder pT4, die auch ungeachtet der Therapie ein schlechteres Überleben haben als die kleineren Raumforderungen (pT1 oder pT2). In der anderen Gruppe, also mit Chemotherapie, waren nur 3% der Tumoren mit pT3 oder pT4 klassifiziert. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich des Überlebens wird also nicht allein an der fehlenden Chemotherapie liegen.

Interessant ist auch die Frage, ob Frauen mit BRCA1-Methylierung und damit mit BRCA1-Defekt bessere Überlebenszeiten durch die Chemotherapie haben als diejenigen mit intaktem BRCA1-Gen, wie kürzlich von Xu et al. beschrieben (Xu et al., 2013). Die meisten unserer

Patientinnen (79% mit vs. 21% ohne Chemotherapie) erhielten eine adjuvante Therapie, die FEC, EC oder ein anderes Anthrazyklin-Taxan Schema, enthielt. Die hier vorgelegten Daten würden somit bestätigen, dass die Subgruppe der mit Anthrazyklinen oder Taxanen behandelten Patientinnen (N=100) durch eine BRCA1-Promotormethylierung ein längeres rezidivfreies Intervall hatten als diejenigen ohne Methylierung. Jedoch kann bis jetzt nicht ausgeschlossen werden, dass BRCA1-defekte Tumoren durch die intrinsischen Tumoreigenschaften mit einer besseren Prognose assoziiert sind, unabhängig von der Therapie.

5.5. Neue Substanzen für BRCA1-defiziente Tumoren

Klinische und präklinische Studien legen nahe, dass neue Substanzen, die speziell auf Tumoren mit defekter Doppelstrangreparatur abzielen, wie PARP-Inhibitoren oder Platin-basierte Medikamente, beste Effekte erzielen. PARP-1 und -2 sind nukleäre Proteine, die eine entscheidende Rolle bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen spielen (Dantzer et al., 2006). PARP-Inhibitoren führen somit zu einer Akkumulation von Einzelstrangbrüchen, die während der Replikation der Zelle zu Doppelstrangbrüchen werden. Diese Doppelstrangbrüche werden unter normalen Umständen durch homologe Rekombination mithilfe des BRCA1-Genprodukts repariert. Bei BRCA1-defizienten Zellen kommt es durch den Einsatz von PARP-Inhibitoren zur *synthetischen Letalität*, die definiert ist als der letale Effekt der Inaktivierung zweier Enzyme oder Pathways, wenn die Inaktivierung nur eines Enzyms von der Zelle toleriert bzw. ausgeglichen werden könnte (Kaelin, 2005). Tutt et al. veröffentlichten kürzlich eine vielversprechende Studie, die durch den PARP-Inhibitor Olaparib Ansprechraten von >40% bei metastatisiertem Mammakarzinom bei BRCA1/2 mutierten Patientinnen erreichten (Tutt et al., 2010). Diese Untersuchungen wurden an BRCA1 mutierten Tumoren gemacht, allerdings scheinen sie bei Tumoren mit epigenetischen Veränderungen, wie der Methylierung, ebenfalls wirksam zu sein, wie Drew et al. 2011 vermuteten. Ähnlich gute Ansprechraten

zeigen die Platin-basierten Medikamente bei fortgeschrittenen TNBCs (Silver et al., 2010; Byrski et al., 2010).

5.6. Schlussfolgerung

Diese Arbeit zeigt, dass auch die Subgruppe der tripel-negativen Karzinome eine sehr heterogene ist. Obwohl Frauen mit einem TNBC im allgemeinen, durch die Tumoreigenschaften und die fehlenden individuellen Therapiemöglichkeiten, eine schlechtere Prognose haben als diejenigen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren, findet sich unter den TNBCs eine Subgruppe, nämlich die BRCA1-defizienten Tumoren, die eine sehr günstige Prognose und gutes Ansprechen auf die Standardchemotherapie aufweisen. Tumoren mit einer Methylierung der Promotorregion des BRCA1-Gens zeigen einen ähnlichen Phänotyp wie solche mit einer Mutation in diesem Gen. Derzeit laufen einige vielversprechende Studien mit neuen Medikamenten, die speziell bei Tumoren mit Defekt der homologen Rekombination wirksam zu sein scheinen.

Daher wäre es sinnvoll bei Patientinnen, die Merkmale eines BRCA1-defizienten Tumors zeigen, neben der Mutationsanalyse auch eine Methylierungsanalyse durchzuführen, um noch mehr Frauen herauszufiltern, die gute Ansprechraten auf die neuen Therapien haben und damit von den neuen Medikamenten profitieren könnten. Das Beispiel der BRCA1-defizienten TNBCs mit gutem Ansprechen auf neue Substanzklassen zeigt, dass es durchaus sinnvoll ist, die tripel-negativen Tumoren durch molekulare Analysen weiter zu unterteilen und nach weiteren Subgruppen und speziellen Therapiemöglichkeiten zu suchen, um Frauen mit TNBCs weitere Therapieoptionen anbieten zu können und damit deren schlechte Prognose zu verbessern. Neue Behandlungsmöglichkeiten können zwar die über eine Million Mammakarzinom-Neuerkrankungen pro Jahr nicht reduzieren, die tumorbedingte Sterblichkeit allerdings schon.

Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist der häufigste maligne Tumor der Frau, an dem in der westlichen Welt etwa jede 8. Frau erkrankt. Das tripel-negative Karzinom stellt mit ca. 15% eine relativ kleine Subgruppe dar, die allerdings durch eine schlechte Prognose und überproportional viele Brustkrebssterbefälle gekennzeichnet ist. Da eine antihormonelle Behandlung und die Gabe des Antikörpers Trastuzumab bei Rezeptornegativität obsolet sind, steht den Patientinnen mit einem solchen Tumor neben der operativen Entfernung derzeit nur die Standardchemotherapie zur Verfügung.

TNBCs ähneln in ihrem Phänotyp oft dem von Tumoren mit BRCA1-Mutation, was die Vermutung nahe legt, dass unter den TNBCs überproportional viele Tumoren einen BRCA1-Defekt aufweisen. Neben Mutationen sind epigenetische Veränderungen, wie die Promotormethylierung, ebenfalls in der Lage Gene zu inaktivieren.

Mittels der *methylation sensitive-high resolution melting* Analyse wurde die Promotorregion des BRCA1-Gens von 170 DNA-Proben auf Methylierungen hin untersucht, nachdem diese zuvor einer Bisulfidkonversion unterzogen wurden. Um die Ergebnisse zu verifizieren wurden stichprobenartig einige bisulfidbehandelte Proben einer Klonierung und Sequenzierung unterzogen. Die Ergebnisse der MS-HRM konnten so als verlässlich eingestuft werden. Ob zusätzlich ein Verlust von BRCA1-Kopienanzahlen in den Proben vorliegt, wurde mithilfe der Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) untersucht. Für die Prüfstatistik wurden die klinischen und pathologischen Daten der Patientinnen mit den Ergebnissen der Experimente in die statistische Auswertung inkludiert. Nach der Schmelzkurvenanalyse wurde ein cut-off bei 20% gewählt, da von Cameron et al. gezeigt wurde, dass erst bei einer Methylierung zwischen 30% und 40% eine komplette Inaktivierung der Genexpression erreicht wird. Es ergab sich eine Methylierungsprävalenz in unserem Kollektiv von 15%, die mehr als 20% methylierte CpGs in der Promotorregion des BRCA1-Gens zeigen. Bei

44,2% konnte eine Deletion und bei 3,3% eine Amplifikation dieses Gens nachgewiesen werden.

Die statistische Auswertung ergab, dass im Gesamtkollektiv die TumorgroÙe, der Nodalstatus, das Alter und der Menopausenstatus einen signifikanten Effekt auf die Überlebenszeiten hatten. Die adjuvante Chemotherapie zeigte eine deutliche Tendenz zum besseren Überleben, dies erreichte statistisch aber keine Signifikanz. Die Statistik bezüglich der BRCA1-Methylierung ergab, dass Frauen mit dieser Veränderung im Durchschnitt 10 Jahre jünger, häufiger G3 klassifiziert und häufiger vom medullären Subtyp waren als die unmethylierte Vergleichsgruppe. Zudem zeichneten sich die Patientinnen mit methylierten Tumoren durch ein signifikant längeres rezidivfreies Intervall aus als diejenigen mit unmethylierten Tumoren. In der multivariaten Analyse konnte der prognostisch günstige Effekt der Methylierung bestätigt werden.

Bei den methylierten Karzinomen wurde bei 54,5% eine BRCA1-Deletion gefunden. Die Analyse der klinischen und pathologischen Parameter im Hinblick auf die BRCA1-Kopienanzahlveränderungen erbrachte allerdings keine sichtbaren Tendenzen oder signifikanten Korrelationen.

Diese Untersuchungen legen nahe, dass schwerwiegende Alterationen im BRCA1-Gen, die eine Dysfunktion dieses Gens bedingen, auf eine Subpopulation der TNBCs beschränkt sind. Diese Subpopulation hat jedoch wahrscheinlich eine sehr günstige Prognose. Ob die günstige Prognose durch das gute Ansprechen auf die Chemotherapie oder auf die intrinsischen Tumoreigenschaften zurückzuführen ist, lässt sich in dieser Arbeit nicht belegen und muss in weiteren Studien untersucht werden. Überdies sollte diese Untergruppe der TNBCS von den neuen therapeutischen Substanzen, den PARP-Inhibitoren, die speziell bei Tumoren mit DNA-Doppelstrangreparaturdefekt beste Effekte erzielen, profitieren.

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Alfons Meindl bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Frau Dr. rer. nat. Eva Groß danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und Ihre ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Zu guter Letzt gilt mein Dank meinem Mann und meiner Tochter, die mich mit unendlicher Geduld viele Jahre hindurch unterstützt und motiviert haben.

Literaturverzeichnis

- ANTEQUERA, F. & BIRD, A. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11995-9.
- AWMF. 2012. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.
- BAL, A., VERMA, S., JOSHI, K., SINGLA, A., THAKUR, R., ARORA, S. & SINGH, G. 2012. BRCA1-methylated sporadic breast cancers are BRCA-like in showing a basal phenotype and absence of ER expression. *Virchows Arch*, 461, 305-12.
- BAUER, K. R., BROWN, M., CRESS, R. D., PARISE, C. A. & CAGGIANO, V. 2007. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*, 109, 1721-8.
- BIRGISDOTTIR, V., STEFANSSON, O. A., BODVARSDOTTIR, S. K., HILMARSDOTTIR, H., JONASSON, J. G. & EYFJORD, J. E. 2006. Epigenetic silencing and deletion of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 8, R38.
- BÖCKER W. , D. H., HEITZ PH.U. 2004. Mamma. *Pathologie*. München: Elsevier.
- BORDELEAU, L., PANCHAL, S. & GOODWIN, P. 2010. Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. *Breast Cancer Res Treat*, 119, 13-24.
- BOYES, J. & BIRD, A. 1991. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. *Cell*, 64, 1123-34.
- BYRSKI, T., GRONWALD, J., HUZARSKI, T., GRZYBOWSKA, E., BUDRYK, M., STAWICKA, M., MIERZWA, T., SZWIEC, M., WISNIOWSKI, R., SIOLEK, M., DENT, R., LUBINSKI, J. & NAROD, S. 2010. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*, 28, 375-9.
- BYRSKI, T., GRONWALD, J., HUZARSKI, T., GRZYBOWSKA, E., BUDRYK, M., STAWICKA, M., MIERZWA, T., SZWIEC, M., WISNIOWSKI, R., SIOLEK, M., NAROD, S. A. & LUBINSKI, J. 2008. Response to neo-adjuvant chemotherapy in women with BRCA1-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*, 108, 289-96.
- CAMERON, E. E., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 1999. p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing. *Blood*, 94, 2445-51.
- CAREY, L. A., DEES, E. C., SAWYER, L., GATTI, L., MOORE, D. T., COLLICHIO, F., OLLILA, D. W., SARTOR, C. I., GRAHAM, M. L. & PEROU, C. M. 2007. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*, 13, 2329-34.
- CATTEAU, A. & MORRIS, J. R. 2002. BRCA1 methylation: a significant role in tumour development? *Semin Cancer Biol*, 12, 359-371.
- CLARK, S. J., HARRISON, J., PAUL, C. L. & FROMMER, M. 1994. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 22, 2990-7.
- CROPP, C. S., NEVANLINNA, H. A., PYRHONEN, S., STENMAN, U. H., SALMIKANGAS, P., ALBERTSEN, H., WHITE, R. & CALLAHAN, R. 1994. Evidence for involvement of BRCA1 in sporadic breast carcinomas. *Cancer Res*, 54, 2548-51.
- DANTZER, F., AME, J. C., SCHREIBER, V., NAKAMURA, J., MENISSIER-DE MURCIA, J. & DE MURCIA, G. 2006. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol*, 409, 493-510.

- DAUDT, A., ALBERG, A. J. & HELZLSOUER, K. J. 1996. Epidemiology, prevention, and early detection of breast cancer. *Curr Opin Oncol*, 8, 455-61.
- DEININGER, P. 1999. Genetic instability in cancer: caretaker and gatekeeper genes. *Ochsner J*, 1, 206-9.
- DENT, R., TRUDEAU, M., PRITCHARD, K. I., HANNA, W. M., KAHN, H. K., SAWKA, C. A., LICKLEY, L. A., RAWLINSON, E., SUN, P. & NAROD, S. A. 2007. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*, 13, 4429-34.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP 1995. Effects of radiotherapy and surgery in early breast cancer. An overview of the randomized trials *N Engl J Med*, 333, 1444-55.
- EASTON, D. F., BISHOP, D. T., FORD, D. & CROCKFORD, G. P. 1993. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 52, 678-701.
- EASTON, D. F., FORD, D. & BISHOP, D. T. 1995. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*, 56, 265-71.
- ESTELLER, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358, 1148-59.
- ESTELLER, M., FRAGA, M. F., GUO, M., GARCIA-FONCILLAS, J., HEDENFALK, I., GODWIN, A. K., TROJAN, J., VAURS-BARRIERE, C., BIGNON, Y. J., RAMUS, S., BENITEZ, J., CALDES, T., AKIYAMA, Y., YUASA, Y., LAUNONEN, V., CANAL, M. J., RODRIGUEZ, R., CAPELLA, G., PEINADO, M. A., BORG, A., AALTONEN, L. A., PONDER, B. A., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 2001. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet*, 10, 3001-7.
- ESTELLER, M., SILVA, J. M., DOMINGUEZ, G., BONILLA, F., MATIAS-GUIU, X., LERMA, E., BUSSAGLIA, E., PRAT, J., HARKES, I. C., REPASKY, E. A., GABRIELSON, E., SCHUTTE, M., BAYLIN, S. B. & HERMAN, J. G. 2000. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*, 92, 564-9.
- FOULKES, W. D., STEFANSSON, I. M., CHAPPUIS, P. O., BEGIN, L. R., GOFFIN, J. R., WONG, N., TRUDEL, M. & AKSLEN, L. A. 2003. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1482-5.
- GALIZIA, E., GIORGETTI, G., PICCININI, G., SANTINELLI, A., LORETELLI, C., BIANCHI, F., GAGLIARDINI, D., CARBONARI, G., PISA, E., BELVEDERESI, L., BRACCI, R., FERRETTI, C., CORRADINI, F. & CELLERINO, R. 2010. BRCA1 expression in triple negative sporadic breast cancers. *Anal Quant Cytol Histol*, 32, 24-9.
- GLUZ, O., LIEDTKE, C., GOTTSCHALK, N., PUSZTAI, L., NITZ, U. & HARBECK, N. 2009. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*, 20, 1913-27.
- GONZALEZ-ANGULO, A. M., TIMMS, K. M., LIU, S., CHEN, H., LITTON, J. K., POTTER, J., LANCHBURY, J. S., STEMKE-HALE, K., HENNESSY, B. T., ARUN, B. K., HORTOBAGYI, G. N., DO, K. A., MILLS, G. B. & MERIC-BERNSTAM, F. 2011. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*, 17, 1082-9.
- HAMMOND, M. E., HAYES, D. F., DOWSETT, M., ALLRED, D. C., HAGERTY, K. L., BADVE, S., FITZGIBBONS, P. L., FRANCIS, G., GOLDSTEIN, N. S., HAYES, M., HICKS, D. G., LESTER, S., LOVE, R., MANGU, P. B., MCSHANE, L., MILLER, K., OSBORNE, C. K., PAIK, S., PERLMUTTER, J., RHODES, A., SASANO, H., SCHWARTZ, J. N., SWEEP, F. C., TAUBE, S., TORLAKOVIC, E. E.,

- VALENSTEIN, P., VIALE, G., VISSCHER, D., WHEELER, T., WILLIAMS, R. B., WITTLIFF, J. L. & WOLFF, A. C. 2010. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 2784-95.
- HARBECK, N., AIGNER, M., KUSCHEL, B. & KIECHLE, M. 2002. Mammakarzinom-prognostische und prädiktive Faktoren. *Onkologe*, 8, 808-816.
- HERMAN, J. G., UMAR, A., POLYAK, K., GRAFF, J. R., AHUJA, N., ISSA, J. P., MARKOWITZ, S., WILLSON, J. K., HAMILTON, S. R., KINZLER, K. W., KANE, M. F., KOLODNER, R. D., VOGELSTEIN, B., KUNKEL, T. A. & BAYLIN, S. B. 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6870-5.
- HOUSSAMI, N., MACASKILL, P., MARINOVICH, M. L., DIXON, J. M., IRWIG, L., BRENNAN, M. E. & SOLIN, L. J. 2010. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer*, 46, 3219-32.
- IGNATOV, T., POEHLMANN, A., IGNATOV, A., SCHINLAUER, A., COSTA, S. D., ROESSNER, A., KALINSKI, T. & BISCHOFF, J. 2013. BRCA1 promoter methylation is a marker of better response to anthracycline-based therapy in sporadic TNBC. *Breast Cancer Res Treat*, 141, 205-12.
- JOHNSON, S. M., SHAW, J. A. & WALKER, R. A. 2002. Sporadic breast cancer in young women: prevalence of loss of heterozygosity at p53, BRCA1 and BRCA2. *Int J Cancer*, 98, 205-9.
- KAELIN, W. G., JR. 2005. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 5, 689-98.
- KANE, M. F., LODA, M., GAIDA, G. M., LIPMAN, J., MISHRA, R., GOLDMAN, H., JESSUP, J. M. & KOLODNER, R. 1997. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*, 57, 808-11.
- KENNEDY, R. D., QUINN, J. E., MULLAN, P. B., JOHNSTON, P. G. & HARKIN, D. P. 2004. The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 96, 1659-68.
- KIECHLE, M. 2007. Tumorartige Veränderungen und Tumoren. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. 1.Auflage ed. München: Elsevier GmbH.
- KLOSE, R. J. & BIRD, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, 31, 89-97.
- KNIPPERS, R. 2006. *Molekulare Genetik*, Stuttgart, Thieme Verlag.
- KNUDSON, A. G., JR. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68, 820-3.
- KRASTEVA, M. E., BOZHANOV, S. S., ANTOV, G. G., GOSPODINOVA, Z. I. & ANGELOV, S. G. 2012. Breast cancer patients with hypermethylation in the promoter of BRCA1 gene exhibit favorable clinical status. *Neoplasma*, 59, 85-91.
- KRISTENSEN, L. S., MIKESKA, T., KRYPUY, M. & DOBROVIC, A. 2008. Sensitive Melting Analysis after Real Time- Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res*, 36, e42.
- KUEHN, T., BEMBENEK, A., DECKER, T., MUNZ, D. L., SAUTTER-BIHL, M. L., UNTCH, M. & WALLWIENER, D. 2005. A concept for the clinical implementation of sentinel lymph node biopsy in patients with breast carcinoma with special regard to quality assurance. *Cancer*, 103, 451-61.

- LAKHANI, S. R., REIS-FILHO, J. S., FULFORD, L., PENAULT-LLORCA, F., VAN DER VIJVER, M., PARRY, S., BISHOP, T., BENITEZ, J., RIVAS, C., BIGNON, Y. J., CHANG-CLAUDE, J., HAMANN, U., CORNELISSE, C. J., DEVILEE, P., BECKMANN, M. W., NESTLE-KRAMLING, C., DALY, P. A., HAITES, N., VARLEY, J., LALLOO, F., EVANS, G., MAUGARD, C., MEIJERS-HEIJBOER, H., KLIJN, J. G., OLAH, E., GUSTERSON, B. A., PILOTTI, S., RADICE, P., SCHERNECK, S., SOBOL, H., JACQUEMIER, J., WAGNER, T., PETO, J., STRATTON, M. R., MCGUFFOG, L. & EASTON, D. F. 2005. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*, 11, 5175-80.
- LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J. C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R. H., WILSON, R. K., HILLIER, L. W., MCPHERSON, J. D., MARRA, M. A., MARDIS, E. R., FULTON, L. A., CHINWALLA, A. T., PEPIN, K. H., GISH, W. R., CHISSOE, S. L., WENDL, M. C., DELEHAUNTY, K. D., MINER, T. L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J. B., COOK, L. L., FULTON, R. S., JOHNSON, D. L., MINX, P. J., CLIFTON, S. W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J. F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.
- LEE, L. J., ALEXANDER, B., SCHNITT, S. J., COMANDER, A., GALLAGHER, B., GARBER, J. E. & TUNG, N. 2011. Clinical outcome of triple negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers and noncarriers. *Cancer*, 117, 3093-100.
- LI, W. F., HU, Z., RAO, N. Y., SONG, C. G., ZHANG, B., CAO, M. Z., SU, F. X., WANG, Y. S., HE, P. Q., DI, G. H., SHEN, K. W., WU, J., LU, J. S., LUO, J. M., LIU, X. Y., ZHOU, J., WANG, L., ZHAO, L., LIU, Y. B., YUAN, W. T., YANG, L., SHEN, Z. Z., HUANG, W. & SHAO, Z. M. 2008. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in high-risk breast cancer patients of Chinese Han nationality: two recurrent mutations were identified. *Breast Cancer Res Treat*, 110, 99-109.
- LIEDTKE, C., MAZOUNI, C., HESS, K. R., ANDRE, F., TORDAI, A., MEJIA, J. A., SYMMANS, W. F., GONZALEZ-ANGULO, A. M., HENNESSY, B., GREEN, M., CRISTOFANILLI, M., HORTOBAGYI, G. N. & PUSZTAI, L. 2008. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 26, 1275-81.
- LIPS, E. H., MULDER, L., HANNEMANN, J., LADDACH, N., VRANCKEN PEETERS, M. T., VAN DE VIJVER, M. J., WESSELING, J., NEDERLOF, P. M. & RODENHUIS, S. 2011. Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*, 22, 870-6.

- M. JUNGCK, W. F., P. PROPPING 1999. Die genetischen Grundlagen erblicher Tumorkrankheiten des Menschen. *Der Onkologe* Volume 5, pp 855-866.
- MIGHELI, F., STOCCORO, A., COPPEDE, F., WAN OMAR, W. A., FAILLI, A., CONSOLINI, R., SECCIA, M., SPISNI, R., MICCOLI, P., MATHERS, J. C. & MIGLIORE, L. 2013. Comparison study of MS-HRM and pyrosequencing techniques for quantification of APC and CDKN2A gene methylation. *PLoS One*, 8, e52501.
- MIKI, Y., SWENSEN, J., SHATTUCK-EIDENS, D., FUTREAL, P. A., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S., LIU, Q., COCHRAN, C., BENNETT, L. M., DING, W. & ET AL. 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266, 66-71.
- MUSOLINO, A., BELLA, M. A., BORTESI, B., MICHIARA, M., NALDI, N., ZANELLI, P., CAPELLETTI, M., PEZZUOLO, D., CAMISA, R., SAVI, M., NERI, T. M. & ARDIZZONI, A. 2007. BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: a population-based study. *Breast*, 16, 280-92.
- OKADA, S., TOKUNAGA, E., KITAO, H., AKIYOSHI, S., YAMASHITA, N., SAEKI, H., OKI, E., MORITA, M., KAKEJI, Y. & MAEHARA, Y. 2012. Loss of heterozygosity at BRCA1 locus is significantly associated with aggressiveness and poor prognosis in breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 19, 1499-507.
- OSORIO, A., DE LA HOYA, M., RODRIGUEZ-LOPEZ, R., MARTINEZ-RAMIREZ, A., CAZORLA, A., GRANIZO, J. J., ESTELLER, M., RIVAS, C., CALDES, T. & BENITEZ, J. 2002. Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int J Cancer*, 99, 305-9.
- POGODA, K., NIWINSKA, A., MURAWSKA, M. & PIENKOWSKI, T. 2013. Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients. *Med Oncol*, 30, 388.
- RHIEM, K., TODT, U., WAPPENSCHMIDT, B., KLEIN, A., WARDELMANN, E. & SCHMUTZLER, R. K. 2010. Sporadic breast carcinomas with somatic BRCA1 gene deletions share genotype/phenotype features with familial breast carcinomas. *Anticancer Res*, 30, 3445-9.
- RICE, J. C., OZCELIK, H., MAXEINER, P., ANDRULIS, I. & FUTSCHER, B. W. 2000. Methylation of the BRCA1 promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*, 21, 1761-5.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT, G. D. E. K. I. D. E. V. I. Z. M. D. 2012. *Krebs in Deutschland 2007/2008*, Berlin.
- ROUZIER, R., PEROU, C. M., SYMMANS, W. F., IBRAHIM, N., CRISTOFANILLI, M., ANDERSON, K., HESS, K. R., STEC, J., AYERS, M., WAGNER, P., MORANDI, P., FAN, C., RABIUL, I., ROSS, J. S., HORTOBAGYI, G. N. & PUSZTAI, L. 2005. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*, 11, 5678-85.
- SCHAAF, Z. (ed.) 2007. *Basiswissen Humangenetik*.
- SCHNEIDER, B. P., WINER, E. P., FOULKES, W. D., GARBER, J., PEROU, C. M., RICHARDSON, A., SLEDGE, G. W. & CAREY, L. A. 2008. Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res*, 14, 8010-8.
- SCHOUTEN, J. P., MCELGUNN, C. J., WAAIJER, R., ZWIJNENBURG, D., DIEPVENS, F. & PALS, G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 30, e57.
- SHAPIRO, R. & WEISGRAS, J. M. 1970. Bisulfite-catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochem Biophys Res Commun*, 40, 839-43.

- SHAW, R. J., AKUFO-TETTEH, E. K., RISK, J. M., FIELD, J. K. & LILOGLOU, T. 2006. Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res*, 34, e78.
- SILVER, D. P., RICHARDSON, A. L., EKLUND, A. C., WANG, Z. C., SZALLASI, Z., LI, Q., JUUL, N., LEONG, C. O., CALOGRIAS, D., BURAIMOH, A., FATIMA, A., GELMAN, R. S., RYAN, P. D., TUNG, N. M., DE NICOLO, A., GANESAN, S., MIRON, A., COLIN, C., SGROI, D. C., ELLISEN, L. W., WINER, E. P. & GARBER, J. E. 2010. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*, 28, 1145-53.
- SINGH, A. K., PANDEY, A., TEWARI, M., SHUKLA, H. S. & PANDEY, H. P. 2011. Epigenetic silencing of BRCA1 gene associated with demographic and pathologic factors in sporadic breast cancer: a study of an Indian population. *Eur J Cancer Prev*, 20, 478-83.
- SORLIE, T., PEROU, C. M., TIBSHIRANI, R., AAS, T., GEISLER, S., JOHNSEN, H., HASTIE, T., EISEN, M. B., VAN DE RIJN, M., JEFFREY, S. S., THORSEN, T., QUIST, H., MATESE, J. C., BROWN, P. O., BOTSTEIN, D., LONNING, P. E. & BORRESEN-DALE, A. L. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10869-74.
- SORLIE, T., TIBSHIRANI, R., PARKER, J., HASTIE, T., MARRON, J. S., NOBEL, A., DENG, S., JOHNSEN, H., PESICH, R., GEISLER, S., DEMETER, J., PEROU, C. M., LONNING, P. E., BROWN, P. O., BORRESEN-DALE, A. L. & BOTSTEIN, D. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8418-23.
- STEFANSSON, O. A., JONASSON, J. G., OLAFSDOTTIR, K., HILMARSDOTTIR, H., OLAFSDOTTIR, G., ESTELLER, M., JOHANNSSON, O. T. & EYFJORD, J. E. 2011. CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics*, 6, 638-49.
- THE BREAST CANCER LINKAGE CONSORTIUM 1999. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*, 91, 1310-6.
- TURNER, N. C. & REIS-FILHO, J. S. 2006. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*, 25, 5846-53.
- TURNER, N. C., REIS-FILHO, J. S., RUSSELL, A. M., SPRINGALL, R. J., RYDER, K., STEELE, D., SAVAGE, K., GILLETT, C. E., SCHMITT, F. C., ASHWORTH, A. & TUTT, A. N. 2007. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*, 26, 2126-32.
- TUTT, A., ROBSON, M., GARBER, J. E., DOMCHEK, S. M., AUDEH, M. W., WEITZEL, J. N., FRIEDLANDER, M., ARUN, B., LOMAN, N., SCHMUTZLER, R. K., WARDLEY, A., MITCHELL, G., EARL, H., WICKENS, M. & CARMICHAEL, J. 2010. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*, 376, 235-44.
- VASILATOS, S. N., BROADWATER, G., BARRY, W. T., BAKER, J. C., JR., LEM, S., DIETZE, E. C., BEAN, G. R., BRYSON, A. D., PILIE, P. G., GOLDENBERG, V., SKAAR, D., PAISIE, C., TORRES-HERNANDEZ, A., GRANT, T. L., WILKE, L. G., IBARRA-DRENDALL, C., OSTRANDER, J. H., D'AMATO, N. C., ZALLES, C., JIRTLE, R., WEAVER, V. M. & SEEWALDT, V. L. 2009. CpG island tumor suppressor promoter methylation in non-BRCA-associated early mammary carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 901-14.
- VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., SMITH, H. O., YANDELL, M., EVANS, C. A., HOLT, R. A., GOCAYNE, J. D.,

- AMANATIDES, P., BALLEW, R. M., HUSON, D. H., WORTMAN, J. R., ZHANG, Q., KODIRA, C. D., ZHENG, X. H., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P. D., ZHANG, J., GABOR MIKLOS, G. L., NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A. G., NADEAU, J., MCKUSICK, V. A., ZINDER, N., LEVINE, A. J., ROBERTS, R. J., SIMON, M., SLAYMAN, C., HUNKAPILLER, M., BOLANOS, R., DELCHER, A., DEW, I., FASULO, D., FLANIGAN, M., FLOREA, L., HALPERN, A., HANNENHALLI, S., KRAVITZ, S., LEVY, S., MOBARRY, C., REINERT, K., REMINGTON, K., ABU-THREIDEH, J., BEASLEY, E., BIDDICK, K., BONAZZI, V., BRANDON, R., CARGILL, M., CHANDRAMOULISWARAN, I., CHARLAB, R., CHATURVEDI, K., DENG, Z., DI FRANCESCO, V., DUNN, P., EILBECK, K., EVANGELISTA, C., GABRIELIAN, A. E., GAN, W., GE, W., GONG, F., GU, Z., GUAN, P., HEIMAN, T. J., HIGGINS, M. E., JI, R. R., KE, Z., KETCHUM, K. A., LAI, Z., LEI, Y., LI, Z., LI, J., LIANG, Y., LIN, X., LU, F., MERKULOV, G. V., MILSHINA, N., MOORE, H. M., NAIK, A. K., NARAYAN, V. A., NEELAM, B., NUSSKERN, D., RUSCH, D. B., SALZBERG, S., SHAO, W., SHUE, B., SUN, J., WANG, Z., WANG, A., WANG, X., WANG, J., WEI, M., WIDES, R., XIAO, C., YAN, C., et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science*, 291, 1304-51.
- WANG, R. Y., GEHRKE, C. W. & EHRLICH, M. 1980. Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res*, 8, 4777-90.
- WATT, F. & MOLLOY, P. L. 1988. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev*, 2, 1136-43.
- WEI, J., HAN, B., MAO, X. Y., WEI, M. J., YAO, F. & JIN, F. 2012. Promoter methylation status and expression of estrogen receptor alpha in familial breast cancer patients. *Tumour Biol*, 33, 413-20.
- WEI, M., GRUSHKO, T. A., DIGNAM, J., HAGOS, F., NANDA, R., SVEEN, L., XU, J., FACKENTHAL, J., TRETIAKOVA, M., DAS, S. & OLOPADE, O. I. 2005. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast cancer is associated with reduced BRCA1 copy number and chromosome 17 aneusomy. *Cancer Res*, 65, 10692-9.
- XU, Y., DIAO, L., CHEN, Y., LIU, Y., WANG, C., OUYANG, T., LI, J., WANG, T., FAN, Z., FAN, T., LIN, B., DENG, D., NAROD, S. A. & XIE, Y. 2013. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*, 24, 1498-505.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Primer und deren Sequenz.....	27
Tab. 2: Verwendete molekularbiologische Kits mit Herstellerangaben.....	28
Tab. 3: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben.....	29
Tab. 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben	30
Tab. 5: Verwendete Lösungen, Puffer und Medien mit dem jeweiligen Herstellungsverfahren	31
Tab. 6: Verwendeter Bakterienstamm mit Herstellerangabe.....	32
Tab. 7: Verwendetes Enzym	33
Tab. 8: verwendetes Gebrauchsmaterial inklusive Herstellerangaben	33
Tab. 9: Aufstellung der Methylierungsergebnisse (N=170).....	52
Tab. 10: Aufstellung der Kopienanzahlveränderungen.	55
Tab. 11: Klinische Parameter des Patientenkollektivs	57
Tab. 12: Überlebensanalyse für das rezidivfreie Intervall.....	60
Tab. 13: Überlebensanalyse für das Gesamtüberleben.	62
Tab. 14: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Kreuztabellen.....	67
Tab. 15: Prognostische Faktoren für das rezidivfreie Intervall bei TNBC..	72
Tab. 16: Multivariate Cox-Regression nach Firth für das rezidivfreie Intervall.	74
Tab. 17: Multivariate Cox-Regression für das Gesamtüberleben.	74
Tab. 18: Prognostische Faktoren für das Gesamtüberleben bei TNBC.	75
Tab. 19: Überleben nach 12, 24, 36 und 60 Monaten nach OP mit und ohne Deletion.....	97
Tab. 20: Rezidivfreie Patientinnen nach 12, 24, 36 und 60 Monaten nach OP mit und ohne Deletion.	97

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: 2-Hit-Hypothese von Knudson (eigene Darstellung)	15
Abb. 2: Mechanismen Methylierungs-vermittelter Genrepression (Klose und Bird, 2006)	20
Abb. 3: Bisulfit-modifizierte Promotorsequenz des BRCA1-Gens.....	26
Abb. 4: Schematische Darstellung der Konvertierungsreaktion durch Natrium-Bisulfit (Clark et al, 1994)	34
Abb. 5: Aufbau des Plasmidvektors pCR 2.1 (invitrogen, instruction manual).....	43
Abb. 6: Funktionsprinzip MLPA (verändert nach Schouten et al., 2002)..	45
Abb. 7: Analyse des Methylierungsstatus anhand einer Verdünnungsreihe der Positivkontrollen auf dem Lightcycler 481	51
Abb. 8: Ergebnisse der Klonierung	53
Abb. 9: Darstellung der Methylierungsanalyse der klonierten Proben auf dem Lightcycler 480	54
Abb. 10: Analyse der Kopienanzahl im BRCA1-Gen mittels MLPA.....	56
Abb. 11: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls.	61
Abb. 12: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich der TumorgroÙe.	63
Abb. 13: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich des Nodalstatus.....	64
Abb. 14: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich des Alters.	64
Abb. 15: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich des Menopausenstatus.	65
Abb. 16: Kaplan-Meier-Analyse des Gesamtkollektivs hinsichtlich bei Patientinnen mit und ohne interkalierende Chemotherapie.	65
Abb. 17: Kaplan-Meier Überlebensfunktion zum rezidivfreien Intervall hinsichtlich der Methylierung.	69
Abb. 18: Kaplan-Meier Überlebensfunktion zum Gesamtüberleben hinsichtlich der Methylierung.	70

Abb. 19: Kaplan-Meier-Analysen des Gesamtüberlebens und des rezidivfreien Intervalls hinsichtlich der Kopienanzahlveränderungen im BRCA1-Gen..... 71

Anhang

Tab. 19: Überleben nach 12, 24, 36 und 60 Monaten nach OP mit und ohne Deletion.

Beobachtungszeit in Monaten	Überlebende Patientinnen in % (Standardfehler) Mit Deletion	Überlebende Patientinnen in % (Standardfehler) ohne Deletion
12	93,2 (3,8)	100 (0)
24	84,1 (5,5)	96,5 (2,4)
36	79,5 (6,1)	89,4 (4,1)
60	72,1 (6,9)	79,1 (5,7)

Tab. 20: Rezidivfreie Patientinnen nach 12, 24, 36 und 60 Monaten nach OP mit und ohne Deletion.

Beobachtungszeit in Monaten	Rezidivfreie Patientinnen in % (Standardfehler in %) Mit Deletion	Rezidivfreie Patientinnen in % (Standardfehler in %) ohne Deletion
12	93,0 (3,9)	96,6 (2,4)
24	80,2 (6,3)	94,8 (2,9)
36	77,6 (6,6)	85,7 (4,7)
60	74,8 (6,9)	78,6 (5,9)