

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Gynäkologie der Medizinischen Fakultät
der **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
(Direktor: Professor Dr. med. Christoph Thomssen)

Prävalenz von PIK3CA-Genmutationen beim Mammakarzinom

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Kristin Reinhardt

geboren am 15.09.1989 in Jena

04.07.2017

25.04.2018

Gutachter:

Prof. Dr. med. C. Thomssen

Prof. Dr. med. P. Fasching

PD Dr. rer. nat. F. Bartel

Für meine Familie

Referat

Das Thema der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Prävalenz von Genmutationen der katalytischen Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (kurz: PI3K; Gen: PIK3CA) beim Mammakarzinom. Es wurde der somatische Mutationsstatus einer repräsentativen Kohorte von Brustkrebspatientinnen für die beiden häufigsten Punktmutationen c.3140 A > G (Cosmic ID C 775, Exon 20, H1047R) und c.1633 G > A (Cosmic ID C 763, Exon 9, E545K) untersucht.

Das Ziel der Arbeit ist es, neben der Prävalenz dieser Mutationen auch ihre Assoziationen zu klinischen, pathologischen und tumorbiologischen Eigenschaften zu untersuchen.

Der Mutationsstatus wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Zum einen wurde eine konventionelle PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau und gelelektrophoretischer Auftrennung der Enzymverdaufragmente angewandt. Zusätzlich wurde eine quantitative Echtzeit-PCR eingesetzt (TaqMan®-Hydrolisierungs sonden, Fa. Life Technologies, Carlsbad, CA). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 22. Die Zusammenhänge zwischen Mutationsstatus und klinischen, pathologischen und tumorbiologischen Eigenschaften wurden mittels binärer logistischer Regression ermittelt.

Es wurden insgesamt 806 Tumoren (100 %) untersucht. Bei 205 (25,4 %) Tumoren fanden sich Mutationen im Bereich der untersuchten Loci: 136 Tumoren trugen die Mutation C775, 71 Tumoren zeigten die Mutation C763 und zwei Tumoren wiesen beide Mutationen auf.

In der univariaten Betrachtung zeigte sich keine statistisch signifikante Assoziation zwischen Mutationsstatus und Alter, Menopausenstatus, Tumorgroße, Nodalstatus, histologischem Typ, (lymphovaskulärer Invasion), Gefäßinvasion, Hormonrezeptor-/HER2-Status. Es ergab sich in der univariaten Betrachtung eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem Mutationsstatus und dem Grading, dem Hormonrezeptorstatus-Status und dem HER2-Status. Multivariat ergab sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Mutationsstatus und dem Grading, sowie für den Mutationsstatus und den Progesteronrezeptorstatus

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass in der vorliegenden Arbeit das Vorhandensein der beiden untersuchten PIK3CA-Genmutationen mit prognostisch-günstigen Tumoreigenschaften (niedriges Grading, positiver Hormonrezeptorstatus, positiver Progesteronrezeptorstatus, negativer HER2-Status) assoziiert war.

Reinhardt, Kristin: Die Prävalenz von PIK3CA-Genmutationen beim Mammakarzinom, Halle (Saale), Univ., Med. Fak.; Diss., 77 Seiten, 2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1.	Epidemiologie des Mammakarzinoms.....	1
1.2	Pathologie des Mammakarzinoms	1
1.2.1	TNM-Klassifikation.....	1
1.2.2	Histologischer Typ	1
1.2.3	Grading	2
1.2.4	Hormonrezeptorstatus	2
1.2.5	Human-Epidermal-Growth-Factor-Receptor 2 (HER2)	3
1.3	Therapie des Mammakarzinoms	3
1.4	Prognostische und prädiktive Faktoren des Mammakarzinoms	4
1.5	Risikoalgorithmen beim Mammakarzinom	5
1.6	Die intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms.....	6
1.7	Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks).....	8
1.7.1	Die Familie der PI3K.....	8
1.7.2	Die PI3K-Signalkaskade.....	10
1.7.3	Die katalytische Untereinheit p110 α	11
1.7.4	Genetische Aberrationen der PI3K/Akt-Signalkaskade	13
2	Zielsetzung der Arbeit	15
3	Material & Methoden	16
3.1	Die untersuchte Kohorte	16
3.2	Klinische Eigenschaften der untersuchten Kohorte	17
3.3	Tumorbiologische Eigenschaften der untersuchten Tumorproben	17
3.4	Zelllinien	17
3.5	Chemikalien & Geräte	18
3.6	DNA-Isolation	21
3.6.1	DNA-Isolation aus Tumorgewebe.....	21
3.6.2	DNA-Isolation aus Blutzellen (Phenol-Chloroform-Extraktion)	22
3.7	Konventionelle PCR mit anschließendem Restriktionsverdau.....	23
3.7.1	Die Polymerase-Kettenreaktion	23
3.7.2	Herstellung des PCR-Mastermix und Restriktionsenzymverdau	24
3.7.3	Agarosegel zur Auftrennung der Fragmente	24
3.7.4	Auswertung und Dokumentation	25
3.7.5	Mutation Cosmic ID C775; c.3140A>G; H1047R.....	25

3.7.6	Mutation Cosmic ID C763; c. 1633 G>A; E545K.....	26
3.8	Die quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR, qPCR).....	28
3.8.1	Prinzip der TaqMan® Mutation Detection Assay.....	28
3.8.2	Experimenteller Ablauf.....	30
3.9	Statistische Auswertung	31
4	Ergebnisse	33
4.1	Auswertung der TaqMan®-qPCR	33
4.2	PIK3CA Genmutationen als somatische Mutation	33
4.3	Beschreibung der untersuchten Tumoren in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	34
4.3.1	Klinische Parameter der Patientinnen (Alter, Menopausenstatus) in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	35
4.3.2	Histopathologische Parameter der Tumoren in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	35
4.4	Die Binäre Logistische Regression (Univariate Betrachtung)	37
4.4.1	Assoziationen zwischen der TumorgroÙe und dem Mutationsstatus	37
4.4.2	Assoziationen zwischen dem Nodalstatus und dem Mutationsstatus	37
4.4.3	Assoziationen zwischen dem Grading und dem Mutationsstatus.....	38
4.4.4	Assoziationen zwischen dem histologischen Typ und dem Mutationsstatus.....	38
4.4.5	Assoziationen zwischen der GefäÙinvasion und dem Mutationsstatus	39
4.4.6	Assoziationen zwischen dem Rezeptorstatus (HR, HER2) und dem Mutationsstatus	39
4.4.7	Assoziationen zwischen dem uPA/PAI-1-Status und dem Mutationsstatus.....	40
4.5	Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung)	41
4.5.1	Modell 1	42
4.5.2	Modell 2	42
4.5.3	Modell 3	43
4.6	Assoziationen zwischen klinischen Risikoalgorithmen und dem Mutationsstatus	43
4.7	Immunhistochemisch-bestimmte Subtypen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus	44
4.8	Assoziationen zwischen klinischen, pathologischen Parametern und der Mutation H1047R	45
4.8.1	Die Binäre Logistische Regression (Univariate Betrachtung)	45
4.8.2	Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung)	47
4.9	Assoziationen zwischen klinischen, pathologischen Parametern und der Mutation E545K.....	48
4.9.1	Die Binäre Logistische Regression (Univariate Betrachtung)	48

4.9.2	Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung): Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, HR-Status, HER2-Status, uPA/PAI-1-Status.....	49
4.9.3	Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung): Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, ER-Status, PgR-Status, HER2-Status, uPA/PAI-1-Status.....	50
4.9.4	Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung): Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, HR/HER2-Status; uPA/PAI-1-Status	50
5	Diskussion.....	51
5.1	Das untersuchte Kollektiv.....	51
5.2	Prävalenz der PIK3CA-Genmutationen beim Mammakarzinom	51
5.3	Die PCR als Methode zur Ermittlung des Mutationsstatus.....	52
5.4	PIK3CA-Genmutationen als somatische Mutation	53
5.5	Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und klinischen, pathologischen Parametern.....	53
5.5.1	Alter und Menopausenstatus.....	53
5.5.2	Tumorgröße.....	54
5.5.3	Nodalstatus	54
5.5.4	Grading.....	55
5.5.5	Histologischer Typ	55
5.5.6	Hormonrezeptor-Status	55
5.5.7	HER2-Status	56
5.6	Prognostische Bedeutung der PIK3CA-Genmutationen	56
5.7	Prädiktive Bedeutung der PIK3CA-Genmutationen.....	57
5.7.1	Endokrine Resistenz	57
5.7.2	HER2-gerichtete Therapie-Resistenz	58
5.8	PIK3CA als target of therapy - PI3K-Inhibitoren	58
5.8.1	BKM120 (Buparlisib).....	59
5.8.2	Weitere PI3K-Inhibitoren.....	60
6	Zusammenfassung.....	62
7	Literaturverzeichnis.....	63
8	Thesen.....	74
9	Lebenslauf	75
10	Selbstständigkeitserklärung	76
11	Danksagung.....	77

II. Abkürzungsverzeichnis

A-/T-basiertes Regime	-	Anthrazyklin-/ Taxan-basiertes Regime
Abb.	-	Abbildung
ABD	-	Adaptor-binding-domain
ADH	-	Atypische duktale Hyperplasie
AE-Puffer	-	Elutionspuffer der Firma Qiagen
AGO	-	Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V.
AI	-	Aromataseinhibitor
AL-Puffer	-	Lysepuffer der Firma Qiagen
ASCO	-	American Society of Clinical Oncology
AT	-	Anthrazykline, Taxane
ATL-Puffer	-	Gewebe-Lysepuffer der Firma Qiagen
ATP	-	Adenosintriphosphat
AW-Puffer	-	Waschpuffer der Firma Qiagen
BAD	-	Bcl-2 associated death promoter
Bcl-2	-	B-cell lymphoma 2
BCM	-	Breastcancer-specific mortality
BET	-	Brust-erhaltende Therapie
BLR	-	Binäre logistische Regression
BMI	-	Body-Mass-Index
Bp	-	Basenpaar(e)
BT-20	-	humane Brustkrebszelllinie („breast tumor“)
c.	-	coding DNA
C2-Domäne	-	konservierte Domäne (“conserved domain”)
CIS	-	Karzinoma in-situ
COSMIC ID	-	Catalogue of somatic mutations in cancer internal database identifier
CP	-	klinisch pathologisch (“clinical, pathological“)
CT	-	Cycle threshold
CT	-	Computertomographie
DCIS	-	Duktales Carcinoma in-situ
DDFS	-	Distant Disease-free Survival
DFS	-	Disease-free Survival
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure

EBCTCG	-	Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group
ER	-	Estrogen-Rezeptor (=Östrogenrezeptor)
EtBr	-	Ethidiumbromid
ETC-Regime	-	Epirubicin, Paclitaxel, Cyclophosphamid-Regime
FAM	-	6-Carboxyfluorescein (6-FAM)
FOXO	-	Forkhead Box Class O
FRET	-	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
G	-	Grading
G-CSF	-	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GnRH	-	Gonadotropine-Releasing-Hormone
GPCR	-	G-protein-coupled receptor
GSK-1	-	Glykogen-Synthase-Kinase 1
HER2	-	Human epidermal growth factor receptor 2
HR	-	Hormonrezeptor
InvBc	-	Invasives Mammakarzinom
IRS	-	Immunreaktiver Score
IRS1	-	Insulin receptor substrate 1
ISH	-	In-Situ Hybridisierung
iSH2	-	Inter-SH2-Domäne
Ki-67	-	Proliferationsmarker (Ki=Kiel, 67=Nummer der 96-Wellplatte)
LI	-	Lymphovaskuläre Invasion
LCIS	-	Lobuläres Carcinoma in-situ
LIN	-	Lobuläre Intraepitheliale Neoplasie
LK	-	Lymphknoten
LVI	-	Lymphovascular invasion
MCF-7	-	Brustkrebszelllinie ("Michigan Cancer Foundation – 7")
MDA	-	Brustkrebszelllinie
MDM2	-	Mouse Double Minute 2
mic		micro
MRT	-	Magnetresonanztomographie
mTORC1	-	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	-	Mammalian target of rapamycin complex 2
NACT	-	Neoadjuvante Chemotherapie
NNBC-3	-	"Node Negative Breast Cancer" Studie 3
Nicht-RTKs	-	Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinase

NOS	-	Not otherwise specified
NSABP	-	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
NST	-	no special type
OR	-	Odds Ratio
OS	-	Overall Survival
PAI-1	-	Plasminogen-Activator-Inhibitor Typ 1
pCR	-	pathologische Komplettremission
PCR	-	Polymerase-Chain-Reaction
PDK-1	-	Phosphoinositide dependent protein kinase-1
PgR	-	Progesteron-Rezeptor
PH	-	Pleckstrin homology domain
PI	-	Phosphatidylinositol
PI-3,4,5-P3	-	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PI3K	-	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PI-3-P	-	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI-4,5-P2	-	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PI-4-P	-	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PiA	-	“Prognose-im-Alltag” (Studie)
PKB	-	Proteinkinase B
PTEN	-	Phosphatase and Tensin homolog
qRT-PCR	-	quantitative Real-Time PCR
R	-	Reportersignal
Ras	-	Rat sarcoma, kleines G-Protein
RBD	-	Ras-binding-domain
ROX	-	6-Carboxy-X-Rhodamin
RTK	-	Rezeptor-Tyrosinkinase
SH2	-	Src-homology 2-domain
SNP	-	Single nucleotide polymorphism
Tab.	-	Tabelle
TAMRA	-	Tetramethylrhodamin
TNBC	-	Tripel-negative Breast Cancer
TNM	-	Tumor-Nodalstatus-Metastasen
TSC1/TSC2	-	Tuberous sclerosisproteins 1 / 2
UP-Algorithmus		uPA-/PAI-1-Algorithmus
uPA	-	urinary Plasminogen Activator

II. Abkürzungsverzeichnis

UTR	-	Untranslatierte Region
VI	-	Vascular Invasion
WHO	-	World-Health-Organization
Z.n.	-	Zustand nach

1 Einleitung

1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist mit einer Inzidenz von 69.550 (aktuelle Daten für das Jahr 2012, Stand 12/2015) die häufigste Krebserkrankung in Deutschland. Laut Angaben des Robert-Koch-Instituts erkrankt heutzutage jede achte Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. (Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2013).

1.2 Pathologie des Mammakarzinoms

Dabei ist das Mammakarzinom eine ausgesprochen heterogene Erkrankung. Die Tumoren unterscheiden sich im Hinblick auf tumorbiologische und pathologische Eigenschaften, sowie bezüglich des Ansprechens auf medikamentöse Therapiekonzepte und des Überlebens.

1.2.1 TNM-Klassifikation

Die Beschreibung der Tumoren erfolgt anhand der internationalen TNM-Klassifikation nach Wittekind und Meyer. Sie umfasst die Tumorgröße (T), die Lymphknotenbeteiligung (Nodalstatus, N), sowie die Fernmetastasierung (Metastasierung, M; nach Wittekind und Meyer, 2010).

1.2.2 Histologischer Typ

Die Beschreibung des histologischen Phänotyps des Mammakarzinoms erfolgt anhand der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (world health organisation, kurz WHO). *

Sie unterscheidet zunächst zwischen der nicht-invasiven Vorläuferläsion, dem sogenannten Carcinoma in situ (CIS), und der invasiven Form. Dabei gilt ein Tumor als invasiv, sobald er die Basalmembran des Epithels durchbricht. Unter den Vorläuferläsionen unterscheidet man das duktale und das lobuläre CIS. Beim invasiven Mammakarzinom werden entsprechend der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2003 verschiedene histologische Subtypen unterschieden. Am häufigsten tritt das invasiv-duktales, nicht näher bezeichnete (not otherwise specified = NOS, auch als no special type=NST bezeichnet) Karzinom auf (40-75 %). Ihm folgt das invasiv-lobuläre Mammakarzinom, welches in 5-15% aller Mammakarzinome zu finden ist. Desweiteren unterscheidet man das tubuläre (2-7 %), das medulläre (1-7%), das muzinöse (1-2 %) und andere histologische Subtypen des Mammakarzinoms. Einige dieser histologischen Typen, wie beispielsweise das tubuläre und das kribbriforme Mammakarzinom, scheinen mit einer besseren Prognose assoziiert zu sein (Tavassoli F.A. und Devilee P, 2003; Lebeau et al., 2014).

* Die Tumorcharakteristika der Patientinnen der in dieser Arbeit analysierten Proben wurden entsprechend der WHO-Klassifikation der Mammakarzinome aus dem Jahr 2003 bewertet. Es sei darauf hingewiesen, dass dies nicht der aktuellen Einteilung der WHO entspricht. Folglich können Nomenklaturen etc. vom aktuellen Stand der Wissenschaft abweichen.

1.2.3 Grading

Die histopathologische Graduierung (Englisch: Grading) bezeichnet den Differenzierungsgrad der Tumorzellen in Bezug zum normalen Gewebe. Sie wird entsprechend der Einteilung nach Elston und Ellis (Elston und Ellis, 1991) vorgenommen. Als Kriterien werden hierbei die Tubulusausbildung, die Kernpolymorphie und die Mitoserate betrachtet und mit einem Zahlenwert von 1-3 bewertet. Entsprechend dieser drei Bewertungen ergibt sich ein Score-Wert, der für einen entsprechenden Differenzierungsgrad steht: 3-5 Punkte - gut differenziert (G1), 6-7 Punkte - mäßig differenziert (G2) und 8-9 Punkte - schlecht differenziert (G3). Elston und Ellis (1991) konnten in ihrer Veröffentlichung einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem Grading und der Prognose aufweisen. Dabei korrelierte ein hohes Grading ist mit einem schlechteren Gesamtüberleben und einem kürzeren Rezidiv-freien Intervall (Elston und Ellis, 1991). Schwartz und Kollegen (2014) konnten in ihrer Arbeit zur prognostischen Bedeutung des Gradings zeigen, dass unabhängig von der Tumorgroße und vom Nodalstatus ein höheres Grading mit einer schlechteren 10-Jahres-Überlebensrate assoziiert ist (Schwartz et al., 2014).

1.2.4 Hormonrezeptorstatus

Entsprechend den Empfehlungen der AGO e.V. wird im Rahmen der Primärdiagnostik bei allen invasiven Mammatumoren die Expression des Östrogenrezeptors (ER) sowie des Progesteronrezeptors (PgR) untersucht. Dabei hat sich der immunhistochemische Nachweis der kernständigen Rezeptoren mittels speziell markierter Antikörper durchgesetzt.

Für eine einheitliche Bewertung der Untersuchungsergebnisse stehen Scores zur Verfügung, z.B. der Score nach Remmele und Stegner. Dabei bewertet man die Färbintensität (0-3 Punkte) und den Prozentsatz an positiv-gefärbten Zellkernen (0-4 Punkte). Durch Multiplikation dieser beiden Werte ergibt sich ein Score zwischen 0 und 12. Ein Wert von 0 bis 2 spricht für einen negativen Hormonrezeptorstatus, Werte >2 für einen positiven Hormonrezeptorstatus (Remmele W., Stegner H.E., 1987).

Die Grenzwerte ab wann ein Tumor als rezeptorstatus-positiv gewertet wird, stehen gegenwärtig in der Diskussion. Entsprechend den aktuellen Leitlinien der AGO e.V. (2016) wird ab 1 % positiv gefärbter Zellkerne (ER-Status) bzw. ab 10 % gefärbter Zellkerne (PgR) von einem positiven Rezeptorstatus gesprochen. In einer Empfehlung der American Society of Clinical

Oncology (ASCO) werden Tumoren mit ≥ 1 % positiv gefärbter Zellen sowohl in Hinblick auf den ER-Status als auch auf den PgR-Status als positiv gewertet (Hammond et al., 2010). Die Bedeutung des Hormonrezeptorstatus liegt zum einen in seinem prognostischen Aussagewert und zum anderen in der Therapieentscheidung.

1.2.5 Human-Epidermal-Growth-Factor-Receptor 2 (HER2)

Die Bestimmung des HER2-Status eines Tumors wird entsprechend der Leitlinien der AGO e.V. und der ASCO für alle invasiven Mammakarzinome empfohlen (Wolff et al., 2014). Ein positiver HER2-Status kann als Genamplifikation des HER2-Gens oder als Überexpression des dazugehörigen Proteins auftreten (Slamon et al., 1987). Gemäß der Empfehlungen der AGO e.V. werden Genamplifikationen mittels *in-situ*-Hybridisierung (ISH) und eine Überexpression des HER2-Proteins mittels immunhistochemischer Methode bestimmt. HER2 zählt zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und reguliert zelluläre Prozesse wie Zellüberleben, Wachstum und Differenzierung (Dawood et al., 2009). In 10-34 % aller primären Brustkrebstumoren liegt ein positiver HER2-Status vor (Slamon et al., 1987; Ross und Fletcher, 1998). Studien zeigten, dass ein positiver HER2-Status mit einer schlechteren Prognose, beispielsweise in Hinblick auf das metastasenfreie Überleben (DDFS), assoziiert ist. So zeigten Joensuu et al. (2003) für Patienten mit HER2-positiven Tumoren ein 9-Jahres-DDFS von 73 %, während Patienten mit negativem HER2-Status ein 9-Jahres-DDFS von 89 % ($p=0,0003$) zeigten.

1.3 Therapie des Mammakarzinoms

Die Therapiemöglichkeiten des Mammakarzinoms wurden in den vergangenen Jahren erheblich weiterentwickelt und optimiert. Ziel ist es, eine auf die Patientin abgestimmte Behandlung zu ermöglichen.

Es stehen die primäre operative Therapie und die primäre systemische Therapie zur Verfügung. Bei den operativen Verfahren gilt die brusterhaltende Therapie (BET) mit anschließender Bestrahlung als Standardverfahren. Diese Möglichkeit ist abzugrenzen von der Mastektomie. Bei der Mastektomie wird ein spindelförmiges Hautareal, der Drüsenkörper und Fettgewebe entfernt.

Als primär systemische Therapie (syn. „neoadjuvant“, „präoperativ“, kurz NACT) bezeichnet man den Einsatz von Medikamenten vor der Durchführung einer operativen Maßnahme.

Eine weitere Säule der Therapie stellt die Radiotherapie dar. Sie dient zum einen der Reduktion lokoregionärer Rezidive nach einer Brustoperation. Studien belegen eine Gleichwertigkeit bezüglich des Gesamtüberlebens der BET mit anschließender Bestrahlung der Brust im Vergleich zur radikal modifizierten Mastektomie (Fisher et al., 2002; Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische

Onkologie e.V., 2016). Des Weiteren kann eine örtliche Bestrahlungsbehandlung zur Therapie krankheitsbedingter Schmerzen, z.B. durch Knochenmetastasen, eingesetzt werden.

Eine mögliche Systemtherapie kann auch adjuvant, d.h. nach der Durchführung einer Operation angewendet werden. Sie umfasst endokrine, zytostatische und zielgerichtete Therapeutika. Ziel ist es, das Risiko einer systemischen Ausbreitung der Krebserkrankung mit der Ausbildung von Metastasen zu vermeiden. In der nachstehenden Tabelle 1 sind einmal als Übersicht die wichtigsten Säulen der Therapie beim Mammakarzinom dargestellt.

Tab. 1: Die Therapiesäulen des Mammakarzinoms

Operative Therapie	Radiotherapie	Systemtherapie (adjuvant / neoadjuvant)
Mamma-Chirurgie - Brusterhaltende Therapie (BET) - Mastektomie Rekonstruktive Chirurgie Lymphknoten- Chirurgie - Entfernung des Wächterlymphknotens - Axilladissektion	Strahlentherapie - fraktioniert vs. hypofraktioniert Strahlentherapie als sympt. Therapie	Chemotherapie - Anthrazyklin/ Taxan-basiertes Regime - Weitere Zytostatika Endokrine Therapie - Tamoxifen - Aromatase-Inhibitoren - GnRH-Analoga Zielgerichtete Therapeutika - Anti-HER2-Therapie (Trastuzumab, Pertuzumab) - CDK-Inhibitoren (z.B. Palbociclib)

1.4 Prognostische und prädiktive Faktoren des Mammakarzinoms

Gegenstand der modernen Medizin ist es, die biologischen Eigenschaften des Tumors zu bestimmen, um eine individuell abgestimmtes Therapiekonzept einzuleiten. Ausschlaggebend sind dabei sogenannte Prognosefaktoren, die einen Hinweis auf den möglichen Krankheitsverlauf geben. Prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf bestimmte Therapeutika sind ebenso von großer Bedeutung.

Ziel ist es, mittels prognostischer und prädiktiver Faktoren eine individuelle Therapieentscheidung im klinischen Alltag zu treffen. So soll bei Hinweisen auf einen günstigen Krankheitsverlauf mit einem geringen Rückfallrisiko eine Übertherapie vermieden werden, aber bei aggressiveren Formen des Mammakarzinoms jede therapeutische Möglichkeit ausgeschöpft werden. Gleichzeitig dienen Biomarker auch als Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer

Medikamente. Die folgende Tabelle 2 listet die etablierten Prognosefaktoren beim Mammakarzinom auf.

In der modernen Medizin wird nach immer neuen Biomarkern gesucht, die ein besseres Verständnis der Eigenschaften von Tumoren ermöglichen und letztlich Therapieentscheidungen im klinischen Alltag erleichtern sollen.

Tab. 2: Prognosefaktoren des Mammakarzinoms (nach den Leitlinien der AGO e.V., 2016)

• Vorliegen von Fernmetastasen	
• Alter	(Nixon et al., 1994)
• TumorgroÙe	(Chia et al., 2004)
• Lymphknotenstatus	(Fisher et al., 1983)
• Grading	(Cianfrocca, 2004).
• Histologischer Typ	(Tavassoli F.A. und Devilee P, 2003; Lebeau et al., 2014)
• Pathologische Komplettremission (pCT) nach NACT	
• Einbruch in Lymph-/BlutgefäÙe (Schoppmann et al., 2004; Kurz et al., 1994).).	
• Übergewicht (BMI>30 kg/m ²)	(Robinson et al., 2014)
• Proliferationsmarker (Ki-67)	(Brown et al., 1996; Denkert et al., 2013))
• Hormonrezeptorstatus	(Fisher et al., 1988)
• HER2-Status	(Dawood et al., 2009; Slamon et al., 1987)
• uPA/PAI-1 (bei N0)	(Jänicke et al. 1993; Harbeck et al. 2013)

1.5 Risikoalgorithmen beim Mammakarzinom

Um dieses individuelle Risiko einschätzen zu können, werden die bereits beschriebenen prognostischen und prädiktiven Faktoren sowie Biomarker zu Rate gezogen. Im Hinblick auf die Risikostratifizierung gibt es unterschiedliche Algorithmen, die beim Mammakarzinom zu Rate gezogen werden. Eine Übersicht gibt die Tabelle 3.

Tab. 3: Übersicht über verschiedene Risikoalgorithmen beim Mammakarzinom

Risiko	Nach St. Gallen 2007 (Goldhirsch, 2007)	Nach klinischen, pathologischen Eigenschaften nach der NNBC 3-Europe Studie (Schmidt et al., 2009)	Mittels uPA/PAI-1- Werten nach der NNBC 3-Europe Studie (Kantelhardt et al., 2011)
Niedriges Risiko	alle folgenden Kriterien: pN0, G1, T ≤ 2cm, HR+, HER2-, V0, L0, Alter ≥ 35 Jahre	alle folgenden Kriterien: N0, G1, HR+, HER2-, V0, L0, Alter ≥ 35 Jahre Oder: N0, G2, HR+, HER2-, V0, L0, Alter ≥ 35 Jahre und pT ≤ 2cm	N0, G1 Oder: N0, G2, Alter ≥ 35 Jahre, uPA und PAI-1 niedrig
Mittleres Risiko	N0 und mindestens ein Risiko: G2-3, T > 2cm, HER2+, HR-, V1, L1, Alter < 35 Jahre Oder: N1, HR+, HER2-		
Hohe Risiko	N > N 1 Oder: N1, HR- Oder: N1, HER2+	N+ Oder: N0, G2, HR+, HER2-, V0, L0, Alter ≥ 35 Jahre und pT > 2cm Oder: N0 und mind. ein Risiko: G3, T > 2cm, HER2+, HR-, (ER+/PgR-), V1, L1, Alter < 35 Jahre	N+ Oder: N0, G3 Oder: N0, G2, Alter < 35 Jahre Oder: N0, G2, Alter ≥ 35 Jahre, uPA und / oder PAI-1 erhöht

1.6 Die intrinsischen Subtypen des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist eine heterogene Erkrankung. Auf der Grundlage unterschiedlicher molekularbiologischer bzw. immunhistochemischer Eigenschaften werden die intrinsischen Subtypen unterschieden (siehe Tab. 4; Perou et al., 2000) Das Wissen um die tumorbiologischen Eigenschaften der Tumoren beeinflusst die Therapieentscheidung, aber auch das Ansprechen auf eine Therapie.

Tab. 4: Intrinsische bzw. immunhistochemisch-bestimmte Subtypen des Mammakarzinoms (Goldhirsch et al. 2011; Goldhirsch et al. 2013)

Intrinsischer Subtyp	Luminal A	Luminal B		HER2-enriched	Basal-like
Immunhistochem. bestimmte Subtypen	Luminal A-like	Luminal B-like HER2-	Luminal B-like HER2+	HER2+	Tripel negativ
	ER+ (≥1%) PgR+ (≥20%) HER2-	ER+ (≥1%) HER2-	ER+(≥1%) HER2+	ER- PgR- (<20%) HER2+	ER- PgR- (<20%) HER2-
	Ki-67 niedrig (<14%)	<u>Mind. 1 von:</u> Ki-67 hoch (≥14%) PgR- (<20%)	Jedes Ki-67 Jeder PgR-Status		

1.7 Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks)

Die Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) gehört zu den Lipidkinasen und spielt eine wichtige Rolle in Zellprozessen wie Proteinsynthese, Überleben, Proliferation und Glucose-Metabolismus (Cantley, 2002; Vivanco und Sawyers, 2002). Sie phosphorylieren Phosphatidylinositole (PI), eine Gruppe von Phospholipiden an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Diese sind für die Weiterleitung von externen Signalen von Bedeutung (Cantley, 2002). Im Folgenden sollen die PI3K-Familien, die PI3K-Signalkaskade sowie der Aufbau der PI3Ks betrachtet werden.

1.7.1 Die Familie der PI3K

Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Aufbau der verschiedenen Lipidkinasen. Anhand der jeweiligen Proteinstruktur und Substratspezifität unterscheidet man drei Klassen der PI3Ks: Klasse I (IA, IB), II und III (Vanhaesebroeck et al., 1997a).

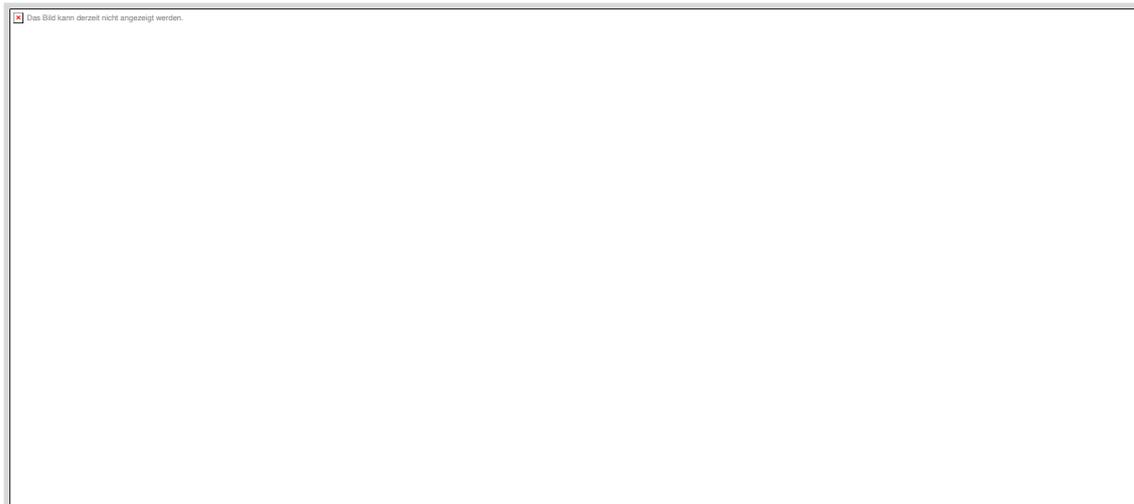


Abb. 1: Die unterschiedlichen Proteindomänen (graue Kästchen und Ellipsen) und die entsprechenden codierenden Gene (grau, kursiv) der PI3K-Klassen (Engelman et al., 2006; Vanhaesebroeck et al., 2010; Martin-Berenjeno und Vanhaesebroeck, 2009)

Die Vertreter der Klasse I sind am besten verstanden. Sie bestehen als Heterodimere aus je einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit. Man unterteilt diese Gruppe in Klasse IA und Klasse IB (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Bei den Vertretern der Klasse 1A sind drei verschiedene Isoformen der katalytischen Untereinheit bekannt: p110 α , p110 β und p110 δ . Diese werden entsprechend durch die Gene PIK3CA, PIK3CB und PIK3CD codiert. Bei den regulatorischen Untereinheiten unterscheidet man

p85 α , p55 α , p50 α , p85 β und p85 δ . Diese werden durch die drei Gene PIK3R1, PIK3R2 und PIK3R3 codiert. Das Gen PIK3R1 codiert durch alternatives Splicen für p85 α , p55 α und p50 α (Jabbour et al., 2014; Vanhaesebroeck et al., 2010). Die PI3Ks der Klasse IB bestehen ebenfalls aus einer katalytischen (p110 γ) und einer regulatorischen Untereinheit. Man unterscheidet bei den regulatorischen Untereinheiten p101 und p87 (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Die PI3Ks der Klasse I kommen in allen Zellen vor, wobei p110 δ und p110 γ vor allem in Leukozyten zu finden sind (Kok et al., 2009; Vanhaesebroeck et al., 1997a). Die Aktivierung der PI3Ks der Klasse 1 kann über diverse Mechanismen geschehen (siehe dazu Kapitel 1.7.2).

Die Vertreter der Klasse II bestehen als Monomere aus je einer katalytischen Untereinheit (PIK3C2 α , PIK3C2 β , PIK3C γ), die durch die Gene PIK3C2A, PIK3C2B und PIK3C2G codiert werden (Martin-Berenjeno und Vanhaesebroeck, 2009a). Falasca und Maffucci (2012) geben in ihrem Review einen Überblick über die Regulation und Funktionen der PI3Ks der Klasse 2. Sie beschreiben ein ubiquitäres Vorkommen, wobei die einzelnen Isoformen bestimmte Gewebepreferenzen zeigen. Die PI3Ks der Klasse II werden über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs; G-protein coupled receptors) aktiviert. Sie spielen eine Rolle im Vesikel- und Membrantransport der Zelle und nehmen unter anderem Einfluss auf den Glucose-Transport, Exozytose und Endozytose (Falasca und Maffucci, 2012).

Der Vertreter der Klasse III ist als Heterodimer aus der katalytischen Untereinheit „Vps34“ (vacuolar protein sorting 34) und der regulatorischen Untereinheit „Vps15“ aufgebaut. Die Kinase spielt eine Rolle im zellulären Vesikeltransport (Vanhaesebroeck et al., 2010).

Für die Einteilung der Lipidkinasen in die einzelnen PI3K-Klassen spielt auch die Substratspezifität eine Rolle (Vanhaesebroeck et al., 1997b). Die in Tabelle 5 hervorgehobenen Substrate stellen die präferierten *in vivo*-Substrate dar (Engelman et al., 2006; Vanhaesebroeck et al., 2010). Das Hauptprodukt der PI3Ks der Klasse II ist noch nicht sicher identifiziert (Engelman et al., 2006; Falasca und Maffucci, 2012).

Tab. 5: Substratspezifität der PI3K-Familien

PI3K Klasse I	PI3K Klasse II	PI3K Klasse III
PI-4,5-P₂ → PI-3,4,5-P₃	PI → PI-3-P PI-4-P → PI-3,4-P₂	PI → PI-3-P

PI = Phosphatidylinositol

PI-3-P = Phosphatidylinositol-3-phosphat

PI-4-P = Phosphatidylinositol-4-Phosphat

PI-3,4-P₂ = Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat

PI-4,5-P₂ = Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat

PI-3,4,5-P₃ = Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat

1.7.2 Die PI3K-Signalkaskade

Die Abbildung 2 verdeutlicht die PI3K/AKT-Signalkaskade. Wie bereits unter 1.7.1 beschrieben, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Aktivierung der PI3Ks der Klasse 1. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung über Rezeptortyrosinkinasen (RTKs). Nach der Bindung eines Liganden an solch einen Rezeptor kommt es zu dessen Autophosphorylierung an intrazellulären Tyrosinresten. Durch direkte Interaktion mit diesen intrazellulären phosphorylierten Tyrosinresten oder über ein zwischengeschaltetes Adapterprotein (in Abbildung als ‚A‘), wie z.B. Insulin-Rezeptor-Substrat-1 (IRS1), wird die PI3K aktiviert (Cantley, 2002; Vivanco und Sawyers, 2002). Die aktivierenden Tyrosinkinasen können auch als Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (Nicht-RTKs) im Zytosol vorkommen (Vanhaesebroeck und Alessi, 2000). Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung über GPCRs. Auch das G-Protein Ras trägt zur Aktivierung der PI3K bei (Rodriguez-Viciano et al., 1994). Ras selbst wird über RTKs aktiviert und kann mit den Isoformen p110 α / δ / γ interagieren (Vanhaesebroeck et al., 2010; Fritsch et al., 2013). Auch andere kleine GTPasen (z.B. Rac, Cdc42) fungieren als Aktivatoren dieser Kinasen (Fritsch et al., 2013).

Nach der Aktivierung der PI3Ks phosphorylieren sie die membranständigen Phosphoinositide, wie Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂). Das so entstehende Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃) fungiert mit seiner Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne als Andockstelle für die Phosphoinositid-dependent-Kinase-1 (PDK-1) und die Proteinkinase B (PKB oder AKT) (Stokoe et al., 1997). Aufgrund der räumlichen Nähe dieser beiden Proteine kann AKT durch PDK-1 phosphoryliert werden (Di Cosimo und Baselga, 2009; Cantley, 2002; Alessi et al., 1997). Eine weitere Phosphorylierung durch den Plasmaproteinkomplex Mammalian-target-of-Rapamycin-Complex-2 (mTORC2) aktiviert die Kinase schließlich vollständig (Sarbasov et al., 2005). Die AKT-Kinase ist so in der Lage weitere Mediatoren zu modulieren. Durch die Phosphorylierung des Tuberous sclerosis complex (TSC 1 und TSC2) wird selbiges gehemmt und der Mammalian-target-of-Rapamycin-Complex-1 (mTORC1) aktiviert, welcher die Proteinsynthese stimuliert (Fruman und Rommel, 2014). Des Weiteren nimmt AKT Einfluss auf die Apoptose: Es hemmt das pro-apoptotische Protein Bcl-2-associated-death-promotor (BAD) (Vivanco und Sawyers, 2002; Datta et al., 1997). Die Phosphorylierung des Proteins ‚Mouse Double Minute 2‘ (MDM2) durch AKT erleichtert die Translokation von MDM2 in den Zellkern. Dort bindet es das pro-apoptotische Protein p53 und erleichtert dessen Degradation (Vivanco und Sawyers, 2002; Mayo und Donner, 2001; Vivanco und Sawyers, 2002). Das Ergebnis ist ein gehemmter Zelltod und ein Überleben der Zellen. Durch die AKT-vermittelte Phosphorylierung des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors Forkhead-Box-O (FOXO) verbleibt dieser im Zytoplasma, die Transkription seiner Gene (z.B. Fas-Ligand-Gen) wird gehemmt (Vivanco und

Sawyers, 2002; Brunet et al., 1999). Durch die Inaktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p21 werden der Zellzyklus angetrieben und damit die Proliferation stimuliert (Rössig et al., 2001; Walker et al., 1999; Vivanco und Sawyers, 2002). AKT beeinflusst außerdem den Glucose-Metabolismus, indem es beispielsweise durch Phosphorylierung die Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3) hemmt und so den Aufbau von Glykogen stimuliert (Cross et al., 1995; Vivanco und Sawyers, 2002).

Reguliert wird die Aktivität der PI3K und der Gehalt an $PI(3,4,5)P_3$ über verschiedene Phosphatasen: Die Phosphatase ‚Phosphatase-and-Tensin-Homolog‘ (PTEN) dephosphoryliert die 3'-OH-Position von $PI(3,4,5)P_3$ und es entsteht $PI(4,5)P_2$ (Maehama und Dixon, 1998; Vivanco und Sawyers, 2002). Die Src-homology 2 (SH2)-containing phosphatases (SHIP1, SHIP2) dephosphorylieren $PI(3,4,5)P_3$ an seiner 5'-OH-Position und induzieren so die Bildung von $PI(3,4)P_2$ (Vivanco und Sawyers, 2002; Cantley, 2002).



Abb. 2: Die PI3K-Signalkaskade (modifiziert nach Vivanco und Sawyers, 2002)

1.7.3 Die katalytische Untereinheit p110 α

Das PIK3CA-Gen codiert für die katalytische Untereinheit der PI3K (p110 α) und befindet sich auf dem Chromosom 3 (3q26.3). Es besteht aus 21 Exons, von denen das erste Exon eine nicht-translatierende Region (untranslated region, kurz UTR) ist und für kein Peptid kodiert. Das Transkript umfasst insgesamt 3207 Basenpaare, das entspricht 1068 Aminosäuren (Sanchez-Cespedes, 2011). In der Abbildung 3 sind die Domänen der p110 α -Untereinheit sowie der

homologe Bereich der regulatorischen Untereinheit der PI3K Klasse 1A vereinfacht dargestellt. Auf Proteinebene zeigen die verschiedenen Isoformen der regulatorischen Untereinheit der Klasse IA homologe Bereiche: Sie alle besitzen zwei ‚SRC-Homologie 2-Domänen‘ (SH2-Domänen) und eine Inter-SH2(iSH2) -Domäne. Mit der iSH2-Domäne wird konstitutiv die katalytische Untereinheit gebunden. Durch die Interaktion mit p85 wird die Enzymaktivität der katalytischen Untereinheit gehemmt. Bei Aktivierung der Kaskade, beispielsweise nach Ligandenbindung an eine RTK, kann die plasmaständige regulatorische Untereinheit über ihre beiden SH2-Domänen die autophosphorylierten Tyrosinreste des Rezeptors binden. Es kommt so zu einer Rekrutierung des p85-p110 α -Komplexes zum Rezeptor. Dieser Mechanismus hat zwei Auswirkungen auf die katalytische Untereinheit: Zum einen wird deren Enzymtätigkeit aktiviert und gleichzeitig wird sie in räumliche Nähe zu ihren Substraten, den Phospholipiden, gebracht (Katso et al., 2001; Vivanco und Sawyers, 2002).

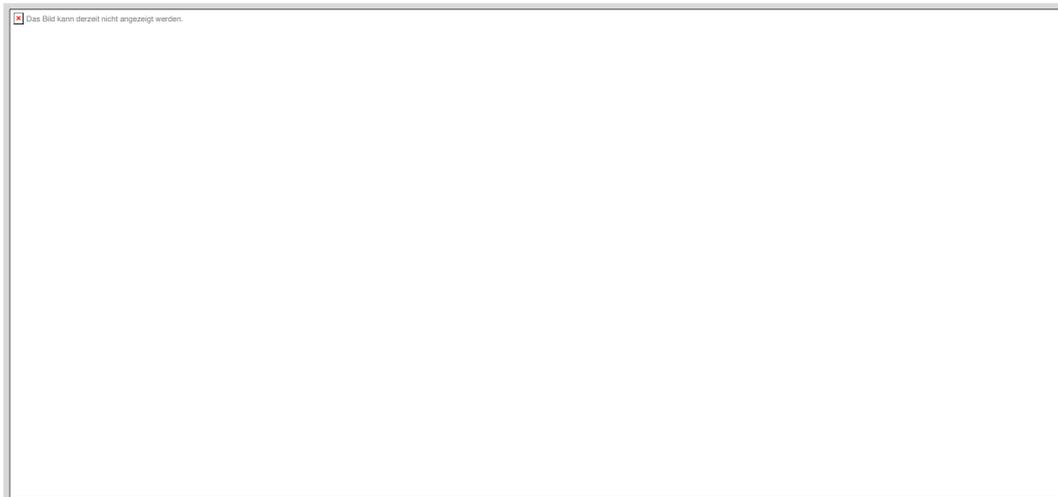


Abb. 3: Aufbau der regulatorischen und katalytischen Untereinheiten der PI3K (modifiziert nach Huang et al., 2007)

Die katalytische Untereinheit besteht aus fünf Domänen. Sie besitzt eine N-terminale Adapter-Bindedomäne (ABD), die der Verbindung zur iSH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit dient (Miled et al., 2007). Die Ras-Bindedomäne (RBD-Region) dient der Kopplung von PI3K an Ras, welches so imstande ist, die Kinase zu aktivieren (Huang et al., 2007). Die C2-Domäne ist für die Bindung an Phospholipide der Zellmembran zuständig (Walker et al., 1999; Huang et al., 2008). Die Funktion der helikalen Domäne ist noch nicht sicher geklärt. Vermutlich dient sie als Gerüst für die anderen Domänen dieses Proteins (Huang et al., 2008; Walker et al., 1999; Miled et al., 2007). Die Kinase-Domäne birgt die Katalyse-Funktion und ist für die ATP-abhängige Phosphorylierung der Phospholipide zuständig (Huang et al., 2008).

1.7.4 Genetische Aberrationen der PI3K/Akt-Signalkaskade

Dysregulationen im PI3K/AKT-Signalweg sind mit einer Vielzahl von Tumorentitäten assoziiert, wie beispielsweise dem kolorektalen Karzinom, dem Ovarialkarzinom, sowie dem Mammakarzinom (Vivanco und Sawyers, 2002; Karakas et al., 2006). Dabei sind verschiedene Mechanismen bekannt, die zu einer gesteigerten Aktivität dieser Kaskade führen. So können beispielsweise genetische Veränderungen des Tumorsuppressorgens PTEN, der AKT-Kinase, sowie der PI3K, Einfluss auf die Aktivität dieses Signalweges nehmen (Hernandez-Aya und Gonzalez-Angulo, 2011).

Wu et al. (2005) konnten bei der Untersuchung von 92 primären Brustkrebstumoren sowohl Genamplifikationen als auch somatische Mutationen des PIK3CA-Gens nachweisen. Somatische Mutationen des PIK3CA Gens sind in der ABD-, C2-, helikalen und Kinase-Domäne zu finden (Miled et al., 2007). Die Hot-Spot-Mutationen konzentrieren sich dabei auf die beiden letztgenannten Regionen des PIK3CA-Gens (Samuels und Velculescu, 2004).

Die häufigste somatische Mutation im PIK3CA-Gens ist die Mutation mit der Cosmic ID C 775 (Chalhoub und Baker, 2009; Samuels und Velculescu, 2004; Datenbank des Sanger Instituts). Dabei erfolgt ein Basenaustausch der Base Adenin gegen Guanin an der Genposition 3140 im Exon 20 (siehe Abb. 3). Die Folge ist ein Aminosäureaustausch der 1047. Aminosäure des Proteins von Histidin gegen Arginin. Infolge dessen verändert die Kinase-Domäne der katalytischen Untereinheit ihre Konformation und die Affinität zu den Substraten, lokalisiert in der Zellmembran (PIP₂), wird gesteigert (Mandelker et al., 2009; Huang et al., 2007).

Die Mutation mit der Cosmic ID C 763 im Exon 9 ist eine weitere Hot-Spot-Mutation. Dabei erfolgt ein Basenaustausch an der Genposition 1633 von Guanin gegen Adenin. Die Folge ist ein Aminosäureaustausch im Protein an der Position 545 von Glutaminsäure zu Lysin (Datenbank des Sanger Instituts). Diese Mutation der helikalen Domäne bedingt eine veränderte Interaktion zwischen der katalytischen Untereinheit p110 α und der SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit. Man nimmt an, dass die basale Inhibierung der Kinase-Aktivität dadurch geschwächt wird (Miled et al., 2007; Huang et al., 2007).

In der Literatur werden weitere Mutationen, wie z.B. E542K (COSM760; 11% aller PIK3CA-mutierten Brustkrebstumoren, My Cancer Genome) oder Mutationen im Gen der regulatorischen Untereinheit beschrieben. Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf den beiden bereits genannten Hotspots liegt, wird auf die weiteren genetischen Aberrationen nicht weiter eingegangen.

Tab.6: Übersicht zu den beiden untersuchten Hotspot-Mutationen C 775 und C763 (Balko et al., 2015)

	C 775	C 763
Exon Basenaustausch Aminosäureaustausch Anteil an allen PIK3CA-Mutationen	Exon 20 c. 3140 A > G [DNA] p. H 1047 R Histidin (H) → Arginin (R) Ca. 55%	Exon 9 c. 1633 G > A [DNA] p. E 545 K Glutaminsäure (E) → Lysin (K) Ca. 20%

2 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Prävalenz von PIK3CA-Genmutationen beim Mammakarzinom zu untersuchen. Dieser Mutationsstatus bezieht sich entsprechend den Angaben der COSMIC-Datenbank auf die beiden häufigsten Hotspot-Mutationen des PIK3CA-Gens beim Mammakarzinom, nämlich H1047R (Exon 20: c. 3140 A > G, p. H 1047 R, COSMIC ID C775) und E545K (Exon 9: c. 1633 G > A, p. E 545 K, COSMIC ID C 763).

Entsprechend den Angaben in der Literatur macht die Mutation C775 mit ca. 55 % den größten Anteil unter den PIK3CA-Mutationen beim Mammakarzinom aus. Die Mutation C 763 ist mit ca. 20 % die zweithäufigste Hotspot-Mutation. Es wurde sich auf diese beiden häufigsten Hotspot-Mutationen konzentriert.

Es soll zum einen die Häufigkeit dieser beiden Mutationen an einem repräsentativen Kollektiv von Brustkrebspatientinnen ermittelt werden. Zum anderen soll untersucht werden, ob der somatische Mutationsstatus mit klinischen Eigenschaften der Patientin (Alter, Menopausenstatus) bzw. mit pathologischen Parametern des Tumors (TNM, Grading; HR-Status, etc.) assoziiert ist.

Da die prognostische Bedeutung dieser Genmutationen kontrovers diskutiert wird, sollen des weiteren Zusammenhänge zwischen dem Mutationsstatus und klinischen Risikoeinteilungen (z.B. nach klinischen und pathologischen Parametern, nach der Risikoeinteilung nach St. Gallen 2009, Risikoabschätzung mittels uPA/PAI-1-Werten) betrachtet werden.

Für die Tumoren mit verfügbarem Proliferationsmarker Ki-67 (n=183) soll ein möglicher Zusammenhang zwischen PIK3CA-Mutationsstatus und den immunhistologischen Subtypen des Mammakarzinoms nach den St. Gallen Konsens (Goldhirsch et al., 2013) untersucht werden.

3 Material & Methoden

3.1 Die untersuchte Kohorte

Im Rahmen einer prospektiven, nicht interventionellen, multizentrischen Studie („Prognose im Alltag“, kurz PiA, n=1142) wurde Tumorfrischgewebe asserviert, sowie die klinischen und pathologischen Daten dieser Brustkrebspatientinnen aus fünf zertifizierten Brustkrebszentren zusammengetragen. Zu diesen Zentren gehörten folgende Brustzentren: Brustzentrum am Universitätsklinikum Halle (Saale) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, das Brustzentrum am Krankenhaus St. Elisabeth und St. Barbara in Halle (Saale), das Brustzentrum des Klinikums Fürth, des Klinikums Goslar, das Brustzentrum Hildesheim mit dem Klinikum Hildesheim, dem Klinikum St. Bernward und der Praxis für Gynäkologie und Geburtshilfe von Dr. med. Uleer in Hildesheim. Der Rekrutierungszeitraum für diese Studie erstreckte sich vom September 2009 bis Mai 2011 über einen Zeitraum von 21 Monaten. Es wurden 1142 Patientinnen rekrutiert, von denen letztlich 1079 Patientinnen in die Auswertung eingingen (siehe Abb. 4). Für diese Studie lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle vor.

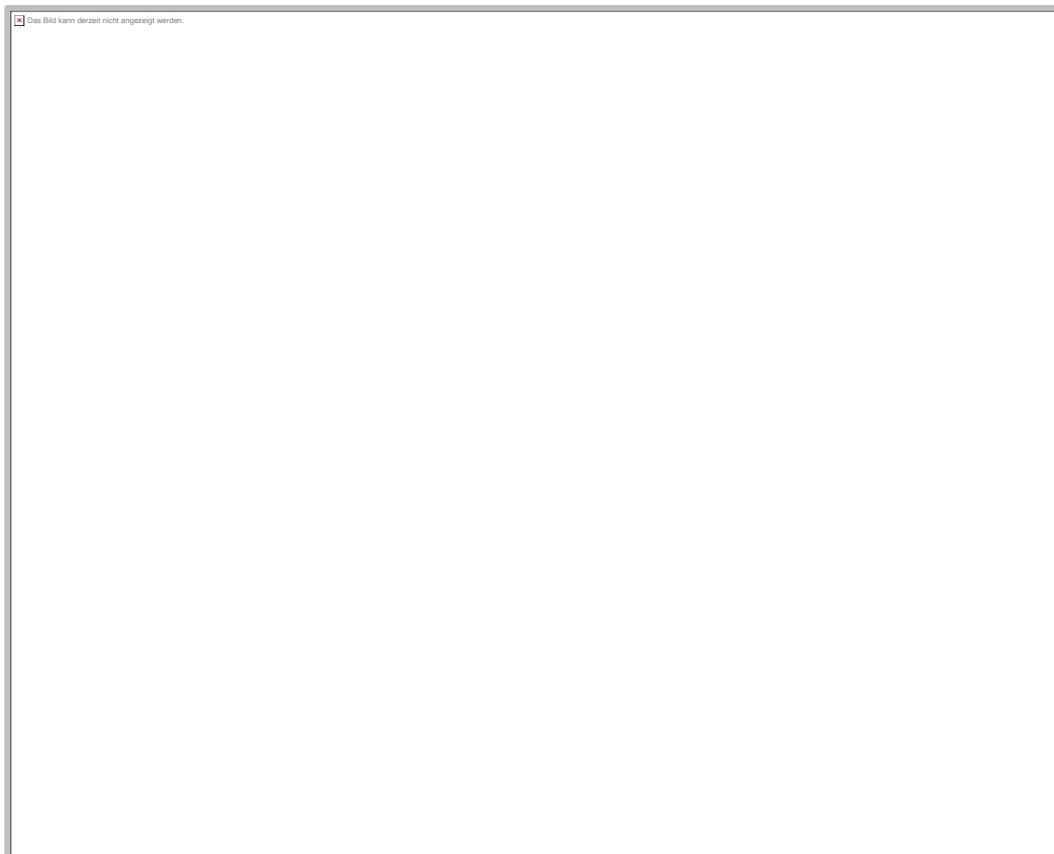


Abb. 4: Übersicht zu den in die Auswertung eingegangenen Patientinnen und die Zusammensetzung der untersuchten Tumoren

Ziel dieser repräsentativen Studie war es, für das primär operable, nodal-negative Mammakarzinom einen quantitativen Vergleich unterschiedlicher Risikoabschätzungen anzustellen und deren Realisierbarkeit im klinischen Alltag zu untersuchen (Vetter M et al., 2011). Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 806 Tumorproben von 795 Patientinnen untersucht. Elf Patientinnen hatten ein beidseitiges Mammakarzinom, beide Herde wurden in die Untersuchung aufgenommen. Abbildung 2 verdeutlicht die Zusammenstellung der einbezogenen Patientinnen und untersuchten Tumorproben.

3.2 Klinische Eigenschaften der untersuchten Kohorte

Die jüngste Patientin des Gesamtkollektivs war bei Erstdiagnose 22, die älteste war 90 Jahre alt. Das mittlere Alter lag bei 62 Jahren. Von den 795 Patientinnen waren 194 (24,4 %) Frauen jünger als 50 Jahre und 601 (75,6 %) Patientinnen älter als 50 Jahre. In Bezug auf den Menopausenstatus waren 169 (21,3 %) Frauen des Gesamtkollektivs prämenopausal, 52 (6,5 %) Frauen perimenopausal und 574 (72,2 %) Patientinnen postmenopausal.

3.3 Tumorbiologische Eigenschaften der untersuchten Tumorproben

In der nachfolgenden Tabelle sind die histologischen und pathologischen Eigenschaften der insgesamt 806 Tumoren zusammengetragen (Tab. 7).

Der Großteil der Tumoren (n=642; 79,7 %) ist vom duktalem Typ. Bezogen auf die Tumorgroße, ist der größte Anteil (n=419; 52 %) den T1-Tumoren zuzuordnen. Im Hinblick auf den Nodalstatus ist mit 61,8 % (n=498) der Großteil nodal-negativ. 62,4 % der Tumoren (n=503) weisen einen mäßigen Differenzierungsgrad (G2) auf. Bezogen auf die Gefäßinvasion war bei 72,8 % (n=587) keine Lymphgefäßinvasion zu finden und bei 98,9 % (n=797) keine Blutgefäßinvasion. Im Hinblick auf den Hormonrezeptorstatus (ER und PgR) ist mit 85,9 % (n=692) der Großteil der Tumoren HR-positiv. Für die getrennte Betrachtung der Hormonrezeptoren ergibt sich, dass 84,9 % (n=684) der untersuchten Tumoren ER-positiv sind und 69,6 % (n=561) der untersuchten Tumoren PgR-positiv. Bezüglich des HER2-Status wurden 13,6 % (n=110) als HER2-positiv klassifiziert. Insgesamt 76,7 % (n=618; 76,7 %) der Tumoren sind HR-positiv und gleichzeitig HER2-negativ. Bezogen auf den uPA/PAI-1-Status zeigte sich bei der Mehrheit der Tumoren (n=502; 62,3 %) mindestens einer der beiden Werte (uPA und/oder PAI-1) erhöht.

3.4 Zelllinien

Für die Detektion der untersuchten Hotspot-Mutationen H1047R und E545K wurden Positivkontrollen bei der PCR-Analyse mitgeführt. In der Arbeit von Wu und Kollegen aus dem Jahre 2005 wurden neben 92 primären Brustkrebstumoren 15 Brustkrebszelllinien auf ihren

Mutationsstatus bezüglich des PIK3CA-Gens mittels Sequenzierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zelllinie BT-20 die Mutation H1047R trägt und die Zelllinie MCF-7 die Mutation E545K (Wu et al., 2005). Die Zelllinie BT-20 stammt von einer 74-jährigen Kaukasierin mit einem Mammakarzinom (Lasfargues und Ozzello, 1958). Die Zelllinie MCF-7 stammt aus dem malignen Pleuraerguss einer 69-jährigen Frau mit metastasiertem Brustkrebs (Soule et al., 1973).

Tab. 7: Übersicht zu den tumorbiologischen Eigenschaften der untersuchten Tumoren

Histopathologischer Parameter		Anzahl (%)
Histologie	Duktal	642 (79,7)
	Lobulär	117 (14,5)
	Andere	47 (5,8)
Tumorgröße	T1	419 (52,0)
	T2	343 (42,6)
	T3	37 (4,6)
	T4	7 (0,9)
Nodalstatus	N0	498 (61,8)
	N1	229 (28,4)
	N2	51 (6,3)
	N3	28 (3,5)
Grading	G1	96 (11,9)
	G2	503 (62,4)
	G3	207 (25,7)
Lymphgefäßinvasion (L)	L0	587 (72,8)
	L1	219 (27,2)
Gefäßinvasion(V)	V0	797 (98,9)
	V1	9 (1,1)
HR-Status	Negativ	114 (14,1)
	Positiv	692 (85,9)
ER-Status	Negativ	122 (15,1)
	Positiv	684 (84,9)
PgR-Status	Negativ	245 (30,4)
	Positive	561 (69,6)
HER2-Status	Negativ	696 (86,4)
	Positiv	110 (13,6)
HR / HER2-Status	HR+ / HER2-	618 (76,7)
	HR+ / HER2+	74 (9,2)
	HR- / HER2+	36 (4,5)
	HR- / HER2-	78 (9,6)
uPA-Werte	niedrig (<3ng/mg)	480 (59,6)
	erhöht (≥3ng/mg)	326 (40,4)
PAI-1-Wert	niedrig(<14ng/mg)	375 (46,5)
	erhöht(≥14ng/m)	431 (53,5)
uPA/PAI-1-Status	uPA und PAI-1↓	304 (37,7)
	uPA u/o PAI-1↑	502 (62,3)

3.5 Chemikalien & Geräte

Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über die verwendeten Chemikalien und die genutzten Geräte.

Tab. 8: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Firma, Firmensitz	Artikel-/ Seriennummer
Agarosepulver	AppliChem, Darmstadt	0927-1/8
Assays:		
TaqMan® Referenz-Assay	Life Technologies, Carlsbad (USA)	4465807
TaqMan® Mutation Detection Assay		4465804
DNA-Leiter (50 bp)	New England BioLabs Inc. Frankfurt	N3236L
Go Taq Green Master Mix 2x	Promega Corp., Madison (USA)	M7111
Primer (100pmol/μl):		
PI3KCA_1551F } C 775	MWG Operon, Luxemburg	015100909
PI3KCA_1697R }		015100910
PI3KCA_3061F } C 763		015008737
PI3KCA_3200 R }		015008738
Kits:		
QIAamp DNA Mini Kit 250T	Qiagen, Venlo (Niederlande)	51306
QIAamp DNA Mini Kit 50T		51304
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mix (25:24:1)	AppliChem, Darmstadt	A0889,0100
Proteinase K	Qiagen, Venlo (Niederlande)	1017784
Restriktionsenzyme:	New England BioLabs Inc. Frankfurt	
BtsIMutI (1000U/ml)		R0619S
HpyCHIV4 (10000U/ml)		R0619S
Mastermix	Life Technologies, Carlsbad (USA)	4371353
TaqMan® Genotyping MM 2x		
Zelllinien:		
BT-20	ATCC®, Wesel, Germany	ATCC® HTB-19™
MCF-7		ATCC® HTB-22™

Standardlaborchemikalien:

- Aqua destillata (A. dest.), Ethanol (70%), Ethidiumbromid (EtBr), Isopropanol (99,9%), NaAc (3M), Nuklease-freies Wasser
- TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA)
- Proteasepuffer (50mM Tris; 25 mM EDTA; 0,5% NP40; 0,5% SDS)
- TBE-Puffer (54g Tris, 27,5g Borsäure, 20ml 0,5M EDTA mit pH=8)
- TBS-Triton-Puffer (1% Triton, pH=8,5)

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Firme, Firmensitz	Artikel-/ Seriennummer
Elektrophoresegerät Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen	Serien-Nr. 1611453
Elektrophoresekammer ,Whatman‘	Biometra, Göttingen	Serien-Nr. 2811427
Eppendorf Reaktionsgefäße: Eppendorf-Tubes (1,5 ml) Eppendorf-Tubes (2 ml)	Eppendorf, Hamburg	0030120086 0030120094
PCR 8er-Tube-Streifen PCR 8er-Cap-Streifen	Schubert Laborfachhandel, Leipzig	GK79-601 GK79-701
PCR-Platten, 96 wells Ultra Clear Folie für RT-PCR	Schubert Laborfachhandel, Leipzig	G060/H/1F-7500 G060/UC-RT
Pipetten: Pipette Reference var. 1000 µl Pipette Reference var. 200 µl Pipette Research var 20 µl	Eppendorf, Hamburg	37655432 077396 2130871
Pipettenspitzen Pipettenspitzen (1000µl) Pipettenspitzen (200µl) Pipettenspitzen (10µl)	Molecular Bio Product Familie Meus Axygen Scientific, Union City (USA)	1001-80 1039-00 3510
PeqGOLD PhaseTrap A Tubes (2ml)	PEQLAB, Erlangen	30-0020A-01
Rüttelplatte HYPER SHAKER	NeoLab Migge, Heidelberg	-
qPCR-Gerät Step One Plus	Life Technologies, Carlsbad (USA)	4376600
Tecan Infinite 200® Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)	1009004891
PCR-Gerät T-Gradient	Biometra, Göttingen	1510331
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg	535508957
UV-Kammer Typ „NU=72MW“ + INTAS Modular	INTAS Science Imaging Instruments GmbH	6831000
Zentrifugen: Zentrifuge Biofuge pico“ Zentrifuge „Biofuge stratos“ Tischzentrifuge Spout TM	Heraeus, Hanau (Deutschland) Biozym; Oldendorf	40259081 75005286 HSA20114

Standardgeräte

- Flasche
- Gelkammer / Gelkämme
- Magnetfischchen
- Magnetrührer
- Messschiffchen
- Pistills
- Spatel
- Mikrowelle
- Photopapier
- Laborwaage

3.6 DNA-Isolation

Tumorfrischgewebe wurde dismembriert und in Lysepuffer (TBS-Triton-Puffer, 1 % Triton) über Nacht gelöst. Nach dem Zentrifugieren des TBS-Triton-Extraktes wurde der Überstand für die Bestimmung der uPA- und PAI-1-Werte genutzt und aus dem Pellet wurde die Tumor-DNA isoliert.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den untersuchten PIK3CA-Genmutationen (H1047R, E545K) um somatische Mutationen handelt, wurde stichprobenhaft der Mutationsstatus von peripheren Blutzellen bestimmt. Dazu wurde die DNA aus Leukozyten aus peripherem Blut isoliert.

3.6.1 DNA-Isolation aus Tumorgewebe

Die Isolierung der genomischen DNA der Tumorproben wurde mittels QIAamp DNA Mini Kit durchgeführt.

Inhalt des QIAamp DNA Mini Kits:

ATL-Puffer (Lysepuffer), Proteinase K, AL-Puffer (Lysepuffer), Ethanol, QIAamp Mini Spin Column, Sammelgefäße, AW1-Puffer (Waschpuffer 1), AW2-Puffer (Waschpuffer 2), AE-Puffer (Elutionspuffer)

Von dem Zellpellet wurde eine Spatelspitze in ein 1,5 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 180 µl Lysepuffer (ATL-Puffer) wurde das Gemisch mittels Pistill homogenisiert. Es folgte die Zugabe von 20 µl Proteinase K. Nach kurzem Vortexen des Gemisches wurden die Proben bei 56°C für 3 Stunden im Thermomixer inkubiert. Dieser Schritt diente der proteolytischen Spaltung der Proteine im Zelllysate und der Freisetzung der DNA aus dem Kern. Anschließend wurden die Eppendorf Reaktionsgefäße zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Lysepuffer (AL-Puffer) hinzugefügt, die Probe im Vortexer gemischt, für zehn Minuten bei 70°C inkubiert und im Folgenden erneut zentrifugiert. Nach der Zugabe von

200 µl Ethanol, anschließendem Vortexen und Zentrifugieren bildeten sich weißliche DNA-Präzipitate. Im Folgenden wurde der gesamte Inhalt des Eppendorf Reaktionsgefäßes auf die QIAamp Mini Spin Column überführt und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Sammelgefäß der Säule mit dem Filtrat wurde verworfen und die Säule auf ein neues Sammelgefäß gesetzt. Im nächsten Schritt der DNA-Aufreinigung wurden 500 µl Waschpuffer 1 (AW1-Puffer) hinzugefügt und das Reaktionsgefäß bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Sammelgefäß wurde geleert und der Waschschrift wiederholt: Es wurden 500 µl Waschpuffer 2 (AW2-Puffer) hinzugefügt und das Gefäß bei 13000 rpm für drei Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Sammelgefäß mit Filtrat verworfen, die Säule auf ein weiteres 2 ml-Eppendorf Reaktionsgefäß gesetzt und erneut bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Nach diesen Schritten der Aufreinigung wurde die Säule auf ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesetzt und 100 µl Elutionspuffer (AE-Puffer) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute bei Raumtemperatur wurde die Probe bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die DNA der Gewebeprobe wurde durch diesen Schritt aus der Säule gelöst und im Eluat gesammelt. Entsprechend der Versuchsanleitung von Qiagen sollte dieser Schritt mit 200 µl AE-Puffer durchgeführt werden, allerdings war dabei die DNA-Konzentration sehr niedrig, sodass im Folgenden mit 100 µl AE-Puffer eluiert wurde.

Die Konzentration der DNA-Proben wurde photometrisch ermittelt. Des Weiteren wurde der Quotient der Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) bestimmt. Ein Quotient zwischen 1,7 und 1,9 wies auf einen akzeptablen Reinheitsgehalt der DNA hin.

3.6.2 DNA-Isolation aus Blutzellen (Phenol-Chloroform-Extraktion)

Alle Arbeitsschritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Die bei -20°C asservierten Vollblutproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend im Vortexer gemischt und kurz zentrifugiert. Es wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß 150 µl Blut, 300 µl Proteinase-Puffer (50 mM Tris; 25 mM EDTA; 0,5 % NP40; 0,5 % SDS) und 40 µl Proteinase K pipettiert. Das Gemisch wurde für drei Stunden bei 56°C im Thermomixer inkubiert. Die Proteinase K bewirkte den Abbau der Proteine im Zelllysate und so die Freisetzung der DNA. Nach der Inkubation wurde das Eppendorf Reaktionsgefäß kurz im Vortexer gemischt. Es wurden 500 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mix (25:24:1) hinzugefügt und das Reaktionsgefäß für 2-3 Minuten zum Mischen hin und her gewendet. Durch den Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mix entstand ein Mehrphasensystem, bei dem sich die verschiedenen Probenbestandteile (DNA, Proteine, etc.) aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit in den jeweiligen Schichten lösen. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde in ein Phase-lock-Tube überführt und für 15 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. In dem Phase-lock-Tube entstand

eine untere, organische Phase mit den gelösten Proteinen und eine obige, wässrige Phase mit der gelösten Nukleinsäure.

Für die DNA-Fällung wurde der wässrige Überstand des Phase-lock-Tubes in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Das Phase-lock-Gefäß mit den enthaltenen Proteinen und Lipiden wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 40 µl NaAc (3 M) und 400 µl Isopropanol (99,9%) zur Ausfällung der DNA hinzugegeben. Nach dem Mischen wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (10 Minuten bei 13000 rpm) und der Überstand abpipettiert, während das entstandene DNA-Pellet im Reaktionsgefäß zurückblieb. Nach dem Hinzufügen von 150 µl Ethanol (70 %) zur Aufreinigung von etwaigen Phenol-Chloroform-Resten, wurde das Eppendorf Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert (1 Minute, 13000 rpm). Der Überstand wurde abpipettiert, das zurückgebliebene Pellet wurde getrocknet und schließlich in 100 µl TE-Puffer (pH=8) resuspendiert.

Die Konzentration der gelösten DNA aus peripherem Blut wurde im Anschluss ebenfalls photometrisch bestimmt, sowie eine mögliche Verunreinigung über den OD_{260nm}/OD_{280nm} -Quotienten quantifiziert (siehe 3.5.1).

3.7 Konventionelle PCR mit anschließendem Restriktionsverdau

Für die Detektion des Mutationsstatus der Tumorzellen wurde der TaqMan® Mutation Detection Assay und TaqMan®-Referenz-Assay genutzt. Für die Bestimmung des Mutationsstatus der Blutzellen sowie bei nicht eindeutigen Fällen wurde die konventionelle PCR mit Restriktionsverdau zusätzlich durchgeführt.

3.7.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: ‚Polymerase Chain Reaction‘; kurz ‚PCR‘)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary Mullis und Kollegen entwickelt (Saiki et al., 1985). Es basiert auf drei Teilschritten: Im ersten Schritt der *Denaturierung* wird der DNA-Doppelstrang bei Temperaturen zwischen 90-95°C aufgetrennt. An die so entstehenden DNA-Einzelstränge lagern sich im zweiten Schritt (*Annealing*) bei einer Temperatur von 55-60°C die beiden gegenläufig orientierten Primer („reverse / forward primer“) an. Dabei handelt es sich um synthetische Oligonukleotide, die sich entsprechend den komplementären Basen an die Gensequenz anlagern und als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen. Dieses Enzym hat die Aufgabe, in der Phase der *Elongation*, die entsprechende Zielsequenz komplementär zu verlängern. Es arbeitet dabei bei einer Temperatur von ca. 72°C, sodass ein hitzestabiles Enzym notwendig ist – die Taq-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*). Dieser gesamte Zyklus wird 30 bis 40 mal wiederholt, sodass die Zielsequenz exponentiell amplifiziert wird (Holzapfel und Wickert, 2007).

3.7.2 Herstellung des PCR-Mastermix und Restriktionsenzymverdau

Die folgenden Arbeitsschritte wurden bei 0°C-4°C auf Eis durchgeführt. Für die Tumorproben, die jeweilige Zelllinie als Positivkontrolle sowie die Negativkontrolle ohne DNA, wurde der PCR-Mastermix hergestellt: Pro DNA-Probe benötigte man 2 µl Aqua dest., 5 µl GoTaq Polymerase Mastermix (MM; 2x) und je 10 pmol des forward- und des reverse-Primers. Im Anschluss wurden je 9 µl des PCR-Mastermix in je ein Tube eines Tubestreifens gegeben. Als nächstes wurde jeweils 50 ng der zu untersuchenden DNA bzw. 1 µl Wasser hinzugefügt, sodass sich pro DNA-Probe/Negativkontrolle in jedem Reaktionsgefäß ca. 10 µl Ansatz befanden. Die Tube-Streifen wurden kurz zentrifugiert, um am Rand haftende Reagenzien zu lösen und in das PCR-Gerät eingesetzt. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über den Ablauf der PCR.

Tab. 10: Übersicht über den Ablauf der PCR und die Bedingungen der einzelnen Phasen

Phase	Temperatur / Dauer		
Hot Start	95°C	(2 Minuten)	} 40 Zyklen
Denaturierungsphase	95°C	(1 Minute)	
Annealingphase	60°C	(1 Minute)	
Elongationsphase	72°C	(2 Minuten)	

Nach Beendigung des PCR-Programmes wurden die Tube-Streifen zentrifugiert. Der Inhalt eines Tubes wurde auf je zwei 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt. In eines dieser Reaktionsgefäße wurden je 0,5 U (BtsIMutI) bzw. 5 U (HpyCHIV4) Restriktionsenzym hinzugefügt. Die Eppendorf Reaktionsgefäße wurden vorsichtig gemischt und im Thermomixer bei 37°C (HpyCHIV4) bzw. 56°C (BtsMutI) für eine Stunde inkubiert.

3.7.3 Agarosegel zur Auftrennung der Fragmente

Entsprechend der Fragmentlängen nach dem Restriktionsverdau mit HpyCHIV4 und MtsBtsI wurden unterschiedlich konzentrierte Gele hergestellt, um die Amplikons besser auswerten zu sichtbar zu machen (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Übersicht zu den verwendeten Restriktionsenzymen HpyCHIV4 und BtsMutI

	HpyCHIV4 (Mutation H1047R)	BtsMutI (Mutation E545K)
Temperatur	37°C	56°C
Fragmentlänge(n) Wildtyp	140 bp	493 bp, 260 bp, 177 bp, 78 bp
Fragmentlänge(n) Mutation	78 bp, 62 bp	571 bp, 260 bp, 177 bp
Gelkonzentration	2,3 %	1,8 %
Positivkontrolle	BT-20	MCF-7

Neben den DNA-Proben lief zusätzlich noch eine 50 bp-DNA-Leiter mit, um die Größe der aufgetrennten Fragmente abschätzen zu können. Außerdem lief eine Positivkontrolle für die entsprechende Mutation (Zelllinien BT-20 oder MCF-7) mit, um die Aktivität des Restriktionsenzym zu bestätigen, ebenso eine Negativkontrolle.

3.7.4 Auswertung und Dokumentation

Nach dem Anlegen einer Gleichstromspannung von 50-150 V (< 100 mA) an die Gelkammer wurden die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Gelkammer gelöst. Es wurde zunächst in einer Ethidiumbromidlösung (EtBr; 600 µl EtBr mit einer Konzentration von 1 mg/ml, 300 ml 0,5x TBE-Puffer) für ca. 15 Minuten gefärbt. Um unspezifisch gebundenes EtBr aus dem Gel zu entfernen, wurde das Gel in 0,5-molarer TBE-Lösung geschwenkt. Schließlich wurden die aufgetrennten Fragmente unter UV-Bestrahlung visualisiert und per Foto dokumentiert.

3.7.5 Mutation Cosmic ID C775; c.3140A>G; H1047R

Für die Amplifikation der PIK3CA-Genabschnitte mit der möglicherweise vorhandenen Mutation H1047R kamen die folgenden Primer zum Einsatz:

Primer:	Forward	TACATTCGAAAGACCCTAGCCTTAGATA	(PI3KCA_3061F)
	Reverse	AATGCATGCTGTTTAATTGTGTGG	(PI3KCA_3200R)

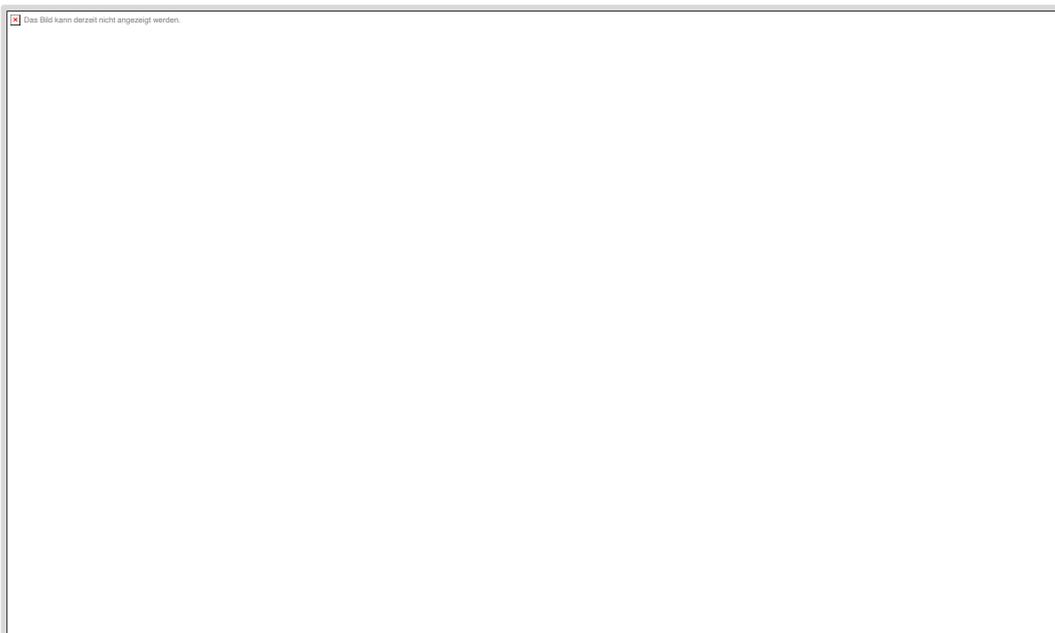


Abb. 5: Schematische Darstellung der Fragmentlängen nach Restriktionsverdau mit HpyIV4 für die Detektion der Mutation C775

Der amplifizierte Genabschnitt umfasste 140 Basenpaare (siehe Abbildung 5).

Der Wildtyp hat an der DNA-Position 3140 des PIK3CA-Gens die Base Adenin. Bei Vorliegen eines Basenaustauschs („Single nucleotide polymorphism“=SNP) zu Guanin entsteht die Sequenz „ACGT“, welche eine Schnittstelle für das Enzym HpyCHIV4 darstellt. Nach dem Restriktionsenzymverdau entstehen bei Vorliegen dieser Mutation zwei Fragmente (78 und 62 Basenpaare), die in der gelelektrophoretischen Auftrennung als Doppelbande sichtbar sind. Abbildung 6 zeigt dieses Bandenmuster für die Positivkontrolle BT-20 mit der Mutation H1047R, eine nicht-mutierte Patientenprobe (M467) und eine mutierte Patientenprobe (M466).



Abb. 6: Schematische Darstellung der Fragmentlängen nach Restriktionsverdau mit BtsIMutI

Bei der DNA-Isolation werden neben den Tumorzellen auch Zellen des Stromas, wie z.B. Fibroblasten, aufgearbeitet. Diese tragen keine Mutation im PIK3CA-Gen, sodass das Restriktionsenzym nicht schneiden kann und ein Fragment mit einer Größe von 140 Basenpaaren resultiert. Dadurch erscheint bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente unabhängig vom Mutationsstatus eine Bande auf Höhe des Wildtyp-Fragments.

3.7.6 Mutation Cosmic ID C 763; c. 1633 G>A; E545K

Für die Amplifikation der PIK3CA-Genabschnitte mit der möglicherweise vorhandenen Mutation E545K kamen die folgenden Primer zum Einsatz:

Primer: Forward: AGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAAATG (PI3KCA_1551F)
Reverse: GGTAGAATTTTCGGGATAGTTACACAA (PI3KCA_1697R)

Der amplifizierte Genabschnitt umfasste 1008 Basenpaare. Der Wildtyp weist in der Gensequenz an Position 1633 die Base Guanin auf. Dadurch erkennt das Restriktionsenzym ‚BtsIMutI‘ an dieser Stelle und an zwei weiteren Positionen Schnittstellen („CACTG“). Nach dem Restriktionsverdau entstehen vier Fragmente: 78 bp, 493 bp, 260 bp und 177 bp (siehe Abbildung 7).

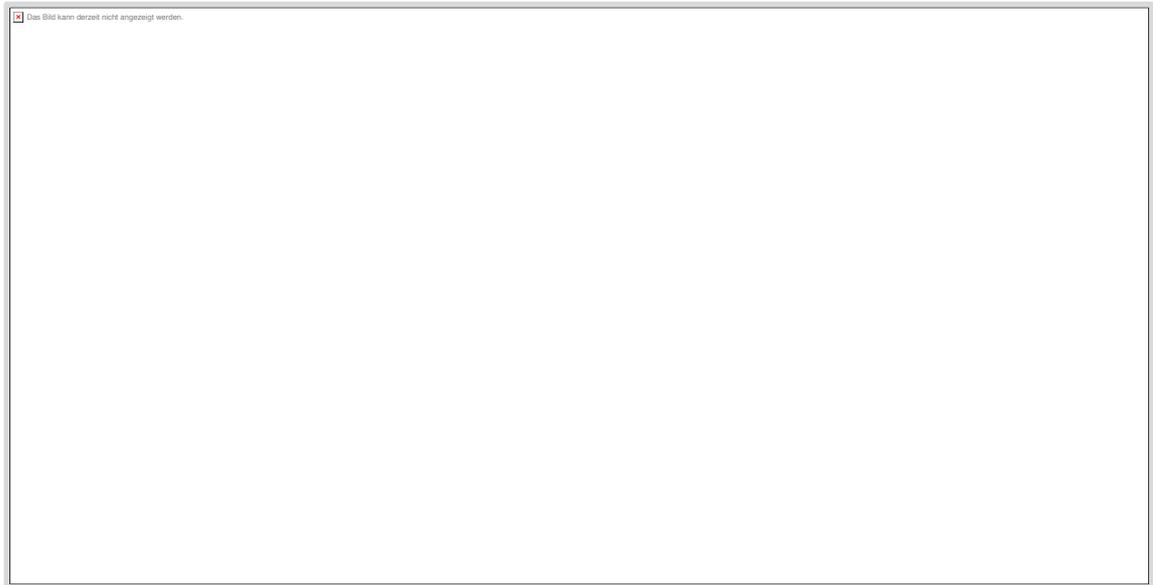


Abb. 7: Schematische Darstellung der Fragmentlängen nach Restriktionsverdau mit BtsIMutI für die Detektion der Mutation C763

Bei Vorliegen der Mutation E545K erfolgt ein Basenaustausch an der DNA-Position 1633 mit Einbau der Base Adenin anstatt Guanin (SNP). Dadurch entfällt eine Schnittstelle und nach dem Restriktionsverdau entstehen 3 Fragmente: 571 bp, 260 bp und 177 bp. Da jedoch nicht das gesamte Zellmaterial der untersuchten Proben mutiert ist, sondern durchaus Wildtyp-DNA enthalten ist, zeigen sich auch die beiden Banden, die durch die erste Restriktionsschnittstelle gebildet werden (493 bp, 78 bp).

Abbildung 8 zeigt beispielhaft das Bandenmuster für eine nicht-mutierte Tumorprobe (M859) im Vergleich zur Positivkontrolle MCF-7. Dabei zeigt das Bandenmuster für MCF-7 deutlich ein Fragment mit 571 Basenpaaren. Dieses Fragment deutet auf das Vorliegen eines Basenaustauschs an der Genposition 1633 hin.

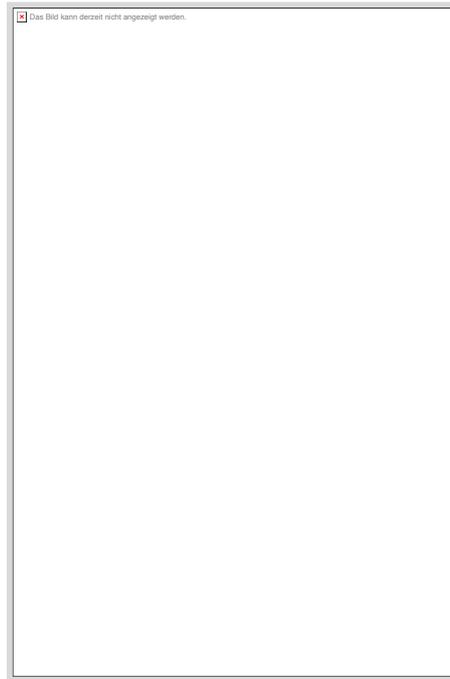


Abb. 8: Bandenmuster nach gelelektrophoretischen Auftrennung der Fragmente aus dem Enzymverdau: Die Patientenprobe M859 ist nicht mutiert. Die Zelllinie MCF-7 hingegen weist die Mutation E545K auf.

3.8 Die quantitative Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR, qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren (siehe Kapitel 3.7.1) und ermöglicht die Echtzeit-Quantifizierung mittels Fluoreszenzmessung nach jedem Zyklus (Holzapfel und Wickert, 2007).

3.8.1 Prinzip der TaqMan® Mutation Detection Assay

Die Methode nutzt sogenannte Hydrolisierungs sonden. Diese sequenzspezifischen Oligonukleotide binden an den zu amplifizierenden Genabschnitt. Die Sonden sind jeweils mit einem Reporter und einem Quencher gekoppelt. Der am 5'-Ende befindliche Reporter (FAM, Fluoresceinderivat) sendet nach Lichtanregung ein Fluoreszenzsignal aus. Dieses wird jedoch aufgrund der räumlichen Nähe durch den Quencher (Tetramethylrhodamin=TAMRA, Rhodaminderivat) am 3'-Ende unterdrückt. Bei intakter Sonde ist entsprechend dem Fluoreszenz-Resonanz-Energy-Transfer-Prinzip (FRET) kein Fluoreszenzsignal zu detektieren. Während der qPCR wird die an die Zielsequenz-gebundene Sonde durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgebaut, sodass sich Reporter und Quencher räumlich trennen und das emittierte FAM-Fluoreszenzsignal gemessen werden kann. Das Signal steigt mit jedem Zyklus exponentiell an und verdeutlicht so die Amplifikation der Zielsequenz

(TaqMan® Mutation Detection Assay – Handbuch, Life Technologies, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurde einerseits ein Referenz-Assay für das PIK3CA-Gen (keine bekannte Mutation vorhanden) und zum anderen die entsprechenden Mutation Detection Assays für die zu analysierten SNPS genutzt (siehe Abbildung 9).



Abb. 9: Der TaqMan® Mutation Detection Assay (verändert nach dem Produkt Bulletin zu TaqMan® Mutation Detection Assay von Life Technologies)

Um sicher zu gehen, dass ein negativer Mutationsstatus nicht falsch-negativ begründet ist, beispielsweise durch den Verlust der Zielsequenz, kommt der Referenz-Assay zum Einsatz. Dadurch wird ein Bereich des Zielgens ohne Mutation nachgewiesen. Mittels TaqMan® Mutation Detection Assay kann man den Mutationsstatus untersuchen. Dabei sind die Sonden so konzipiert, dass bei Vorliegen eines SNPs, die Sonde bindet und im Rahmen der Amplifikationsschritte ein exponentiell verlaufendes Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Ist der Mutationsstatus hingegen negativ und kein Basenaustausch vorhanden, kann die Sonde nicht binden und es wird kein Signal detektiert. Die Auswertung des Mutationsstatus erfolgt mittels Amplifikationskurven, welche anhand des gemessenen Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit der einzelnen Zyklen generiert werden. Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Amplifikationskurven für den Mutation Detection Assay der Mutation H1047R und den entsprechenden Referenz-Assay der Patientenprobe M466 (mutiert) und M 467 (nicht mutiert). Es sei hier vergleichend auf das Gelfoto dieser beiden Proben hingewiesen (Abb. 6). Die Abszisse zeigt dabei die einzelnen Zyklen der PCR, während auf der Ordinate das entsprechende Fluoreszenzsignal abgelesen werden kann. Dieses Fluoreszenzsignal stammt vom Reporter (Real-Time PCR Handbuch, Life Technologies, 2012). Dieses Reportersignal wird als *R* bezeichnet. In jeder Reaktion wird außerdem ein passiver Referenzfarbstoff (6-Carboxy-X-Rhodamin, ROX)

verwendet. Dieser dient der Normalisierung des Fluoreszenzsignals und dem Ausgleich unterschiedlicher Konzentrationen und Volumina, etwa aufgrund von Pipettierungenauigkeiten. Als Rn bezeichnet man dabei das Verhältnis zwischen dem Reportersignal und dem Fluoreszenzsignal des passiven Referenzfarbstoffes. Gerade am Anfang der PCR entstehen Fluktuationen im Fluoreszenzsignal, welche als sogenanntes Hintergrundrauschen bezeichnet werden. Dieses Hintergrundrauschen wird durch die Basislinie definiert. Es wird vom eigentlichen Signal des Reporters abgezogen und so entsteht schließlich der ΔRn -Wert (Application Note „Real Time PCR“ & Handbuch „Real Time PCR“, Life Technologies):

$$\Delta Rn = (\text{Reportersignal} : \text{Signal der passiven Referenz}) - \text{Basislinie}$$

Der Verlauf der Amplifikationskurve lässt sich in drei Abschnitte teilen: die Start-, Exponential- und Plateauphase. Dabei kennzeichnet die Startphase ein Überwiegen des Hintergrundfluoreszenzsignals im Vergleich zum Reportersignal, während sich dieses Verhältnis in der Exponentialphase umkehrt. Der Zyklus der PCR, bei dem das Reporter-Signal das Hintergrundrauschen übersteigt, bezeichnet man als Threshold Cycle (CT-Wert, Schwellenwertzyklus). Durch Vergleich der CT-Werte des Referenz-Assays mit den Werten des Mutation Detection Assays ergibt sich der Mutationsstatus. Entsprechend den Herstellerangaben von Life Technologies kann minimal 0,1 % mutierte DNA nachgewiesen werden. Um also unter 1000 DNA-Templates ein mutiertes Template zu detektieren ($1/1000=0,001=0,1\%$), benötigt man zunächst einmal diese 1000 Gen-Replikate. Dafür sind rund 9,96 Zyklen notwendig: $\log_2(1000)=9,9658 \rightarrow 2^{9,9658}=1000$.

Ein positiver Mutationsstatus kann detektiert werden, wenn die Differenz zwischen dem CT-Wert des Referenz-Assay und dem CT-Wert des Mutations-Assay $\leq 9,96$ aufweisen.

3.8.2 Experimenteller Ablauf

Zunächst wurde der Ansatz aus 3 μl Nuklease-freiem Wasser, 5 μl TaqMan® Master Mix 2x und je 1 μl des jeweiligen Assays (Referenzassay, Mutationsassay) in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Die benötigte Menge wurde dabei auf die Anzahl der zu untersuchenden Proben pro Experiment hochgerechnet. Anschließend wurden je 9 μl des PCR-Mastermix, sowie 1 μl DNA der Tumorproben bzw. der Zelllinien in das entsprechende Well einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie abgeklebt und im Anschluss zentrifugiert. Die qPCR über 40 Zyklen wurde anschließend im StepOnePlus™-Gerät durchgeführt. Tabelle 12 gibt einen Überblick über die einzelnen Phasen der qPCR.

Tab.12: Übersicht über die einzelnen Schritte der PCR und ihre Eigenschaften

Schritt	Temperatur	Zeit [min]	Zyklen
1	95°C	10:00	1
2	92°C	00:15	} 40
3	60°C	01:00	

3.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 22. Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und klinischen und pathologischen Parametern wurden mittels binärer logistischer Regression (BLR) untersucht. Bei der BLR wird der Einfluss mehrerer unabhängiger Variablen (Regressoren) auf eine abhängige Variable untersucht. Die abhängige Variable zeigt dabei eine dichotome Ausprägung (Fromm, 2012). In dieser Arbeit stellt der Mutationsstatus die abhängige Variable dar und zeigt die beiden Kategorien „mutiert“ (Zahlencode „1“) und nicht mutiert (Zahlencode „0“). Als statistische Signifikanzgrenze wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ gewählt. Die Tabelle. 13 gibt einen Überblick über die Gruppe der unabhängigen Variablen.

Tab. 13: Übersicht über die in der BLR betrachteten Variablen in Bezug zum Mutationsstatus

Variablen
<ul style="list-style-type: none"> • Alter • Menopausenstatus • TumorgroÙe (entsprechend der TNM-Klassifikation) • Nodalstatus (entsprechend der TNM-Klassifikation) • Grading • Histologischer Subtyp • Lymphovaskuläre Invasion (L) • Vaskuläre Invasion (V) • Hormonrezeptorstatus, ER-Status, PgR-Status • HER2-Status • HR/HER2-Status • uPA-/PAI-1-Status, uPA-Status, PAI-1-Status

Neben der univariaten Betrachtung erfolgte ebenso die multivariate Untersuchung. Dabei wurde der gleichzeitige Einfluss bzw. Zusammenhang mehrerer Variablen auf den Mutationsstatus untersucht.

Als statistisches Maß wurde das Odds Ratio (OR) als Chancenverhältnis und das jeweilige Konfidenzintervall (KI) angegeben.

Das OR trifft eine Aussage über die Assoziation zweier Variablen. Dabei wird ein Verhältnis zwischen Exponierten und Nicht-Exponierten gebildet. Bei Werten >1 ist die Chance für eine Erkrankung bzw. in der vorliegenden Arbeit die Chance für eine Mutation, für die Gruppe der Exponierten größer als für die Gruppe der Nicht-Exponierten. Bei Werten <1 ist die Chance für einen positiven Mutationsstatus für die Gruppe der Nicht-Exponierten größer.

Beispielhaft für die Assoziation zwischen Mutationsstatus und Tumorgroße:

OR = Exponiert / Nicht-Exponiert

OR= (Mutierte T2-Tumoren : WT T2-Tumoren)/(Mutierte T1-Tumoren : Wildtyp-T1-Tumoren)

OR= (78:265)/(119:300)=0,742

Die Chance für einen positiven Mutationsstatus ist also für die Gruppe der T1-Tumoren größer.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung der TaqMan®-qPCR

Das Prinzip der TaqMan®-qPCR wurde im Kapitel 3.8.1 erläutert. Die Auswertung bezüglich des Mutationsstatus erfolgte über die Amplifikationskurven der eingesetzten Tumor-DNA. In Abbildung 10 sind diese beispielhaft für zwei Patientenproben (M466; M467) dargestellt.



Abb. 10: Amplifikationskurven zweier Patientenproben nach TaqMan-qPCR®: Die Probe M466 weist die Mutation H1047R auf, während die Probe M467 diesen SNP nicht aufweist.

Die Amplifikationskurve für M 466 zeigt für den Referenz-Assay einen CT-Wert von 25,92. Der CT-Wert des Mutation Detection Assays ist 31,14. Als Δ CT ergibt sich der Wert 5,22. Dieser Wert ist kleiner als 9,96 (siehe Kapitel 3.8.1), die Patientenprobe M466 weist die Mutation H1047R auf. Die dargestellte Patientenprobe M 467 weist für den Referenz-Assay einen CT-Wert von 23,59 auf, liefert jedoch keinen CT-Wert für den Mutation Detection Assay. Die Sonde konnte demnach nicht an die Zielsequenz binden, da keine Mutation vorliegt. Der Mutationsstatus für die Probe M467 ist negativ.

4.2 PIK3CA Genmutationen als somatische Mutation

Um zu untersuchen, ob es sich bei den beschriebenen PIK3CA-Genmutationen um Keimbahnmutationen oder um somatische Mutationen im Tumorgewebe handelt, wurde für einige Tumoren stichprobenhaft korrespondierende Leukozyten-DNA aus Blutproben derselben Patientin untersucht.

Es zeigte sich, dass bei diesen Fällen die Mutation in der Tumor-DNA und nicht in der Leukozyten-DNA nachzuweisen war. Für eine Kontrolle der Aktivität des Restriktionsenzym liefen eine DNA-Positivkontrolle (Zelllinie BT-20 für H1047R; Zelllinie MCF-7 für E545K) und eine DNA-Negativkontrolle (Zelllinie MDA 231 für H1047R; Zelllinie BT-20 für E545K) mit.

Daraus lässt sich schließen, dass die PIK3CA-Genmutationen H1047R und E545K als somatische Mutation auftreten.

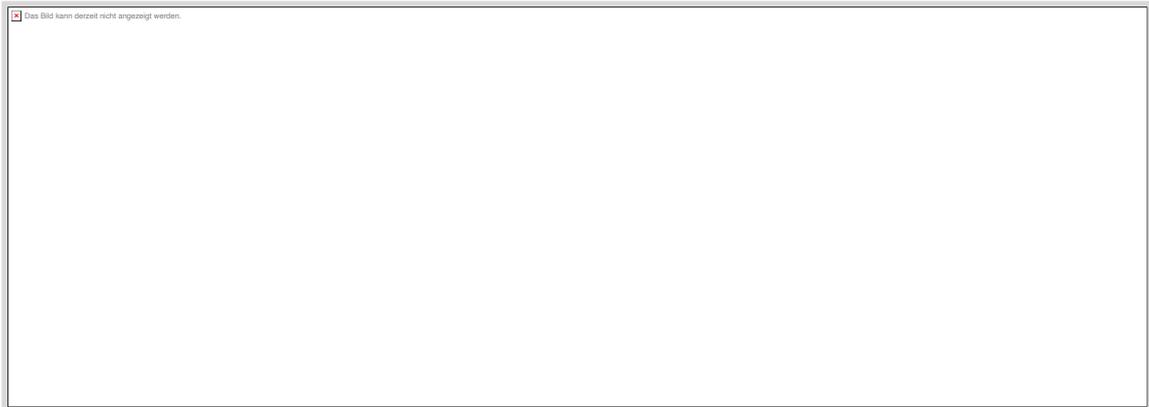


Abb. 11: Vergleich des Mutationsstatus von Tumor-DNA und Keimbahn-DNA aus peripherem Blut für die Mutation H1047R. Die Abbildung zeigt, dass die untersuchte Tumor-DNA die Mutation H1047R aufweist, erkennbar an der Doppelbande. Die entsprechende Keimbahn-DNA weist die Mutation nicht auf. Es handelt sich bei der genannten Mutation demnach um eine somatische Mutation.

4.3 Beschreibung der untersuchten Tumoren in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Es wurden insgesamt 806 Tumorproben von 795 Patientinnen auf ihren Mutationsstatus bezüglich des PIK3CA-Gens untersucht (H1047R und E545K). Insgesamt konnte bei 205 (25,4 %) Tumoren eine Mutation (H1047R und/oder E545K) detektiert werden. Die Mutation H1047R trat bei 136 (66,3 %) Tumoren auf und 71 (34,6 %) Tumoren trugen die Mutation E545K. Zwei Tumoren (0,02 %) zeigten beide Mutationen.

Elf Patientinnen hatten ein bilaterales Mammakarzinom, beide Tumoren wurden in die Analysen aufgenommen. Bei zwei dieser Patientinnen zeigte sich ein unterschiedlicher Mutationsstatus für die Herde in der rechten und der linken Brust. Eine Patientin mit bilateralem Mammakarzinom zeigte in beiden Herden die Mutation H1047R. Bei acht Patientinnen mit beidseitigem Mammakarzinom wies keiner der beiden Herde eine Mutation im PIK3CA-Gen auf.

4.3.1 Klinische Parameter der Patientinnen (Alter, Menopausenstatus) in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die klinischen Parameter der Patientinnen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus.

Der Anteil an mutierten Tumoren war in der Gruppe der Patientinnen 'älter als 50 Jahre' größer (26,0 % vs. 23,7 %) als in der Gruppe der Frauen 'jünger als 50 Jahre'. In der Gruppe der postmenopausalen Frauen war der Anteil an mutierten Proben höher als unter den prä- und perimenopausalen Patientinnen (26,1 % vs. 23,1 % vs. 25,0 %).

Tab.14: Altersverteilung und Menopausenstatus in Bezug zum Mutationsstatus

	Gesamtkollektiv n=795 (%)	Patienten mit Wildtyp-Tumor n=593 (%)	Patienten mit mutiertem Tumor n=202 (%)
Alter			
≤50Jahre	194	148 (76,3)	46 (23,7)
>50 Jahre	601	445 (74,0)	156 (26,0)
Menopausenstatus			
Prämenopausal	169	130 (76,9)	39 (23,1)
Perimenopausal	52	39 (75,0)	13 (25,0)
Postmenopausal	574	424 (73,9)	150 (26,1)

4.3.2 Histopathologische Parameter der Tumoren in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

In Kapitel 3.3 wurde bereits eine Übersicht zu den tumorbiologischen Eigenschaften aller untersuchten Tumoren gegeben unabhängig vom Mutationsstatus. Im folgenden Kapitel folgt die Beschreibung in Abhängigkeit vom Mutationsstatus. Tabelle 15 gibt einen Überblick zu den tumorbiologischen Eigenschaften der mutierten Tumoren (n=205).

Unter den Tumoren, die eine Mutation im PIK3CA-Gen aufwiesen, waren 161 (78,5 %) Tumoren vom duktalem Typ, 37 (18 %) Tumoren vom lobulären Typ und 7 (3,4 %) Tumoren von einem anderen histologischen Typ (1x tubulär, 3x apokrin, 2x tubulo-lobulär, 1x andere).

In der Gruppe der mutierten Tumoren lag der Anteil der T1-Tumoren bei 58 % (n=119), 78 (38 %) Tumoren wurden als T2 klassifiziert, 6 (3 %) Tumoren als T3 und 2 (1 %) Tumoren als T4.

Bei 119 (58 %) Tumoren lagen keine Lymphknotenmetastasen vor, 66 (32,2 %) Tumoren zeigten 1-3 Lymphmetastasen, 12 (5,9 %) Tumoren wurden als N2 und 8 (3,9 %) Tumoren als N3 klassifiziert. Unter den Tumoren mit einer Mutation im PIK3CA-Gen waren 33 (16,1 %) Tumoren gut differenziert, 143 (69,8 %) Tumoren waren mäßig differenziert und 29 (14,1 %) Tumoren waren schlecht differenziert.

Bei 24,9 % (n=51) der mutierten Tumoren wurde eine lymphovaskuläre Invasion diagnostiziert.

Bei einem Tumor (0,5 %) lag eine Blutgefäßinvasion vor.

Der Anteil an HR-positiven Tumoren betrug unter den mutierten Tumoren (n=205) 93,2 % (n=191) und der Anteil an HR-negativen Tumoren lag bei 6,8 % (n=14). Es folgte die getrennte Betrachtung der Hormonrezeptoren: In der Gruppe der Tumoren mit einem positiven PIK3CA-Mutationsstatus (n=205) waren 190 (92,7 %) Tumoren ER-positiv und 15 (7,3 %) Tumoren ER-negativ. Im Hinblick auf den PgR waren 164 (80 %) Tumoren PgR-positiv und 41 (20 %) Tumoren PgR-negativ. In Hinblick auf den HER2-Status waren 18 (8,8 %) Tumoren HER2-positiv und 187 (91,2 %) Tumoren HER2-negativ. Bezogen auf beide Hormonrezeptoren in Kombination mit dem HER2-Status waren 177 (86,3 %) Tumoren HR+/HER2-, 14 (6,8 %) Tumoren waren HR+/HER2+, 4 (2 %) Tumoren waren HER2-positiv bei negativem HR-Status (HR-/HER2+) und 10 (4,9 %) Tumore waren tripelnegativ (HR-/HER2-).

Unter den Tumoren mit positivem Mutationsstatus wiesen 79 (38,5 %) Tumoren einen erhöhten uPA-Wert auf. Bezogen auf den PAI-1-Wert wiesen 98 (47,8 %) Tumoren einen erhöhten Wert auf. Zusammengefasst als uPA/PAI-1-Status zeigten 118 (57,6 %) mindestens einer der beiden Werte (uPA u./od. PAI-1↑; positiver uPA/PAI-1-Status) erhöht.

Tab. 15: Verteilung der tumorbiologischen Parameter in Bezug auf den Mutationsstatus

Eigenschaft	Mutierte Tumoren n=205 (%)	Eigenschaft	Mutierte Tumoren n=205 (%)
Histologie		HR-Status	
Duktal	161 (78,5)	Negativ	14 (6,8)
Lobulär	37 (18,0)	Positiv	191 (93,2)
Andere	7 (3,4)	ER-Status	
Tumorgroße		Negativ	15 (7,3)
T1	119 (58,0)	Positiv	190 (92,7)
T2	78 (38,0)	PgR-Status	
T3	6 (3,0)	Negativ	41 (20,0)
T4	2 (1,0)	Positive	164 (80,0)
Nodalstatus		HER2-Status	
N0	119 (58,0)	Negativ	187 (91,2)
N1	66 (32,2)	Positiv	18 (8,8)
N2	12 (5,9)	HR / HER2-Status	
N3	8 (3,9)	HR+ / HER2-	177 (86,3)
Grading		HR+ / HER2+	14 (6,8)
G1	33 (16,1)	HR- / HER2+	4 (2,0)
G2	143 (69,8)	HR- / HER2-	10 (4,9)
G3	29 (14,1)	uPA-Werte	
Lymphovask. Invasion		Niedrig (<3ng/mg)	126 (61,5)
L0	154 (75,1)	Erhöht (≥3ng/mg)	79 (38,5)
L1	51 (24,9)	PAI-1-Wert	
Vaskuläre Invasion		Niedrig (<14ng/mg)	107 (52,2)
V0	204 (99,5)	Erhöht (≥14ng/mg)	98 (47,8)
V1	1 (0,5)	uPA/PAI-1-Status	
		uPA und PAI-1↓	87 (42,4)
		uPA und /oder PAI-1↑	118 (57,6)

4.4 Die Binäre Logistische Regression (Univariate Betrachtung)

Die statistische Auswertung erfolgte mittels binärer logistischer Regression.

4.4.1 Assoziationen zwischen der Tumorgröße und dem Mutationsstatus

Der Anteil PIK3CA-mutierter Tumoren ist unter den T1-Tumoren am größten (28,4 %) im Vergleich zu der Gruppe der T2, T3 und T4-Tumoren. Die Chance für einen positiven Mutationsstatus ist für T2-Tumoren kleiner (0,7-fach; OR=0,742; 95% KI=0,534-1,032; p=0,076). Für die Gruppe der T3 und T4-Tumoren ist die Möglichkeit einer PIK3CA-Genmutation noch geringer (0,6-fach, OR=0,560; 95% KI=0,253-1,241; p=0,153). Die Zusammenhänge zwischen der Tumorgröße und dem positiven Mutationsstatus sind statistisch nicht signifikant.

Tab. 16: Assoziationen zwischen dem PIK3CA-Mutationsstatus und der Tumorgröße

	Total n=806 (100%)	Wildtyp N=601 (%)	Mutiert N=205 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert (≤0,05)
T1	419	300 (71,6)	119 (28,4)	1		
T2	343	265 (77,3)	78 (22,7)	0,742	0,534-1,032	0,076
T3+T4	44	36 (81,8)	8 (18,2)	0,560	0,253-1,241	0,153

4.4.2 Assoziationen zwischen dem Nodalstatus und dem Mutationsstatus

Zwischen dem Nodalstatus und dem PIK3CA-Mutationsstatus konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

Der größte Anteil mutierter Tumoren war in der Gruppe der N1-Tumoren zu finden (28,8 %). Patientinnen mit einem Lymphknotenbefall (N1) haben eine 1,3-fach erhöhte Chance für eine PIK3CA-Genmutation (OR=1,290; 95% KI=0,907-1,834, p=0,157). Patientinnen mit einem N2 oder N3-Status haben eine 1,1-fach erhöhte Chance (OR=1,080; 95% KI=0,625-1,866; p=0,784).

Tab. 17: Assoziationen zwischen dem PIK3CA- Mutationsstatus und dem Nodalstatus

	Total n=806 (100%)	Wildtyp N=601 (%)	Mutiert N=205 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert (≤0,05)
N0	498	379 (76,1)	119 (23,9)	1		
N1	229	163 (71,2)	66 (28,8)	1,290	0,907-1,834	0,157
N2+N3	79	59 (74,7)	20 (25,3)	1,080	0,625-1,866	0,784

4.4.3 Assoziationen zwischen dem Grading und dem Mutationsstatus

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grading und dem PIK3CA-Mutationsstatus ($p < 0,001$). Der größte Anteil mutierter Tumoren war mit 34,4 % unter den G1-Tumoren zu finden. Unter den G2-Tumoren lag der Anteil bei 28,4 % und unter den G3-Tumoren bei 14 %.

Die Chance für einen positiven Mutationsstatus ist für G1-Tumoren 3,2-fach so hoch wie für G3-Tumoren (OR=3,215; 95% KI=1,808-5,718; $p < 0,001$). Für G2-Tumoren ist die Chance eines positiven Mutationsstatus 2,4-fach so hoch wie für G3-Tumoren (OR=2,438; 95% KI=1,574-3,777; $p < 0,001$).

Tab.18: Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und dem histologischen Grading (G)

	Total n=806 (100%)	Wildtyp N=601 (%)	Mutiert N=205 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert ($\leq 0,05$)
G1	96	63 (65,6)	33 (34,4)	3,215	1,808-5,718	<0,001
G2	503	360 (71,6)	143 (28,4)	2,438	1,574-3,777	<0,001
G3	207	178 (86,0)	29 (14,0)	1		

4.4.4 Assoziationen zwischen dem histologischen Typ und dem Mutationsstatus

Zwischen dem histologischen Typ und dem Mutationsstatus konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang ausgemacht werden.

Der größte Anteil mutierter Tumoren war unter den lobulären Tumoren zu finden (31,6 %). Die Chance für einen positiven Mutationsstatus ist für lobuläre Tumoren 1,4-fach so hoch wie für duktale Tumoren (OR=1,382; 95% KI=0,900-2,121; $p=0,139$). Für alle anderen histologischen Subtypen ist die Chance für einen positiven Mutationsstatus nur halb so groß (OR=0,523; 95% KI=0,230-1,190).

Tab. 19: Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und dem histologischen Typ

	Total n=806 (100%)	Wildtyp N=601 (%)	Mutiert N=205 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert ($\leq 0,05$)
Duktal	642	481 (74,9)	161 (25,1)	1		
Lobulär	117	80 (68,4)	37 (31,6)	1,382	0,900-2,121	0,139
Andere	47	40 (85,1)	7 (14,9)	0,523	0,230-1,190	0,122

4.4.5 Assoziationen zwischen der Gefäßinvasion und dem Mutationsstatus

Zwischen der Gefäßinvasion (LI, VI) und dem Mutationsstatus konnte kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden. Der Anteil mutierter Tumoren war unter den Tumoren ohne eine Gefäßinvasion größer als unter den Tumoren mit einer Gefäßinvasion.

Tab. 20: Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und der Gefäßinvasion

		Total n=806 (100%)	Wildtyp N=601 (%)	Mutiert N=205 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert ($\leq 0,05$)
LI:	L0	587	433 (73,8)	154 (26,2)	1		
	L1	219	168 (76,7)	51 (23,3)	0,854	0,594-1,227	0,393
VI:	V0	797	593 (74,4)	204 (25,6)	1		
	V1	9	8 (88,9)	1 (11,1)	0,363	0,045-2,923	0,341

4.4.6 Assoziationen zwischen dem Rezeptorstatus (HR, HER2) und dem Mutationsstatus

Zwischen dem HR-Status und dem Mutationsstatus besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0,001$). Tumoren mit einem positiven HR-Status haben eine 2,7-fach höhere Chance auf ein somatisches PIK3CA-Mutationsereignis (OR=2,723; 95% KI=1,519-4,881; $p=0,001$).

Bei der differenzierten Betrachtung der Hormonrezeptoren zeigte sich sowohl für den Östrogenrezeptor als auch für den Progesteronrezeptor ein statistisch signifikanter Zusammenhang zum PIK3CA-Mutationsstatus ($p<0,001$). Für ER-positive Tumoren ist die Chance für einen positiven Mutationsstatus 2,7-fach so groß wie für Tumoren mit einem negativen ER-Status (OR=2,744; 95% KI=1,558-4,830; $p<0,001$). Für Tumoren mit einem positiven PgR-Status ist die Chance eines positiven Mutationsstatus circa doppelt so groß (OR=2,055) wie für PgR-negative Tumoren (OR=2,055; 95% KI=1,403-3,010; $p<0,001$).

In Bezug auf den HER2-Status ist der Anteil mutierter Tumoren unter den HER2-negativen Tumoren größer als unter den HER2-positiven Tumoren. Die Chance für einen positiven Mutationsstatus ist für HER2-positive Tumoren nur halb so groß wie für HER2-negative Tumoren (OR=0,533; 95% KI=0,313-0,907). Auch dieser Zusammenhang zeigte sich statistisch signifikant ($p=0,020$).

Im Hinblick auf den kombinierten HR/HER2-Status zeigte sich unter den Tumoren mit positivem HR-Status und negativem HER2-Status der größte Anteil an mutierten Tumoren (28,6 %, $p=0,002$). Die Chance für einen positiven Mutationsstatus war in der Gruppe der Tumoren mit negativem HR-Status und positivem HER2-Status am geringsten (OR=0,850; 95% KI=0,248-2,981; $p=0,305$).

Tab.21: Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und dem Rezeptorstatus

	Total n=806 (100%)	Wildtyp N=601 (%)	Mutiert N=205 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert (≤0,05)
HR-Status						
HR+	692	501 (72,4)	191 (27,6)	2,723	1,519-4,881	0,001
HR-	114	100 (87,7)	14 (12,3)	1		
ER-Status						
ER+	684	494 (72,2)	190 (27,8)	2,744	1,558-4,830	<0,001
ER-	122	107 (87,7)	15 (12,3)	1		
PgR-Status						
PgR+	561	397 (70,8)	164 (29,2)	2,055	1,403-3,010	<0,001
PgR-	245	204 (83,3)	41 (16,7)	1		
HER2-Status						
HER2-	696	509 (73,1)	187 (26,9)	1		
HER2+	110	92 (83,6)	18 (16,4)	0,533	0,313-0,907	0,020
HR/HER2-Status						
HR+ HER2-	618	441 (71,4)	177 (28,6)	2,729	1,374-5,421	0,002
HR+ HER2+	74	60 (81,1)	14 (18,9)	1,587	0,656-3,835	0,004
HR - HER2+	36	32 (88,9)	4 (11,1)	0,850	0,248-2,981	0,305
HR- HER2-	78	68 (87,2)	10 (12,8)	1		

4.4.7 Assoziationen zwischen dem uPA/PAI-1-Status und dem Mutationsstatus

Zwischen dem Mutationsstatus und dem uPA-Wert konnte kein statistischer Zusammenhang festgestellt werden.

Der größte Anteil an mutierten Tumoren war unter den Tumoren mit einem niedrigen uPA-Wert zu finden. Entsprechend dem OR=0,9 ist die Chance für einen positiven Mutationsstatus jedoch für die Tumoren mit einem erhöhten uPA-Wert nur etwas geringer (OR=0,899; 95% KI=0,649-1,243; $p=0,519$).

In Bezug auf den PAI-1-Wert zeigte sich der größere Anteil an Tumoren mit PIK3CA-Genmutation unter den Tumoren mit einem niedrigen PAI-1-Wert. Die Chance eine Mutation im PIK3CA-Gen aufzuweisen, ist für Tumoren mit einem erhöhten PAI-1-Wert um 0,3 geringer (OR=0,737; 95% KI=0,536-1,013; $p=0,060$).

Im Hinblick auf den uPA/PAI-1-Status zeigte sich der größte Anteil an PIK3CA-mutierten Tumoren unter den Tumoren mit einem niedrigen uPA/PAI-1-Status (statistisch nicht signifikant; OR=0,766; 95% KI=0,555-1,059; $p=0,107$).

Tab.22: Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und dem uPA-/PAI-1-Status

	Total n=806 (100%)	Wildtyp N=601 (%)	Mutiert N=205 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert (≤0,05)
uPA-Wert						
niedrig (<3ng/mg)	480	354 (73,8)	126 (26,3)	1		
erhöht (≥3ng/mg)	326	247 (75,8)	79 (24,2)	0,899	0,649-1,243	0,519
PAI-1-Wert						
niedrig (<14ng/mg)	375	268 (71,5)	107 (28,5)	1		
erhöht (≥14ng/mg)	431	333 (77,3)	98 (22,7)	0,737	0,536-1,013	0,060
uPA/PAI-1-Status						
uPA und PAI-1 ↓	304	217 (71,4)	87 (28,6)	1		
uPA und/oder PAI-1 ↑	502	384 (76,5)	118 (23,5)	0,766	0,555-1,059	0,107

4.5 Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung)

In der weiteren Auswertung wurde in einem schrittweisen binären logistischen Regressionsmodell die Assoziation der Variablen Alter, Menopausenstatus, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, HR-Status, ER-Status, PgR-Status, HER2-Status, immunhistochemisch bestimmter Subtyp, uPA-Konzentration, PAI-1-Konzentration, uPA/PAI-1-Status mit dem PIK3CA-Mutationsstatus untersucht.

Wir haben mit unterschiedlicher Darstellung des Hormonrezeptorstatus und des HER2-Status drei verschiedene Modelle gerechnet.

1. Alter, Menopausenstatus, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, **HR-Status**, HER2-Status, uPA-/PAI-1-Status
2. Alter, Menopausenstatus, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, **ER-Status**, **PgR-Status**, HER2-Status, uPA-/PAI-1-Status
3. Alter, Menopausenstatus, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, **HR/HER2-Status**, uPA-/PAI-1-Status

Keine statistisch signifikante Assoziation ergab sich für: Alter der Patientin, Menopausenstatus der Patientin, Tumorgröße, Nodalstatus, histologischer Typs, LI, VI, ER-Status, HER2-Status, immunhistochemisch-bestimmter Subtyp, uPA-Wert, PAI-1-Wert und uPA-/PAI-1-Status.

4.5.1 Modell 1: Alter, Menopausenstatus, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, Histologischer Typ, LI, VI, HR-Status, HER2-Status, uPA/PAI-1-Status)

In Tabelle 23 ist zu sehen, dass bei dem ersten Modell der schrittweisen Betrachtung der unabhängigen Variablen, das Grading im ersten Schritt in die Regressionsgleichung aufgenommen wurde. Dabei zeigte sich, dass die Chance für einen positiven Mutationsstatus für G1-Tumoren 2,6-fach so groß ist wie für G3-Tumoren. Für die G2-Tumoren ist die Chance 2,1-fach so groß. Der HR-Status zeigt die zweitstärkste unabhängige Korrelation. Dieser wurde im zweiten Schritt in die Regressionsgleichung aufgenommen. Hier zeigte sich für Tumoren mit einem positiven HR-Status ein 1,9-fach so großes Risiko für einen positiven Mutationsstatus. Der Einfluss aller anderen unabhängigen Variablen war nicht signifikant.

Tab. 23: Die Variablen Grading und HR-Status mit signifikantem Zusammenhang zum Mutationsstatus

		<i>p-Wert ($\leq 0,05$)</i>	OR	KI (95%)
Schritt 2	G3	0,003	-	-
	G1	0,002	2,623	1,438-4,782
	G2	0,002	2,071	1,308-3,279
	HR-Status	0,044	1,891	1,018-3,511

4.5.2 Modell 2: Alter, Menopausenstatus, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, Histologischer Typ, LI, VI, ER-Status, PgR-Status, HER2-Status, uPA-/PAI-1-Status

Im nächsten Modell wurde die Variable HR-Status gegen den ER-Status und den PgR-Status ersetzt. Die Variable mit dem stärksten Einfluss auf den Mutationsstatus war auch in diesem Modell das Grading. Das OR und das KI sind der Tabelle 24 zu entnehmen. Als zweitstärkster Einflussfaktor zeigte sich der PgR-Status. Die Chance für einen positiven Mutationsstatus ist für PgR positive Tumoren 1,6-fach so groß wie für Tumoren mit einem negativen PgR-Status.

Tab.24: Die Variablen Grading und PgR-Status mit signifikantem Zusammenhang zum Mutationsstatus

		<i>p-Wert ($\leq 0,05$)</i>	OR	KI (95%)
Schritt 2	G3	0,002	-	-
	G1	0,002	2,599	1,428-4,733
	G2	0,001	2,101	1,335-3,307
	PgR-Status	0,017	1,630	1,090-2,436

4.5.3 Modell 3: Alter, Menopausenstatus, Tumorstadium, Nodalstatus, Grading, Histologischer Typ, LI, VI, HR/HER2-Status, uPA-/PAI-1-Status

Im letzten Modell wurden der HR-Status (bzw. der ER-Status und der PgR-Status), sowie der HER2-Status durch die Variable des HR/HER2-Status ersetzt. In diesem Modell zeigte sich nur das Grading als statistisch signifikant.

Tab.25: Die Variable Grading mit signifikantem Zusammenhang zum Mutationsstatus

		<i>p-Wert ($\leq 0,05$)</i>	OR	KI (95%)
Schritt 1 ^a	G3	0,000	-	-
	G1	0,000	3,215	1,808-5,718
	G2	0,000	2,438	1,574-3,777

Es lässt sich zusammenfassen, dass in der multivariaten Betrachtung aller Variablen das Grading, der HR-Status und der PgR-Status signifikant mit einem positiven Mutationsstatus assoziiert sind.

4.6 Assoziationen zwischen klinischen Risikoalgorithmen und dem Mutationsstatus

Die nachstehende Tabelle 26 zeigt verschiedene Risikoeinteilungen (siehe Kapitel 1.5) in Abhängigkeit vom Mutationsstatus. Für diese Betrachtung wurden nur die Patientinnen mit einem Tumorherd betrachtet (n=784).

Entsprechend den klinischen und pathologischen Parametern (als ‚CP‘ abgekürzt) kategorisiert man in eine Niedrigrisiko-Gruppe und eine Hochrisiko-Gruppe (Schmidt et al., 2009). Unter allen betrachteten Tumoren zeigt mit 78,7 % der Großteil der Tumoren ein hohes Risiko für ein Rezidiv und 21,3 % zeigen ein niedriges Risiko. In der Gruppe der Wildtyp-Tumoren liegt der Anteil der Niedrig-Risiko-Tumoren bei 18,9 %, während er in der Gruppe der mutierten Tumoren mit 28,4 % signifikant höher liegt. Der Anteil der Hoch-Risiko-Tumoren ist unter den mutierten Tumoren geringer (71,6 % vs. 81,1 %). Der Anteil der mutierten Tumoren unter den Hochrisiko-Patienten kleiner ist als unter den Niedrigrisiko-Patienten (23,3 % vs. 34,1 %, OR=0,588; 95% KI=0,406-0,851, $p=0,005$).

Der Algorithmus nach St. Gallen kategorisiert in eine Niedrigrisiko-, Mittleres Risiko- und Hochrisiko-Gruppe (Goldhirsch et al., 2007). Im Gesamtkollektiv ist der Großteil mit 78,3 % der Gruppe des Mittleren-Risikos zu zuordnen, 16,3 % haben ein hohes Risiko und 5,4 % ein niedriges Risiko für ein Rezidiv. Unter den Wildtyp-Tumoren ist die Verteilung ähnlich: 77,9 % zeigen ein mittleres Risiko, 17,1 % ein hohes Risiko und 5 % ein niedriges Risiko für ein Rezidiv. Unter den

mutierten Tumoren ist der Anteil des Mittleren Risikos mit 79,6 % am höchsten. Der Anteil der Niedrigrisiko-Tumoren beträgt 6,5 % und der Anteil der Hochrisiko-Tumoren beträgt 13,9 %. Bei einer zeilenweisen Betrachtung kann man sehen, dass der Anteil an mutierten Tumoren in der Gruppe der Patienten mit einem mittleren Risiko kleiner ist als im Vergleich zur Gruppe der Niedrigrisiko-Patienten (26,1 % vs. 31,0 %; OR=0,786; 95% KI=0,399-1,550; $p=0,487$). Auch unter den Patientinnen mit einem hohen Rezidivrisiko ist der Anteil der mutierten Tumoren geringer als unter den Patienten mit einem niedrigen Risiko (21,9 % vs. 31,0 %; OR=0,625; 95% KI=0,287-1,358; $p=0,235$). Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Bei der Risikoabschätzung mittels uPA- und PAI-1-Werten werden Tumoren mit einem niedrigen und einem hohen Risiko unterschieden (Kantelhardt et al., 2011). Unter den betrachteten Tumoren ($n=784$) fallen 25,1 % in die Gruppe mit einem niedrigen Risiko und 74,9 % in die Gruppe mit einem hohen Risiko. Unter den WT-Tumoren verhalten sich die Anteile ähnlich: 24,0 % sind mit einem niedrigen Risiko assoziiert und 76,0 % mit einem hohen Risiko. Unter den mutierten Tumoren fallen 28,4 % in die Niedrigrisiko-Gruppe und 71,6 % in die Hochrisiko-Gruppe. Es lässt sich feststellen, dass der Anteil an mutierten Tumoren in der Gruppe mit niedrigem Risiko größer ist als in der Gruppe mit hohem Risiko (28,9 % vs. 24,5 %). Die beschriebenen Unterschiede erreichen dabei kein Signifikanzniveau.

Tab. 26: Verschiedene Risikoalgorithmen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus (Fortsetzung)

	Total n=784 (100%)	Wildtyp n=583	Mutiert n=201 (%)	OR	KI (95%)	p-Wert ($\leq 0,05$)
CP						
Low Risk	167	110	57 (34,1)			
HighRisk	617	473	144 (23,3)	0,588	0,406-0,851	0,005
St. Gallen 2007						
Low	42	29	13 (31,0)			
Intermediate	614	454	160 (26,1)	0,786	0,399-1,550	0,487
High	128	100	28 (21,9)	0,625	0,287-1,358	0,235
uPA/PAI-1						
Low Risk	197	140	57 (28,9)			
High Risk	587	443	144 (24,5)	0,798	0,557-1,145	0,221

4.7 Immunhistochemisch-bestimmte Subtypen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus

In der nachfolgenden Tabelle 27 sind für $n=183$ Tumoren die immunhistochemisch-bestimmten Subtypen nach St. Gallen 2013 in Abhängigkeit vom Mutationsstatus dargestellt. Für diese

Tumoren war der Proliferationsmarker Ki-67 bestimmt worden und konnte für diese Betrachtung einbezogen werden. Aus der Tabelle geht hervor, dass in der Gruppe der Luminal-A-ähnlichen Tumoren der Anteil an Tumoren mit einer PIK3CA-Genmutation (H1047R, E545K) am höchsten ist (29,7 %). Unter den Luminal-B-ähnlichen Tumoren (HER2-) lag der Anteil an Tumoren mit PIK3CA-Genmutation (H1047R, E545K) bei 25 %. In der Gruppe der Luminal-B-ähnlichen mit positivem HER2-Status lag der Anteil an Tumoren mit PIK3CA-Genmutation bei 16 %. Die Gruppe der HER2 positiven Tumoren mit negativem HR-Status war mit 4 Tumoren die kleinste Gruppe, davon zeigte sich bei einem Tumor eine PIK3CA-Genmutation. Von 16 tripelnegativen Tumoren hatten 3 Tumore (18,7 %) eine PIK3CA-Genmutation.

Tab.27: Immunhistochemisch-bestimmte Subtypen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus (Nach Goldhirsch et al., 2013)

Immunhistochemisch-bestimmte Subtypen	Gesamt n=183	Mutationsstatus gesamt	
		Nicht mutiert n=137 (%)	Mutiert n=46 (%)
Luminal-A-like (ER+, PgR+, HER2-, Ki-67<14%)	74	52 (70,3)	22 (29,7)
Luminal-B-like (HER2-) (ER+, HER2-, at least one of: Ki-67≥14%, PgR-)	64	48 (75,0)	16 (25,0)
Luminal-B-like (HER2+) ER+, HER2+, any Ki-67, any PgR	25	21 (84,0)	4 (16,0)
HER2+ enriched (HR-, HER2+)	4	3 (75,0)	1 (25,0)
Tripelnegativ (HR-, HER2-)	16	13 (81,3)	3 (18,7)

4.8 Assoziationen zwischen klinischen, pathologischen Parametern und der Mutation H1047R

Es folgte eine getrennte Betrachtung der beiden untersuchten Hotspot-Mutationen. Tabelle 28 zeigt die Eigenschaften der Tumoren mit der PIK3CA-Genmutation C775 auf Exon 20 (H1047R) gegenüber Tumoren ohne diese Mutation.

4.8.1 Die Binäre Logistische Regression (Univariate Betrachtung)

Zunächst erfolgte die Untersuchung der einzelnen Variablen in Bezug zum Mutationsstatus. Dabei zeigte sich lediglich für den ER-Status ein statistisch signifikanter Zusammenhang.

Tumoren mit einem positiven ER-Status zeigten eine 1,8-fache Chance einen positiven Mutationsstatus (H1047R) aufzuweisen (OR=1,838; 95% KI=1,002-3,374; $p=0,049$).

Tab. 28: Assoziationen zwischen klinischen, pathologischen Parametern und dem Mutationsstatus (H1047R)

	Wildtyp n=670 (%)		Mut. H1047R n=136 (%)		Total n=806	p-Wert ($\leq 0,05$)	OR	KI (95%)
Alter								
≤50Jahre	165	(83,3)	33	(16,7)	198	0,929	1,020	0,664-1,567
>50Jahre	505	(83,1)	103	(16,9)	608	-	1	-
Menopausenstatus								
Prämenopausal	146	(84,4)	27	(15,6)	173	-	1	-
Perimenopausal	43	(82,7)	9	(17,3)	52	0,769	1,132	0,495-2,589
Postmenopausal	481	(82,8)	100	(17,2)	581	0,621	1,124	0,707-1,787
Tumorgröße								
T1	342	(81,6)	77	(18,4)	419	-	1	-
T2	289	(84,3)	54	(15,7)	343	0,338	0,830	0,567-1,215
T3+T4	39	(88,6)	5	(11,4)	44	0,252	0,569	0,217-1,492
Nodalstatus								
N0	421	(84,5)	77	(15,5)	498	-	1	-
N1	186	(81,2)	43	(18,8)	229	0,264	1,264	0,838-1,907
N2+N3	63	(79,7)	16	(20,3)	79	0,284	1,389	0,762-2,530
Grading								
G1	75	(78,1)	21	(21,9)	96	-	1	-
G2	413	(82,1)	90	(17,9)	503	0,358	0,778	0,456-1,329
G3	182	(87,9)	25	(12,1)	207	0,029	0,491	0,259-0,930
Histolog. Typ								
Duktal	535	(83,3)	107	(16,7)	642	-	1	-
Lobulär	94	(80,3)	23	(19,7)	117	0,430	1,223	0,741-2,019
Andere	41	(87,2)	6	(12,8)	47	0,487	0,732	0,303-1,767
LI								
L0	487	(83,0)	100	(17,0)	587	-	1	-
L1	183	(83,6)	36	(16,4)	219	0,840	0,958	0,631-1,454
VI								
V0	661	(82,9)	136	(17,1)	797	0,999	0,000	-
V1	9	(100)	0	(0,0)	9	-	1	-
HR-Status								
HR+	568	(82,1)	124	(17,9)	692	0,054	1,856	0,989-3,480
HR-	102	(89,5)	12	(10,5)	114	-	1	-
ER-Status								
ER+	561	(82,0)	123	(18,0)	684	0,049	1,838	1,002-3,374
ER-	109	(89,3)	13	(10,7)	122	-	1	-
PgR-Status								
PgR+	458	(81,6)	103	(18,4)	561	0,089	1,445	0,945-2,209
PgR-	212	(86,5)	33	(13,5)	245	-	1	-
HER2-Status								
HER2-	577	(82,9)	119	(17,1)	696	-	1	-
HER2+	93	(84,5)	17	(15,5)	110	0,669	0,886	0,510-1,541
HR/HER2-Status								
HR+ HER2-	507	(82,0)	111	(18,0)	618	0,094	1,916	0,896-4,095
HR+ HER2+	61	(82,4)	13	(17,6)	74	0,196	1,865	0,725-4,799
HR- HER2+	32	(88,9)	4	(11,1)	36	0,890	1,094	0,307-3,899
HR- HER2-	70	(89,7)	8	(10,3)	78	0,292	1	-

Tab. 28: Assoziationen zwischen klinischen, pathologischen Parametern und dem Mutationsstatus (H1047R; Fortsetzung)

uPA-Wert								
Niedrig (<3ng/mg)	398	(82,9)	82	(17,1)	480	-	1	-
Erhöht (≥3ng/mg)	272	(83,4)	54	(16,6)	326	0,847	0,964	0,661-1,404
PAI-1-Wert								
Niedrig (<14ng/mg)	302	(80,5)	73	(19,5)	375	-	1	-
Erhöht (≥14ng/mg)	368	(85,4)	63	(14,6)	431	0,067	0,708	0,489-1,025
uPA-/PAI-1-Status								
uPA und PAI-1 ↓	244	(80,3)	60	(19,7)	304	-	1	-
uPA u./od. PAI-1 ↑	426	(84,9)	76	(15,1)	502	0,092	0,726	0,499-1,054

4.8.2 Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung)

Auch bei der getrennten Untersuchung der beiden Hotspot-Mutationen wurden bei der gleichzeitigen Betrachtung mehrerer Variablen verschiedene Regressionsmodelle gerechnet, um redundante Werte zu vermeiden.

So wurden für das erste Modell Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, HR-Status, HER2-Status und uPA/PAI-1-Status eingeschlossen. Für die kategorialen Variablen wurden die entsprechenden Referenzkategorien festgelegt. Es sei erwähnt, dass es keinen Unterschied machte, ob man den uPA/PAI-1-Status als Variable betrachtet oder getrennt den uPA- und PAI-1-Wert. Bei der multivariaten Betrachtung der genannten Variablen ergab sich keine signifikante Abhängigkeit zum Mutationsstatus.

Im zweiten Modell wurde die Variable des HR-Status durch die beiden Variablen ER-Status und PgR-Status ersetzt. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation zum ER-Status (siehe Tabelle 29).

Im dritten Modell wurden die Variablen ER-Status, PgR-Status und HER2-Status durch die Variable HR/HER2-Status ersetzt. Auch bei diesem Regressionsmodell zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen den betrachteten Variablen und dem Mutationsstatus.

Tab. 29: Die binäre logistische Regression (multivariate Betrachtung für die Mutation H1047R)

	p-Wert	OR	KI (95%)
ER-Status	0,049	1,838	1,002-3,374

4.9 Assoziationen zwischen klinischen, pathologischen Parametern und der Mutation E545K

Es folgte eine getrennte Betrachtung der beiden untersuchten Hotspot-Mutationen. Tabelle 30 zeigt die Eigenschaften der Tumoren mit der PIK3CA-Genmutation Cosmid 763 auf Exon 9 (E545K) gegenüber Tumoren ohne diese Mutation.

4.9.1 Die Binäre Logistische Regression (Univariate Betrachtung)

Von den 205 mutierten Tumoren zeigten 71 Tumoren die Mutation E545K. In Tabelle 30 ist die Verteilung der klinischen, pathologischen Parameter in Abhängigkeit vom Mutationsstatus dargestellt. Die angegebenen OR und KI beziehen sich dabei auf die Betrachtung der einzelnen Variablen in Bezug zum Mutationsstatus. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation zu Grading, HR-Status, ER-Status, PgR-Status, HER2-Status und HR/HER2-Status.

Tab. 30: Die klinischen und pathologischen Parameter in Abhängigkeit vom Mutationsstatus für die Mutation E545K

	Wildtyp n=735 (%)	Mut. E545K n=71 (%)	Total n=806	p-Wert (≤0,05)	OR	KI (95%)
Alter						
≤50Jahre	184 (92,9)	14 (7,1)	198	-	1	-
>50Jahre	551 (90,6)	57 (9,4)	608	0,322	1,360	0,740-2,497
Menopausenstatus						
Prämenopausal	160 (92,5)	13 (7,5)	173	-	1	-
Perimenopausal	48 (92,3)	4 (7,7)	52	0,966	1,026	0,320-3,292
Postmenopausal	527 (90,7)	54 (9,3)	581	0,471	1,261	0,671-2,370
Tumorgröße						
T1	375 (89,5)	44 (10,5)	419	-	1	-
T2	319 (93,0)	24 (7,0)	343	0,093	0,641	0,381-1,078
T3+T4	41 (93,2)	3 (6,8)	44	0,446	0,624	0,185-2,098
Nodalstatus						
N0	454 (91,2)	44 (8,8)	498	-	1	-
N1	206 (90,0)	23 (10,0)	229	0,601	1,152	0,678-1,958
N2+N3	75 (94,9)	4 (5,1)	79	0,266	0,550	0,192-1,576
Grading						
G1	82 (85,4)	14 (14,6)	96	-	1	-
G2	450 (89,5)	53 (10,5)	503	0,251	0,690	0,366-1,301
G3	203 (98,1)	4 (1,9)	207	<0,001	0,115	0,037-0,361
Histologischer Typ						
Duktal	587 (91,4)	55 (8,6)	642	-	1	-
Lobulär	103 (88,0)	14 (12,0)	117	0,242	1,451	0,778-2,705
Andere	45 (95,7)	2 (4,3)	47	0,311	0,474	0,112-2,008
LI						
L0	531 (90,5)	56 (9,5)	587	-	1	-
L1	204 (93,2)	15 (6,8)	219	0,233	0,697	0,386-1,261
VI						
V0	727 (91,2)	70 (8,8)	797	-	1	-
V1	8 (88,9)	1 (11,1)	9	0,807	1,298	0,160-10,53

Tab. 30: Die klinischen und pathologischen Parameter in Abhängigkeit vom Mutationsstatus für die Mutation E545K (Fortsetzung)

	Wildtyp n=735 (%)	Mut. E545K n=71 (%)	Total n=806	p-Wert ($\leq 0,05$)	OR	KI (95%)
HR-Status						
HR+	623 (90,0)	69 (10,0)	692	0,012	6,202	1,499-25,67
HR-	112 (98,2)	2 (1,8)	114	-	1	-
ER-Status						
ER+	615 (89,9)	69 (10,1)	684	-	6,732	1,628-27,83
ER-	120 (98,4)	2 (1,6)	122	0,008	1	-
PgR-Status						
PgR+	498 (88,8)	63 (11,2)	561	0,001	3,748	1,767-7,948
PgR-	237 (96,7)	8 (3,3)	245	-	1	-
HER2-Status						
HER2-	626 (89,9)	70 (10,1)	696	-	1	-
HER2+	109 (99,1)	1 (0,9)	110	0,014	0,082	0,011-0,597
HR/HER2-Status						
HR+ HER2-	550 (89,0)	68 (11,0)	618	0,034	4,698	1,128-19,56
HR+ HER2+	73 (98,6)	1 (1,4)	74	0,597	0,521	0,046-5,865
HR- HER2+	36 (100,0)	0 (0,0)	36	0,998	0	-
HR- HER2-	76 (97,4)	2 (2,6)	78	0,029	1	-
uPA-Wert						
Niedrig (<3ng/mg)	434 (90,4)	46 (9,6)	480	-	1	-
Erhöht (≥ 3 ng/mg)	301 (92,3)	25 (7,7)	326	0,348	0,784	0,471-1,303
PAI-1-Wert						
Niedrig (<14ng/mg)	339 (90,4)	36 (9,6)	375	-	1	-
Erhöht (≥ 14 ng/mg)	396 (91,9)	35 (8,1)	431	0,460	0,832	0,511-1,355
uPA-/PAI-1-Status						
uPA und PAI-1 ↓	275 (90,5)	29 (9,5)	304	-	-	-
uPA u./od. PAI-1 ↑	460 (91,6)	42 (8,4)	502	0,569	0,866	0,527-1,422

4.9.2 Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung):

Alter, Menopausenstatus, Tumorgroße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, HR-Status, HER2-Status, uPA/PAI- Status

Bei der multivariaten Betrachtung der Variablen Alter, Menopausenstatus, Tumorgroße, Nodalstatus, Grading, histologischer Subtyp, HR-Status, HER2-Status, lymphovaskuläre Invasion, Gefäßinvasion und uPA/PAI-1-Status zeigten das histologische Grading sowie der HER2-Status einen signifikanten Zusammenhang zum Mutationsstatus (siehe Tab. 31).

Tab.31: Die Variablen Grading und HER2-Status zeigen einen statistisch signifikanten Zusammenhang zum Mutationsstatus (E545K)

		p-Wert ($\leq 0,05$)	OR	KI (95%)
Schritt	G3	0,003	-	-
	G1	0,001	6,991	2,226-21,959
	G2	0,002	5,253	1,870-14,758
	HER2-Status	0,029	0,108	0,015-0,794

4.9.3 Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung): Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, ER-Status, PgR-Status, HER2-Status, uPA-/PAI-1-Status

Bei der gleichzeitigen Betrachtung der Variablen Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, ER-Status, PgR-Status, HER2-Status, LI, VI und uPA/PAI-1-Status zeigten die Variablen Grading, HER2-Status und PgR-Status einen statistisch signifikanten Zusammenhang zum Mutationsstatus (Cosmid 763, Exon 9, E545K).

Tab. 32: Die Variablen Grading, HER2-Status und PgR-Status mit statistisch signifikantem Zusammenhang zum Mutationsstatus

		<i>p-Wert ($\leq 0,05$)</i>	OR	KI (95 %)
Schritt 3	Grading	0,021	-	-
	Grading(1)	0,007	5,037	1,560-16,257
	Grading(2)	0,008	4,116	1,439-11,777
	HER2-Status	0,039	0,123	0,017-0,904
	PgR-Status	0,032	2,343	1,077-5,096

4.9.4 Die Binäre Logistische Regression (Multivariate Betrachtung): Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, Grading, histologischer Typ, LI, VI, HR/HER2-Status; uPA/PAI-1-Status

Bei der Betrachtung der Variablen Alter, Menopausenstatus, Tumorgröße, Nodalstatus, histologischer Typ, LI, VI, HR/HER2-Status und uPA/PAI-1-Status zeigten die Variablen Grading und der HR/HER2-Status einen statistisch signifikanten Zusammenhang mit dem Mutationsstatus (E545K).

Tab. 33: Die Variablen Grading und HR/Her2-Status mit statistisch signifikantem Zusammenhang

		<i>p-Wert ($\leq 0,05$)</i>	OR	KI (95 %)
Schritt 2	Grading	0,013	-	-
	Grading(1)	0,004	5,614	1,735-18,161
	Grading(2)	0,006	4,374	1,521-12,582
	HR/HER2-Status	0,043	-	-
	HR/HER2-Status	0,025	0,102	0,014-0,748
	HR/HER2-Status	0,233	0,408	0,094-1,780

5 Diskussion

Der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg gehört zu den am häufigsten dysregulierten Signalwegen der Tumorzellen beim Mammakarzinom (COSMIC-Datenbank; Forbes et al., 2015). Schätzungsweise 29 % aller Brustkrebstumoren weisen genetische Aberrationen im PIK3CA-Gen auf. Die prognostische und prädiktive Bedeutung dieser Mutationen wird kontrovers diskutiert.

5.1 Das untersuchte Kollektiv

Das betrachtete Kollektiv (n=795) umfasste Patientinnen einer prospektiven, multizentrischen Kohortenstudie. Einschlusskriterien der Studie waren das neu diagnostizierte Mammakarzinom ohne Fernmetastasen, die Operabilität des Tumors, das weibliche Geschlecht, sowie ein Mindestalter von 18 Jahren. Patientinnen mit einer weiteren Krebserkrankung innerhalb der letzten 5 Jahre wurden ausgeschlossen. (Clinical Trials Identifikationsnummer: NCT01592825). Ein Vorteil des untersuchten Kollektivs ist die umfangreiche Stichprobe von insgesamt 806 Tumoren, sowie die prospektive Rekrutierung der eingeschlossenen Patientinnen. Dennoch muss man sagen, dass keine ganzheitlichen Aussagen zur Bedeutung der PIK3CA-Genmutationen bzw. deren Prävalenz gemacht werden kann, da beispielsweise die Gruppe der Mammakarzinome mit primärer Fernmetastasierung nicht untersucht wurden.

5.2 Prävalenz der PIK3CA-Genmutationen beim Mammakarzinom

In der vorliegenden Arbeit wurde das Tumorfriechmaterial einer Kohorte von Brustkrebspatientinnen auf das Vorliegen der beiden häufigsten PIK3CA-Genmutationen (Exon 20: c. 3140 A > G, p. H 1047 R, COSMIC ID C775 und Exon 9: c. 1633 G > A, p. E 545 K, COSMIC ID C 763) untersucht. Von insgesamt 806 in die Studie einbezogenen Tumoren zeigten 205 (25,4 %) Tumoren eine Mutation im PIK3CA-Gen. Der Großteil der mutierten Tumoren mit 66,3 % (n=136) zeigte die Mutation H1047R und 34,6 % (n=71) zeigten die Mutation E545K. Lediglich zwei Patienten (0,9 %) zeigten beide Mutationen. Diese Zahlen entsprechen der Größenordnung bereits veröffentlichter Arbeiten, sowie der COSMIC-Datenbank (Datenbank des Sanger Instituts; Dumont et al., 2012; Forbes et al., 2015). Vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen lag die Prävalenz der H1047R-Mutation höher als die Prävalenz der E545K-Mutation (Abramson et al., 2014; Harle et al., 2013; Ramirez-Ardila et al., 2013). Im Kontrast dazu steht eine Arbeit von Wu und Kollegen (2005). Dabei zeigte sich eine größere Prävalenz für die Mutation E545K. Allerdings wurden bei dieser Arbeit lediglich 92 primäre Brustkrebstumoren untersucht, von denen 20,6 % eine PIK3CA-Genmutation aufwiesen. Acht der mutierten Tumoren zeigten die Mutation E545K, fünf Tumoren die Mutation H1047R und sechs Tumoren eine andere PIK3CA-Genmutation (Wu et al., 2005). Auch in der Arbeit von

Campbell und Kollegen (2004) war die Mutation E545K häufiger als die Mutation H1047R, wobei auch hier nur eine kleine Fallzahl an Brustkrebstumoren untersucht wurde (n=70; Campbell et al., 2004).

Es ist möglich, dass die tatsächliche Prävalenz noch höher liegt, da in der vorliegenden Arbeit lediglich die beiden häufigsten beschriebenen Genmutationen des PIK3CA-Gens untersucht wurden. Andere Mutationen wie E542K, N345K oder auch Genamplifikationen, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht betrachtet.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich mit dem Thema der PIK3CA-Genamplifikation (copy number variation = CNV) beschäftigt. In der bereits erwähnten Arbeit von Wu und Kollegen (2005) wurden neben Mutationen im Exon 9 und Exon 20 auch Amplifikationen des PIK3CA-Gens betrachtet. Es zeigte sich eine Prävalenz von 8,7 % unter den 92 untersuchten Tumoren. Mögliche Assoziationen zur prognostischen Bedeutung dieser Genamplifikationen wurden nicht untersucht. In einer Arbeit von Gonzalez-Angulo und Kollegen (2013) wurden die Genamplifikationen zwei verschiedener Gene der PI3K-Kaskade betrachtet, u.a. des PIK3CA-Gens. Von 971 untersuchten Tumorproben zeigte sich bei 13,8 % eine Genamplifikation. Diese Tumoren waren mit biologisch ungünstigeren Eigenschaften assoziiert, z.B. größere Tumoren, schlechtes Grading und es bestand eine Assoziation zu tripelnegativen Tumoren. Im Hinblick auf das 5-Jahre-Rückfall-freie-Überleben (Relapse Free Survival; RFS) ergab sich ein schlechteres Überleben für Patienten mit einer PIK3CA-Genamplifikation gegenüber Patienten ohne PIK3CA-Amplifikation (73,1 % vs. 82,3 %; Gonzalez-Angulo et al., 2013).

5.3 Die PCR als Methode zur Ermittlung des Mutationsstatus

Für die Untersuchung des Mutationsstatus wurden zwei verschiedene PCR-Methoden angewandt. Für ein Teilkollektiv von 200 Tumorproben wurde zunächst eine konventionelle genspezifische PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau in der potentiellen Mutationsstelle durchgeführt. Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente nach dem Enzymverdau. Anhand des entstandenen Bandenmusters der Fragmente konnte eine Aussage zum Mutationsstatus getroffen werden. Dieses Teilkollektiv wurde untersucht, um zunächst einen Überblick über die Häufigkeit und erste mögliche Assoziationen zwischen Mutationsstatus und tumorbiologischen Eigenschaften auszumachen. Für alle Tumorproben erfolgte im Verlauf die PIK3CA-Mutations-Untersuchung mittels des kommerziellen TaqMan-Assays der Fima Life Technologies (siehe Kapitel Material und Methoden).

Für beide Methoden lassen sich Limitationen aufzeigen: So können Fehler beim Durchführen der Experimente oder technische Fehler auftreten. Die nachstehende Tabelle soll einen Überblick der Fehlerbetrachtung geben.

Tab. 34: Fehlerbetrachtung zum experimentellen Ablauf

Fehler beim Durchführen der Experimente	Technische Limitationen
- Pipettierfehler	- Fehlerhafte Eichung der Geräte
- Verunreinigungen von Proben	- Unzureichende DNA-Menge nach
	DNA-Extraktion

Andere Arbeitsgruppen nutzen die Methode der DNA-Sequenzierung nach Sanger. Ein Vorteil dieser Methodik ist die Genauigkeit der Untersuchung möglicher Punktmutationen und beispielsweise die Möglichkeit, neue Polymorphismen aufzuzeigen.

5.4 PIK3CA-Genmutationen als somatische Mutation

Verschiedene Arbeitsgruppen haben vergleichend zum Tumorgewebe Normalgewebe auf den PIK3CA-Mutationsstatus untersucht und festgestellt, dass die Mutationen lediglich im Tumor auftreten (Wu et al., 2005; Li et al., 2006; Campbell et al., 2004). Das Normalgewebe zeigte keine Mutation im PIK3CA-Gen. Daraus folgernd wurden die Mutationen als somatische Mutation eingeordnet.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde stichprobenhaft die DNA aus peripheren Blutproben auf den Mutationsstatus untersucht. Es zeigte sich für alle DNA-Proben aus Blutzellen ein negativer Mutationsstatus des PIK3CA-Gens und die Ergebnisse früherer Untersuchungen konnten somit bestätigt werden.

5.5 Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und klinischen, pathologischen Parametern

In einer Vielzahl von Arbeiten wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen dem PIK3CA-Mutationsstatus und klinischen, pathologischen Parametern untersucht. Die Daten dazu sind jedoch gegensätzlich.

Manche Arbeitsgruppen konnten keine Assoziation zeigen, so etwa Harle et al. (2013), López-Knowles et al. (2010), Barbareschi et al. (2007), Campbell et al. (2004) und Bachman et al. (2004).

5.5.1 Alter und Menopausenstatus

In Bezug auf das Alter und den Menopausenstatus der Patientinnen konnte in der vorliegenden Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang zum Mutationsstatus festgestellt werden. Der Anteil an Tumoren mit einer PIK3CA-Genmutation war unter den Frauen > 50 Jahre nur

gering höher als bei den Frauen ≤ 50 Jahre (23,7 % vs. 25,6 %). Der Anteil an Tumoren mit einer PIK3CA-Genmutation war unter den postmenopausalen Frauen tendenziell etwas höher als unter den peri- und prämenopausalen Patientinnen (26 % vs. 25 % vs. 23,1 %) Auch in Arbeiten von Harlé et al. (2013) und Cizkova et al. (2012) konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zum Alter festgestellt werden, zum Menopausenstatus wurde in beiden Studien kein Bezug genommen. In einer Studie von Kalinsky und Kollegen (2009) konnte eine signifikante Assoziation zum Alter und zum Menopausenstatus aufgezeigt werden. Die Gruppe untersuchte insgesamt 590 Tumor-Proben. Dabei zeigte sich, dass die PIK3CA-Genmutationen v.a. in der älteren Studienpopulation (50-69 Jahre und ≥ 70 Jahre) und in der Gruppe der postmenopausalen Frauen zu finden sind. In einer Arbeit von Abramson und Kollegen (2014) konnte ebenfalls eine signifikante Assoziation zum Alter festgestellt werden: Es wurden insgesamt 312 Brustkrebspatienten untersucht. Dabei wurden auch Patientinnen mit Fernmetastasen eingeschlossen. Das mediane Alter des Kollektivs lag mit 51,8 Jahren deutlich unter dem medianen Alter der hier vorliegenden Studie (63 Jahre). In der Arbeit von Abramson und Kollegen (2014) waren die Patientinnen, die eine PIK3CA-Genmutation im Tumor aufwiesen, statistisch signifikant häufiger >50 Jahre als die Patientinnen, deren Tumor keine Mutation aufwies.

5.5.2 Tumorgroße

Bezüglich der Tumorgroße konnte in der vorliegenden Studie kein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Es zeigte sich die Tendenz, dass der Anteil an Tumoren mit einer PIK3CA-Genmutation unter den kleineren Tumoren (T1) am größten ist. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch in Studien anderer Forschungsgruppen: So war bei Cizkova et al. (2012) und bei Kalinsky et al. (2009) der Anteil an PIK3CA-Genmutationen unter den kleineren Tumoren signifikant am größten.

5.5.3 Nodalstatus

In Bezug auf den Nodalstatus konnte in der vorliegenden Arbeit kein statistisch signifikanter Zusammenhang gezeigt werden. Der Anteil an Tumoren mit einer PIK3CA-Genmutation war unter den Patientinnen mit 1 bis 3 befallenen Lymphknoten (N1) nur gering höher als unter den Patientinnen ohne befallene Lymphknoten (N0) und unter Patientinnen mit 4-9 befallenen Lymphknoten (N2). Auch bei Cizkova et al. (2012), Maruyama et al. (2007) und Abramson et al. (2014) konnte keine signifikante Assoziation herausgestellt werden. Hingegen zeigte sich bei Kalinsky et al. (2009) ein signifikanter Zusammenhang zu einem negativen Nodalstatus.

5.5.4 Grading

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem Grading und dem PIK3CA-Mutationsstatus festgestellt werden. Die Tumoren mit einem niedrigen Grading (G1) und einem mittleren Grading (G2) waren signifikant häufiger mutiert als Tumoren mit einem hohen Grading (G3).

Bei der Betrachtung der Gruppe der mutierten Tumoren zeigte der Großteil einen mäßigen Differenzierungsgrad (G2).

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Arbeiten von Cizkova et al. (2012) und Kalinsky et al. (2009). Auch hier war der Anteil der mutierten Tumoren unter den G1-Tumoren am größten und unter den G3-Tumoren am geringsten. Ferner zeigte der Großteil der Tumoren einen mittleren Differenzierungsgrad.

5.5.5 Histologischer Typ

Bezüglich des histologischen Typs konnte kein signifikanter Zusammenhang zum Mutationsstatus festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch, dass der Anteil der Tumoren mit PIK3CA-Genmutation unter den lobulären Tumoren (31,6 %) höher war als unter den duktalem Tumoren (25,1 %) oder unter den Tumoren anderer Histologie (14,9 %). Auch bei Cizkova und Kollegen (2012) und Abramson und Kollegen (2014) ergaben sich keine signifikanten Assoziationen zum histologischen Typ. In der Studie von Cizkova et al. (2012) war der Anteil der mutierten Tumore unter den duktalem und lobulären Tumoren ähnlich (33,2 % vs. 34,5 %). In der Arbeit von Abramson et al. (2014) war der Anteil der PIK3CA-mutierten Tumoren unter den lobulären Tumoren (33,3 %) höher als unter den duktalem Tumoren (25,4 %). Allerdings wurden bei dieser Studie bei insgesamt 312 untersuchten Tumoren nur insgesamt 12 lobuläre Tumoren betrachtet. Aufgrund dieser geringen Fallzahl muss der Anteil der PIK3CA-mutierten Tumoren unter den lobulären Tumoren kritisch bewertet werden. Buttitta et al. (2006) untersuchten 180 invasive Brustkrebstumore. Es zeigte sich, dass der Anteil der Tumore mit einer PIK3CA-Genmutation unter den lobulären Tumoren (46 %) signifikant höher war als unter den duktalem (22 %), medullären (10 %), muzinösen (5 %) oder papillären Tumoren (12 %).

5.5.6 Hormonrezeptor-Status

In der vorliegenden Arbeit fand sich eine Assoziation zwischen einem positiven Mutationsstatus und einem positiven Hormonrezeptorstatus. Bei der getrennten Betrachtung des ER-Status und des PgR-Status zeigte sich in der univariaten Analyse ebenso ein Zusammenhang: Der Anteil mutierter Tumoren war unter den ER-positiven und unter den PgR-positiven Tumoren größer als unter den jeweils Hormonrezeptor-negativen Tumoren. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit anderen Arbeiten (Abramson et al., 2014; Cizkova et al., 2012). In den Studien von Harlé et al.

(2013) und Barbareschi et al. (2007) fand sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Mutationsstatus und Hormonrezeptorstatus. In der multivariaten Analyse war schließlich nur der PR-Status mit dem Mutationsstatus assoziiert.

5.5.7 HER2-Status

In der univariaten Betrachtung zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen negativem HER2-Status und positivem PIK3CA-Mutationsstatus: Unter den HER2-negativen Tumoren war der Anteil an Tumoren mit PIK3CA-Genmutation (H1047R, E545K) größer als unter den HER2-positiven Tumoren (26,9 % vs. 16,4 %). Diese Beobachtung deckt sich mit vorherigen Studien (Abramson et al., 2014)

Saal und Kollegen (2005) hingegen beschrieben eine statistisch signifikante Korrelation zwischen PIK3CA-Mutationen und positiven HER2-Status. So waren unter allen HER2-positiven Tumoren 31 % der Tumore mutiert und unter allen HER2-negativen Tumoren nur 19 % der Tumore mutiert. (Saal et al., 2005).

5.6 Prognostische Bedeutung der PIK3CA-Genmutationen

In der vorliegenden Studie waren die Tumoren mit einer PIK3CA-Genmutation statistisch signifikant mit prognostisch günstigen Eigenschaften, wie beispielsweise positivem Hormonrezeptorstatus und einem guten Differenzierungsgrad (G1), assoziiert.

Kontroverser Weise resultieren die Mutationen im PIK3CA-Gen in einer Steigerung der Lipidkinaseaktivität. In einer Arbeit von Samuels und Kollegen (2004) konnte eine gesteigerte Enzymtätigkeit bei Tumoren mit PIK3CA-Mutation gezeigt werden. In Arbeiten von Kang und Kollegen (2005) konnte gezeigt werden, dass diese beiden betrachteten Mutationen als Onkogene agieren und eine Hochregulation des PI3K-Signalweges bewirken (Kang et al., 2005). Trotz dieser Auswirkung auf den Signalweg ergab die vorliegende Studie und auch andere Studien eine statistisch signifikante Assoziation eines positiven PIK3CA-Mutationsstatus zu prognostisch günstigen Tumoreigenschaften, wie positivem Hormonrezeptor-Status, niedrigem Grading und negativem HER2-Status. Eine Erklärung hierfür konnte bisher nicht erbracht werden, lediglich Hypothesen wurden formuliert. Eine Studie von Loi und Kollegen (2010) ergab eine Assoziation zwischen PIK3CA-Genmutationen und niedrigen mTORC1-Signal. Dies würde bedeuten, dass trotz einer Gain-of-function-Mutation nachgeordnete Proteine der Signalkaskade keine Hochregulation erfahren (Loi et al., 2010).

In einer Arbeit von Cizkova und Kollegen (2012) konnte gezeigt werden, dass Tumoren mit einer PIK3CA-Genmutation eine Überexpression von Proteinen des Wnt-Signalweges aufwiesen. So zeigte sich eine verstärkte Expression des Liganden WNT5A. Untersuchungen ergaben eine

günstigere Prognose bei WNT5A-Expression aufgrund geringerer Migration und Invasivität (Cizkova et al., 2012).

5.7 Prädiktive Bedeutung der PIK3CA-Genmutationen

Neben der prognostischen Bedeutung der PIK3CA-Genmutationen wird auch eine prädiktive Bedeutung diskutiert.

5.7.1 Endokrine Resistenz

Circa 75 % aller Mammakarzinome weisen einen positiven Estrogenrezeptorstatus auf. Über diesen Hormonrezeptor wird eine Vielzahl genomischer und nicht-genomischer Effekte vermittelt, die einen wesentlichen Effekt auf die Proliferation der Krebszellen, das Überleben der Zelle und die Invasion von Brustkrebszellen haben. Eine der wichtigsten Therapiesäulen beim HR-positiven Mammakarzinom ist daher der Einsatz endokriner, anti-östrogener Therapeutika. Dabei werden verschiedene Substanzklassen unterschieden (z.B. Tamoxifen, Aromatase-Inhibitoren u.a.). Durch den Einsatz endokriner Therapeutika, wie z.B. Tamoxifen, konnte die Mortalität beim ER-positiven Mammakarzinom erheblich gesenkt werden (EBCTCG, 2011). Dennoch profitieren nicht alle Patientinnen von diesen Medikamenten: So weisen Patientinnen zum Teil eine intrinsische Resistenz gegen diese Mittel auf oder erwerben im Laufe der Behandlungszeit eine solche. Gegenstand der Forschung ist es, die Mechanismen, die hinter dieser endokrinen Resistenz stecken, zu verstehen und einen Weg zu finden, diese zu umgehen. Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über mögliche Mechanismen der endokrinen Resistenzbildung (Zhao und Ramaswamy, 2014) .

Tab. 35: Übersicht möglicher Mechanismen bei der Entwicklung endokriner Resistenzen

1) Intrinsische Resistenz	(bereits vor einer endokrinen Therapie vorhanden)
<ul style="list-style-type: none"> - Störung der ERα-Expression - Genmutationen des ERs - Expression einer inaktiven Form von CYP2D6 (Unfähigkeit der Konversion von Tamoxifen in aktive Form) 	
2) Erworben Resistenz	(entwickelt sich unter einer endokrinen Therapie)
<ul style="list-style-type: none"> - Dysregulationen im Östrogen-Signalweg - Aktivierung von Wachstumsfaktor-Signalkaskaden - Dysregulationen des Zellzyklus und der Apoptose - Epigenetische Veränderungen - Mikro-RNA 	

Auch der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg scheint mit der Entstehung endokriner Resistenzen in Zusammenhang zu stehen. Campbell und Kollegen (2001) konnten zeigen, dass AKT und PI3K direkt den Östrogenrezeptor phosphorylieren und aktivieren, und so die Östrogen-unabhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren vermitteln können (Peleg Hasson et al., 2013; Campbell et al., 2001). Studien von Miller und Kollegen (2010) zeigten, dass Zelllinien, die lange Zeit einer Östrogen-Deprivation ausgesetzt waren, eine verstärkte Aktivität des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges aufweisen. Es zeigten sich erhöhte Spiegel der phosphorylierten AKT-Kinase und der phosphorylierten mTOR-Substrate. Durch den Einsatz von PI3K-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren kam es zur Apoptose dieser Zellen (Peleg Hasson et al., 2013; Miller et al., 2010). Insgesamt wird deutlich, dass die Vernetzungen zwischen dem ER-Signalweg und dem PI3K-Signalweg komplex sind. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der endokrinen Resistenzbildung spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung neuer Therapeutika in der Behandlung des Mammakarzinoms. Möglicherweise stellt die Kombination endokriner Therapeutika mit neuen zielgerichteten Medikamenten (z.B. PI3K-Inhibitoren) eine Möglichkeit dar, solche Therapieresistenzen zu überwinden.

5.7.2 HER2-gerichtete Therapie-Resistenz

Circa ein Fünftel aller Mammakarzinome ist HER2-positiv oder zeigt eine Amplifikation des ERBB2-Gens und / oder eine Überexpression von HER2. Diese Tumoren gelten als aggressiver, die Patientinnen haben ein schlechteres Gesamtüberleben und ein höheres Risiko für eine Progression. Die Entwicklung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab erbrachte einen wesentlichen Vorteil in der Therapie der HER2-positiven Mammakarzinome. Doch ähnlich wie bei den endokrinen Therapeutika weisen Patientinnen zum Teil eine Resistenz gegen die HER2-gerichteten Medikamente auf. Auch dabei wird die mögliche Rolle des PI3K-AKT-Signalweges diskutiert.

Chandarlapaty und Kollegen untersuchten HER2-positive Brustkrebstumoren von insgesamt 63 Patientinnen mit einem Rezidiv oder einer Progression trotz initialer Trastuzumab-Therapie. Dabei zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer Trastuzumab-Therapieresistenz und einer Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges (aktivierende PIK3CA-Mutationen oder loss-of-PTEN) (Chandarlapaty et al., 2012).

5.8 PIK3CA als target of therapy - PI3K-Inhibitoren

Die Entwicklung von Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges stellt einen neuen Therapieansatz in der Behandlung des Mammakarzinoms dar. Diverse Wirkstoffe wurden bereits in die Testung im Rahmen klinischer Studien aufgenommen. Die nachstehende Tabelle

gibt einen Überblick über einige dieser Wirkstoffe. Dabei werden unterschiedliche Angriffspunkte unterschieden, beispielsweise Pan-PI3K-Inhibitoren, selektive PI3K-Inhibitoren, PI3K/AKT-Inhibitoren und mTOR-Inhibitoren. Gegenstand der laufenden klinischen Studien ist es, herauszufinden, wie sicher diese Medikamente sind, welche Patientinnen von dieser Therapie profitieren und in wieweit der PIK3CA-Mutationsstatus einen Einfluss auf den Einsatz dieser Medikamente hat.

Tab. 36: Übersicht einiger Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges (Lux et al., 2016)

Wirkmechanismus	Wirkstoffname
Pan-PI3K-Klasse 1-Inhibitor	BKM120 (Buparlisib); GDC-0941 (Pictilisib)
Isoform-selektiver-PI3K-Inhibitor (110 α)	BYLT719 (Alpelisib); Taselisib (GDC-0032)
PI3K/mTORC1/2-Inhibitor	BEZ235
mTORC1-Inhibitor	Everolimus

5.8.1 BKM120 (Buparlisib)

Buparlisib ist ein Pan-PI3K-Klasse-1-Inhibitor. Es hemmt die PI3K der Klasse 1 durch Blockade der ATP-Bindungsstelle der Kinasen. Es konnte gezeigt werden, dass Buparlisib antiproliferativ, antitumorös und antiangiogenetisch wirkt (Maira et al., 2012).

In einer Arbeit von Bendell und Kollegen kam Buparlisib als alleiniger Wirkstoff zum Einsatz. Insgesamt 35 Patientinnen mit unterschiedlichen Krebsentitäten erhielten aufsteigende Dosen Buparlisib von 12,5 mg bis 150 mg einmal täglich über einen Zeitraum von 28 Tagen. Es zeigte sich eine maximal-tolerable Dosis von 100 mg/d. Insgesamt wurde BKM120 gut toleriert. Als Nebenwirkungen zeigten sich Hyperglykämie, gastrointestinale Unverträglichkeiten, Hautausschlag, Fatigue und Stimmungsschwankungen bzw. depressive Verstimmung (Bendell et al., 2012).

Mayer und Kollegen (2014) untersuchten in Ihrer Phase 1b-Studie die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Buparlisib in Kombination mit Letrozol beim ER-positiven, HER2-negativen, metastasierten Mammakarzinom bei endokrinem Therapieversagen. In dem kontinuierlichen Studienarm (n=20) erhielten die Patienten täglich 2,5 mg Letrozol und 100 mg Buparlisib. Im diskontinuierlichen Arm erhielten die Patienten täglich 2,5 mg Letrozole und an fünf von sieben Wochentagen 100 mg Buparlisib. Es bestätigten sich die Nebenwirkungen aus anderen Studien. Ein besseres Therapieansprechen in Abhängigkeit vom Mutationsstatus konnte nicht festgestellt werden (Mayer et al., 2014).

Eine weitere Studie zum Einsatz von BKM120 stellt die BELLE-3-Studie dar. Es handelt sich um eine randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Phase-III-Studie von BKM120 in

Kombination mit Fulvestrant. Zielgruppe sind Frauen mit einem HR-positivem, HER2-negativem, AI-behandeltem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom mit Progression während oder nach Behandlung mit einem mTOR-Inhibitor (NCT01633060).

Di Leo und Kollegen zeigten, dass durch die Kombinationstherapie mit BKM120 das progressionsfreie Überleben statistisch signifikant verlängert wird (6-Monate PFS: 3,9 Monate vs. 1,8 Monate; $p < 0,001$). Bei der Betrachtung des PFS in Abhängigkeit vom Mutationsstatus zeigte sich, dass dieser Effekt v.a. für die Gruppe der mutierten Tumoren gilt (4,7 Monate vs. 1,4 Monate, $p < 0,001$). Unter den Wildtyp-Tumoren zeigte sich das PFS nicht signifikant verlängert (2,8 Monate vs. 2,7 Monate, $p = 0,117$; Di Leo et al., 2016).

Im Rahmen der Studie fielen allerdings erhebliche Nebenwirkungen des Präparates auf: Bei mehr als 10% der Patienten zeigten sich unerwünschte Arzneimittelreaktionen. Es zeigte sich ein Anstieg der Lebertransaminasen, aber auch psychische Störungen wie Angstgefühl und Depression traten auf (Di Leo, 2016).

Aufgrund der Nebenwirkungen der ersten Präparate gilt es als Ziel, diese Medikamentengruppe weiter zu entwickeln und sicherer zu gestalten. Vor allem die psychischen Nebenwirkungen scheinen fatal. Ein Ansatzpunkt stellt die Entwicklung von Substanzen dar, welche nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren. Man erhofft sich dadurch die Nebenwirkungsrate zu reduzieren.

5.8.2 Weitere PI3K-Inhibitoren

Alpelisib (BYL719) gehört zu den Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren. Angriffspunkt ist die α -Isoform der katalytischen Untereinheit der PI3K Klasse 1 (Perez et al., 2016). Die Kombinationstherapie aus Alpelisib und Fulvestrant bzw. Placebo und Fulvestrant wird gegenwärtig in der SOLAR-I-Phase-III-Studie untersucht (NCT02437318; Lux et al., 2016).

Auch Taselisib (GDC-0032) gehört zu den Isoform-spezifischen PI3K-Inhibitoren und wird gegenwärtig im Rahmen klinischer Studien getestet (z.B. SANPIPER-Studie, NCT02340221; Lux et al., 2016)

Ebenfalls zu den Pan-PI3K-Inhibitoren gehört der Wirkstoff Pictilisib (GDC-0941). In der sogenannten FERGI-Studie (NCT01437566), eine randomisierte Phase-III-Studie, wurde der zusätzliche Einsatz von Pictilisib zu einer Fulvestrant-Therapie untersucht. Die ersten Ergebnisse zeigten jedoch keinen Vorteil im Hinblick auf das PFS (Lux et al., 2016).

Es bleibt anzumerken, dass weitere Studien notwendig sind, um die Wirksamkeit und Sicherheit solcher neuen Medikamente zu untersuchen. Aktuell scheint es offen, ob in Zukunft PI3K-Inhibitoren einen möglichen Therapieansatzpunkt beim Mammakarzinom darstellen. Wenn

dem so ist, muss weiterhin geklärt werden, wer von solch einer Therapie profitiert sowie die Frage, ob der Mutationsstatus des PIK3CA-Gens einen Einfluss hat.

Insgesamt stellt also die PI3K/Akt-Signalkaskade einen interessanten Ansatzpunkt für weitere klinische Forschung dar.

6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist als häufigste Krebserkrankung der Frau in Deutschland eine ausgesprochen heterogene Erkrankung. Das Ziel der modernen Medizin ist es, das Therapiekonzept der Brustkrebserkrankung möglichst individuell an tumorbiologische, prognostische und prädiktive Eigenschaften anzupassen. Im Rahmen dieser personalisierten Medizin wird nach immer neuen Ansatzpunkten für Therapeutika und nach immer neuen prognostisch bedeutenden Markern geforscht. Im Zuge dessen rückte das PIK3CA-Gen in den Fokus der Wissenschaft.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prävalenz der beiden häufigsten PIK3CA-Genmutationen (H1047R, E545K) an Tumorfrischmaterial einer prospektiven Kohorte von Brustkrebspatientinnen untersucht. Neben der Häufigkeit wurden Assoziationen zu klinischen, pathologischen und tumorbiologischen Eigenschaften betrachtet.

Der Mutationsstatus wurde mittels PCR ermittelt. Mögliche Assoziationen zwischen dem Mutationsstatus und den klinischen, pathologischen und tumorbiologischen Eigenschaften wurden mit der Methode der binären logistischen Regression betrachtet. In der univariaten Betrachtung zeigte sich eine Assoziation zwischen dem PIK3CA-Mutationsstatus und prognostisch günstigen Tumoreigenschaften. So waren die Tumoren mit einem positiven PIK3CA-Mutationsstatus statistisch signifikant mit einem niedrigen Grading, einem positiven HR-Status und einem negativen HER2-Status assoziiert. Kein statistisch signifikanter Zusammenhang ergab sich für das Alter und den Menopausenstatus der Patientin, für die Tumorgöße, den Nodalstatus, den histologischen Typ des Tumors, die Lymphgefäß- / Gefäßinvasion, sowie den uPA-/PAI-1-Status.

Für eine bessere prognostische Einschätzung der Bedeutung dieser Genmutationen sind weitere Studien nötig, die Aussagen zum Outcome und Überleben der Patienten in Abhängigkeit vom Mutationsstatus ermöglichen.

Ein interessanter Aspekt ist der mögliche Einsatz von PI3K-Inhibitoren, wie beispielsweise BKM120 (Buparlisib), in der Therapie des Mammakarzinoms. Die Wirksamkeit dieser Substanzen wird gegenwärtig in unterschiedlichen klinischen Studien getestet. Es wird sich zeigen inwieweit diese Medikamente in der Therapie des Mammakarzinoms zum Einsatz kommen, welche Patienten profitieren und ob ein mögliches Ansprechen unter Umständen vom PIK3CA-Mutationsstatus abhängig ist.

7 Literaturverzeichnis

Abramson VG, Cooper Lloyd M, Ballinger T, Sanders ME, Du L, Lai D, Su Z, Mayer I, Levy M, LaFrance DR, Vnencak-Jones CL, Shyr Y, Dahlman KB, Pao W, Arteaga CL (2014) Characterization of breast cancers with PI3K mutations in an academic practice setting using SNaPshot profiling. *Breast Cancer Res. Treat.* 145:389–399. doi:10.1007/s10549-014-2945-3.

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current biology* : CB 7:261–269.

Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. Empfehlungen der gynäkologischen Onkologie, Kommission Mamma, 2016.

Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH (2004) The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 3:772–775.

Balko J, Mayer I, Levy M, Arteaga C (Februar 2015) PIK3CA c.3140A>G (H1047R) Mutation in Breast Cancer. *My Cancer Genome*. <http://www.mycancergenome.org/content/disease/breast-cancer/pik3ca/11/>. Zugegriffen: 01. September 2015.

Barbareschi M, Buttitta F, Felicioni L, Cotrupi S, Barassi F, Del Grammastro M, Ferro A, Dalla Palma P, Galligioni E, Marchetti A (2007) Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:6064–6069. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0266.

Bendell JC, Rodon J, Burris HA, Jonge M de, Verweij J, Birle D, Demanse D, Buck SS de, Ru QC, Peters M, Goldbrunner M, Baselga J (2012) Phase I, dose-escalation study of BKM120, an oral pan-Class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 30:282–290. doi:10.1200/JCO.2011.36.1360.

Brown RW, Allred CD, Clark GM, Osborne CK, Hilsenbeck SG (1996) Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2:585–592.

Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96:857–868.

Buttitta F, Felicioni L, Barassi F, Martella C, Paolizzi D, Fresu G, Salvatore S, Cuccurullo F, Mezzetti A, Campani D, Marchetti A (2006) PIK3CA mutation and histological type in breast carcinoma: high frequency of mutations in lobular carcinoma. *The Journal of pathology* 208:350–355. doi:10.1002/path.1908.

Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor α : a new model for anti-estrogen resistance. *The Journal of biological chemistry* 276:9817–9824. doi:10.1074/jbc.M010840200.

7. Literaturverzeichnis

Campbell IG, Russell SE, Choong, David Y H, Montgomery KG, Ciavarella ML, Hooi, Christine S F, Cristiano BE, Pearson RB, Phillips WA (2004) Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer research* 64:7678–7681. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-2933.

Cantley LC (2002) The Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Science* 296:1655–1657. doi:10.1126/science.296.5573.1655.

Chalhoub N, Baker SJ (2009) PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 4:127–150. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311.

Chandarlapaty S, Sakr RA, Giri D, Patil S, Heguy A, Morrow M, Modi S, Norton L, Rosen N, Hudis C, King TA (2012) Frequent Mutational Activation of the PI3K-AKT Pathway in Trastuzumab-Resistant Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 18:6784–6791. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1785.

Chia SK, Speers CH, Bryce CJ, Hayes MM, Olivetto IA (2004) Ten-Year Outcomes in a Population-Based Cohort of Node-Negative, Lymphatic, and Vascular Invasion-Negative Early Breast Cancers Without Adjuvant Systemic Therapies. *Journal of Clinical Oncology* 22:1630–1637. doi:10.1200/JCO.2004.09.070.

Cianfrocca M (2004) Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist* 9:606–616. doi:10.1634/theoncologist.9-6-606.

Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K, Fourme E, Lidereau R, Bièche I (2012) PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast cancer research : BCR* 14:R28. doi:10.1186/bcr3113.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785–789. doi:10.1038/378785a0.

Datenbank des Sanger Instituts Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?coords=AA%3AAA&ln=PIK3CA&res_type=AA&all_data=&id=14&seqlen=1069&export=html&start=1016&end=undefined. Zugegriffen: 05. Oktober 2014.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231–241.

Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH (2009) Prognosis of Women With Metastatic Breast Cancer by HER2 Status and Trastuzumab Treatment: An Institutional-Based Review. *Journal of Clinical Oncology* 28:92–98. doi:10.1200/JCO.2008.19.9844.

Denkert C, Loibl S, Muller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, Gerber B, Tesch H, Hilfrich J, Huober J, Fehm T, Barinoff J, Jackisch C, Prinzler J, Rudiger T, Erbstosser E, Blohmer JU, Budczies J, Mehta KM, Minckwitz G von (2013) Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the

neoadjuvant GeparTrio trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 24:2786–2793. doi:10.1093/annonc/mdt350.

Di Cosimo S, Baselga J (2009) Phosphoinositide 3-Kinase Mutations in Breast Cancer: A "Good" Activating Mutation? *Clinical Cancer Research* 15:5017–5019. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1173.

Di Leo A, Seok Lee K, Ciruelos E, Lønning P, Janni W, O'Regan R, Mouret Reynier M-A, Kalev D, Egle D, Csozi T, Bordonaro R, Decker T, Tjan-Heijnen VC, Blau S, Schirone A, Weber D, El-Hashimy M, Dharan B, Sellami D, Bachelot T. BELLE-3: A phase III study of buparlisib + fulvestrant in postmenopausal women with HR+, HER2-, aromatase inhibitor-treated, locally advanced or metastatic breast cancer, who progressed on or after mTOR inhibitor-based treatment [abstract]. In: *Proceedings of the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2016 Dec 6-10; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res* 2017;77 (4 Suppl): Abstract nr S4-07.

Dumont AG, Dumont SN, Trent JC (2012) The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer* 31:327–334. doi:10.5732/cjc.012.10032.

Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 19:403–410.

Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006) The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7:606–619. doi:10.1038/nrg1879.

Falasca M, Maffucci T (2012) Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *The Biochemical journal* 443:587–601. doi:10.1042/BJ20120008.

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, Foster R, Gardner B, Lerner H, Margolese R (1983) Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* 52:1551–1557.

Fisher B, Redmond C, Fisher ER, Caplan R (1988) Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node negative breast cancer patients: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. *J. Clin. Oncol.* 6:1076–1087.

Fisher B, Anderson S, Bryant J, Margolese RG, Deutsch M, Fisher ER, Jeong J, Wolmark N (2002) Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 347:1233–1241. doi:10.1056/NEJMoa022152.

Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok CY, Jia M, De T, Teague JW, Stratton MR, McDermott U, Campbell PJ (2015) COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic acids research* 43:D805-11. doi:10.1093/nar/gku1075.

Fritsch R, Krijger I de, Fritsch K, George R, Reason B, Kumar MS, Diefenbacher M, Stamp G, Downward J (2013) RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Cell* 153:1050–1063. doi:10.1016/j.cell.2013.04.031.

Fromm S (2012) Datenanalyse mit SPSS für Fortgeschrittene. VS, Verl. für Sozialwiss., Wiesbaden.

Fruman DA, Rommel C (2014) PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews. Drug discovery* 13:140–156. doi:10.1038/nrd4204.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn, H. - J. (2007) Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Annals of Oncology* 18:1133–1144. doi:10.1093/annonc/mdm271.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn H (2011) Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of Oncology* 22:1736–1747. doi:10.1093/annonc/mdr304.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al (2013) Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Annals of Oncology* 24:2206–2223. doi:10.1093/annonc/mdt303.

Gonzalez-Angulo AM, Chen H, Karuturi MS, Chavez-MacGregor M, Tsavachidis S, Meric-Bernstam F, Do K, Hortobagyi GN, Thompson PA, Mills GB, Bondy ML, Blumenschein GR (2013) Frequency of mesenchymal-epithelial transition factor gene (MET) and the catalytic subunit of phosphoinositide-3-kinase (PIK3CA) copy number elevation and correlation with outcome in patients with early stage breast cancer. *Cancer* 119:7–15. doi:10.1002/cncr.27608.

Hammond, M. E. H., Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Journal of Oncology Practice* 6:195–197. doi:10.1200/JOP.777003.

Harbeck N, Kates RE, Gauger K, Willems A, Kiechle M, Magdolen V, Schmitt M (2004) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thromb. Haemost.* 91:450–456. doi:10.1160/TH03-12-0798.

Harbeck N, Schmitt M, Meisner C, Friedel C, Untch M, Schmidt M, Sweep, C G J, Lisboa BW, Lux MP, Beck T, Hasmüller S, Kiechle M, Jänicke F, Thomssen C (2013) Ten-year analysis of the prospective multicentre Chemo-N0 trial validates American Society of Clinical Oncology (ASCO)-

recommended biomarkers uPA and PAI-1 for therapy decision making in node-negative breast cancer patients. *Eur. J. Cancer* 49:1825–1835. doi:10.1016/j.ejca.2013.01.007.

Harle A, Lion M, Lozano N, Husson M, Harter V, Genin P, Merlin J (2013) Analysis of PIK3CA exon 9 and 20 mutations in breast cancers using PCR-HRM and PCR-ARMS: correlation with clinicopathological criteria. *Oncol Rep* 29:1043–1052. doi:10.3892/or.2013.2229.

Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM (2011) Targeting the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway in Breast Cancer. *The Oncologist* 16:404–414. doi:10.1634/theoncologist.2010-0402.

Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol. Unserer Zeit* 37:120–126. doi:10.1002/biuz.200610332.

Huang C, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Gabelli SB, Amzel LM (2007) The Structure of a Human p110/p85 Complex Elucidates the Effects of Oncogenic PI3K Mutations. *Science* 318:1744–1748. doi:10.1126/science.1150799.

Huang C, Mandelker D, Gabelli SB, Amzel LM (2008) Insights into the oncogenic effects of PIK3CA mutations from the structure of p110alpha/p85alpha. *Cell Cycle* 7:1151–1156.

Jabbour E, Ottmann OG, Deininger M, Hochhaus A (2014) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. *Haematologica* 99:7–18. doi:10.3324/haematol.2013.087171.

Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Höfler H, Graeff H (1993) Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 24:195–208.

Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkänen L, Turpeenniemi-Hujanen T, Smitten K von, Lundin J (2003) Amplification of erbB2 and erbB2 expression are superior to estrogen receptor status as risk factors for distant recurrence in pT1N0M0 breast cancer: a nationwide population-based study. *Clin. Cancer Res.* 9:923–930.

Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, Hedvat CV, Traina TA, Solit D, Gerald W, Moynahan ME (2009) PIK3CA Mutation Associates with Improved Outcome in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 15:5049–5059. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0632.

Kang S, Bader AG, Vogt PK (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:802–807. doi:10.1073/pnas.0408864102.

Kantelhardt EJ, Vetter M, Schmidt M, Veyret C, Augustin D, Hanf V, Meisner C, Paepke D, Schmitt M, Sweep F, Minckwitz G von, Martin P, Jaenicke F, Thomssen C, Harbeck N (2011) Prospective

7. Literaturverzeichnis

evaluation of prognostic factors uPA/PAI-1 in node-negative breast cancer: phase III NNBC3-Europe trial (AGO, GBG, EORTC-PBG) comparing 6xFEC versus 3xFEC/3xDocetaxel. *BMC Cancer* 11:140. doi:10.1186/1471-2407-11-140.

Karakas B, Bachman KE, Park BH (2006) Mutation of the PIK3CA oncogene in human cancers. *Br J Cancer* 94:455–459. doi:10.1038/sj.bjc.6602970.

Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD (2001) CELLULAR FUNCTION OF PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASES; Implications for Development, Immunity, Homeostasis, and Cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17:615–675. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.615.

Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B (2009) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends in Biochemical Sciences* 34:115–127. doi:10.1016/j.tibs.2009.01.003.

Kurz C, Obermair A, Nagele F, Czerwenka K, Schemper M, Kubista E, Sevela P (1994) Die Wertigkeit des Faktors "Gefässinvasion" für die Prognose des Mammakarzinoms. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 54:295–299. doi:10.1055/s-2007-1022843.

Lasfargues EY, Ozzello L (1958) Cultivation of human breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 21:1131–1147.

Lebeau A, Kriegsmann M, Burandt E, Sinn H (2014) Invasive Mammakarzinome: Die aktuelle WHO-Klassifikation. *Pathologie* 35:7–17. doi:10.1007/s00292-013-1841-7.

Li SY, Rong M, Grieu F, Iacopetta B (2006) PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast cancer research and treatment* 96:91–95. doi:10.1007/s10549-005-9048-0.

Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S, Lallemand F, Durbecq V, Larsimont D, Gonzalez-Angulo AM, Pusztai L, Symmans WF, Bardelli A, Ellis P, Tutt ANJ, Gillett CE, Hennessy BT, Mills GB, Phillips WA, Piccart MJ, Speed TP, McArthur GA, Sotiriou C (2010) PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:10208–10213. doi:10.1073/pnas.0907011107.

López-Knowles E, O'Toole SA, McNeil CM, Millar, Ewan K A, Qiu MR, Crea P, Daly RJ, Musgrove EA, Sutherland RL (2010) PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 126:1121–1131. doi:10.1002/ijc.24831.

Lux MP, Fasching PA, Schrauder MG, Hein A, Jud SM, Rauh C, Beckmann MW (2016) The PI3K Pathway: Background and Treatment Approaches. *Breast care (Basel, Switzerland)* 11:398–404. doi:10.1159/000453133.

Maehama T, Dixon JE (1998) The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* 273:13375–13378.

Maira S, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, Schnell C, Guthy D, Nagel T, Wiesmann M, Brachmann S, Fritsch C, Dorsch M, Chene P, Shoemaker K, Pover A de, Menezes D, Martiny-Baron G, Fabbro D, Wilson CJ, Schlegel R, Hofmann F, Garcia-Echeverria C, Sellers WR, Voliva CF (2012) Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* 11:317–328. doi:10.1158/1535-7163.MCT-11-0474.

Mandelker D, Gabelli SB, Schmidt-Kittler O, Zhu J, Cheong I, Huang C, Kinzler KW, Vogelstein B, Amzel LM (2009) A frequent kinase domain mutation that changes the interaction between PI3K α and the membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:16996–17001. doi:10.1073/pnas.0908444106.

Martin-Berenjeno I, Vanhaesebroeck B (2009) PI3K Regulatory Subunits Lose Control in Cancer. *Cancer Cell* 16:449–450. doi:10.1016/j.ccr.2009.11.017.

Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M, Noguchi S (2007) Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:408–414. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0267.

Mayer IA, Abramson VG, Isakoff SJ, Forero A, Balko JM, Kuba MG, Sanders ME, Yap JT, Van den Abbeele, Annick D, Li Y, Cantley LC, Winer E, Arteaga CL (2014) Stand up to cancer phase Ib study of pan-phosphoinositide-3-kinase inhibitor buparlisib with letrozole in estrogen receptor-positive/human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 32:1202–1209. doi:10.1200/JCO.2013.54.0518.

Mayo LD, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:11598–11603. doi:10.1073/pnas.181181198.

Miled N, Yan Y, Hon W, Perisic O, Zvelebil M, Inbar Y, Schneidman-Duhovny D, Wolfson HJ, Backer JM, Williams RL (2007) Mechanism of Two Classes of Cancer Mutations in the Phosphoinositide 3-Kinase Catalytic Subunit. *Science* 317:239–242. doi:10.1126/science.1135394.

7. Literaturverzeichnis

Miller TW, Hennessy BT, González-Angulo AM, Fox EM, Mills GB, Chen H, Higham C, García-Echeverría C, Shyr Y, Arteaga CL (2010) Hyperactivation of phosphatidylinositol-3 kinase promotes escape from hormone dependence in estrogen receptor-positive human breast cancer. *The Journal of clinical investigation* 120:2406–2413. doi:10.1172/JCI41680.

Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, Abner A, Recht A, Vicini F, Harris JR (1994) Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 12:888–894.

Peleg Hasson S, Rubinek T, Ryvo L, Wolf I (2013) Endocrine Resistance in Breast Cancer: Focus on the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway. *Breast Care* 8:248–255. doi:10.1159/000354757.

Perez EA (2016) Treatment strategies for advanced hormone receptor-positive and human epidermal growth factor 2-negative breast cancer: the role of treatment order. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 24:13–22. doi:10.1016/j.drug.2015.11.001.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lonning PE, Borresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–752. doi:10.1038/35021093.

Ramirez-Ardila DE, Helmijr JC, Look MP, Lurkin I, Ruigrok-Ritstier K, van Laere S, Dirix L, Sweep FC, Span PN, Linn SC, Foekens JA, Sleijfer S, Berns, Els M J J, Jansen, Maurice P H M (2013) Hotspot mutations in PIK3CA associate with first-line treatment outcome for aromatase inhibitors but not for tamoxifen. *Breast cancer research and treatment* 139:39–49. doi:10.1007/s10549-013-2529-7.

Remmele W, Stegner HE (1987) Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologie* 8:138–140.

Robert-Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2013) Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2009/2010, Berlin.

Robinson PJ, Bell RJ, Davis SR (2014) Obesity is associated with a poorer prognosis in women with hormone receptor positive breast cancer. *Maturitas*. doi:10.1016/j.maturitas.2014.07.004.

Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370:527–532. doi:10.1038/370527a0.

Ross JS, Fletcher JA (1998) The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* 16:413–428. doi:10.1002/stem.160413.

Rössig L, Jadidi AS, Urbich C, Badorff C, Zeiher AM, Dimmeler S (2001) Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Molecular and cellular biology* 21:5644–5657. doi:10.1128/MCB.21.16.5644-5657.2001.

Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmström P, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R (2005) PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer research* 65:2554–2559. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3913.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)* 230:1350–1354.

Samuels Y, Velculescu VE (2004) Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* 3:1221–1224.

Sanchez-Cespedes M (2011) PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. doi:10.4267/2042/44713.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)* 307:1098–1101. doi:10.1126/science.1106148.

Schmidt M, Victor A, Bratzel D, Boehm D, Cotarelo C, Lebrecht A, Siggelkow W, Hengstler JG, Elsasser A, Gehrman M, Lehr H, Koelbl H, Minckwitz G von, Harbeck N, Thomssen C (2009) Long-term outcome prediction by clinicopathological risk classification algorithms in node-negative breast cancer--comparison between Adjuvant!, St Gallen, and a novel risk algorithm used in the prospective randomized Node-Negative-Breast Cancer-3 (NNBC-3) trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 20:258–264. doi:10.1093/annonc/mdn590.

Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, Kubista E, Hausmaninger H, Samonigg H, Gnant M, Jakesz R, Horvat R (2004) Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann. Surg.* 240:306–312.

Schwartz AM, Henson DE, Chen D, Rajamarthandan S (2014) Histologic Grade Remains a Prognostic Factor for Breast Cancer Regardless of the Number of Positive Lymph Nodes and Tumor Size: A Study of 161 708 Cases of Breast Cancer From the SEER Program. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 138:1048–1052. doi:10.5858/arpa.2013-0435-OA.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177–182.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51:1409–1416.

Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science (New York, N.Y.)* 277:567–570.

Tavassoli F.A., Devilee P (Hrsg) (2003) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. IARC Press, Lyon.

Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD (1997a) P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:4330–4335.

Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997b) Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends in Biochemical Sciences* 22:267–272. doi:10.1016/S0968-0004(97)01061-X.

Vanhaesebroeck B, Alessi DR (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *The Biochemical journal* 346 Pt 3:561–576.

Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M, Bilanges B (2010) The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:329–341. doi:10.1038/nrm2882.

Vetter M, Kantelhardt E, Schmitt M, Jänicke F, Harbeck N, Thomssen C (2011) Vom Labor in die Klinik: Prognosefaktoren uPA und PAI-1 als anerkannte Biomarker zur Therapieentscheidung bei Brustkrebspatientinnen. *DZKF* 9/10:1-4.

Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2:489–501. doi:10.1038/nrc839.

Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL (1999) Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 402:313–320.

7. Literaturverzeichnis

Wittekind C, Meyer H (2010). In: Wittekind C, Meyer H (Hrsg) TNM: Klassifikation maligner Tumoren. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, S 169–179.

Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF (2014) Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 138:241–256. doi:10.5858/arpa.2013-0953-SA.

Wu G, Xing M, Mambo E, Huang X, Liu J, Guo Z, Chatterjee A, Goldenberg D, Gollin SM, Sukumar S, Trink B, Sidransky D (2005) Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 7:R609-16. doi:10.1186/bcr1262.

Zhao M, Ramaswamy B (2014) Mechanisms and therapeutic advances in the management of endocrine-resistant breast cancer. *World journal of clinical oncology* 5:248–262. doi:10.5306/wjco.v5.i3.248.

8 Thesen

1. Im untersuchten Kollektiv treten die beiden untersuchten Mutationen im PIK3CA-Gen (H1047R; E545K) mit einer kumulativen Häufigkeit von 25,4 % auf.
2. In dem betrachteten Kollektiv ist in Bezug auf das PIK3CA-Gen die Prävalenz der Mutation H1047R mit 17 % höher als die Prävalenz der Mutation E545K (9 %).
3. Bei den beiden untersuchten PIK3CA-Genmutationen handelt es sich um somatische Mutationen.
4. In dem betrachteten Kollektiv sind Tumoren mit einem positiven Mutationsstatus des PIK3CA-Gens (H1047R und/oder E545K) signifikant häufiger mit einem positiven HR-Status des Tumors (ER positiv und/oder PgR positiv) assoziiert als nicht-mutierte Tumoren (OR=1.891; CI:1.018; 3.511; $p=0,044$).
5. Im untersuchten Kollektiv zeigte sich eine positive Assoziation zwischen PIK3CA-Mutationsstatus und dem PgR-Status (OR=1.63, CI: 1.09, 2.436; $p=0,017$), nicht aber zwischen dem PIK3CA-Mutationsstatus und dem ER-Status ($p=0,205$).
6. In dem betrachteten Kollektiv ist die Chance für einen positiven Mutationsstatus für Tumoren mit einer guten Differenzierung (G1; OR=2,623; CI:1,438; 4,782; $p=0,002$) und einer intermediären Differenzierung (G2; OR=2,071; CI:1,308; 3,279; $p=0,002$) höher als für Tumoren mit einer schlechten Differenzierung (G3).
7. In dem betrachteten Kollektiv sind Tumoren mit der PIK3CA-Genmutation E545K signifikant häufiger mit einem negativen HER2-Status assoziiert als nicht mutierte Tumoren (OR=0,108; CI: 0,015; 0,794; $p=0,029$).
8. In dem untersuchten Kollektiv sind Tumoren mit einer Mutation im PIK3CA-Gen signifikant häufiger der Niedrigrisiko-Gruppe entsprechend des klinisch, pathologischen Algorithmus der NNBC 3-Europe-Studie einzuordnen als die nicht mutierten Tumoren ($p=0,005$, OR=1,690, CI: 1,174; 2,431).
9. In einem Teilkollektiv (n=183) ist der Anteil an Tumoren mit einem positiven Mutationsstatus unter den Luminal-A-like-Tumoren am höchsten (29,7 %).

9 Lebenslauf

9.1 Persönliche Daten:

Name: Kristin Reinhardt
Anschrift: Adam-Kuckhoff-Strasse 25, 06108 Halle
E-Mail: Kristin_Reinhardt@gmx.de
Geb.: 15.09.1989 in Jena

9.2 Berufliche Laufbahn

seit 08/2016 Assistenzärztin in der Klinik für Gynäkologie,
Universitätsklinikum Halle

12/2015 bis 04/2016 Praktisches Jahr im Klinikum Bergmannstrost in Halle in der
Klinik für Innere Medizin

09/2015 bis 12/2015 Praktisches Jahr in den Kliniken Gynäkologie und Geburtshilfe
der Universitätsklinik Halle

05/2015 bis 09/2015 Praktisches Jahr im Klinikum Bergmannstrost in Halle in der
Klinik für Unfallchirurgie

05/2015 bis 04/2016 Praktisches Jahr

04/2015 2.Staatsexamen Humanmedizin

08/2011 1.Staatsexamen Humanmedizin

Seit 10/2009 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg

09/2008 bis 04/2009 Work & Travel in Australien

2008 Abitur

2000 bis 2008 Besuch des Friedrich-Schiller-Gymnasiums Eisenberg

1996-2000 Besuch der Martin-Luther-Grundschule Eisenberg

10 Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Es gibt keine früheren Promotionsverfahren oder abgelehnte Promotionsgesuche an dieser oder einer anderen Universität.

Halle, den 15.05.2017

Kristin Reinhardt

11 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle gern bei allen bedanken, die mich beim Fertigstellen dieser Arbeit stets unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. C. Thomssen für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit, für das Einbringen stets neuer Gesichtspunkte und die Begutachtung der Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Martina Vetter danke ich für die Betreuung während des ganzen langen, manchmal holprigen Weges mit stets ehrlichen Ratschlägen und unzähligen Stunden Posterarbeit (:

Frau Kathrin Stückrath danke ich für eine großartige und lehrreiche Zeit im Labor, für deine unsagbare Geduld, für deine tatkräftige Unterstützung beim Experimentieren und für die aufbauenden Kaffeepäuschen und Schwatzerunden!

Ich danke dem Team des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie für die freundliche Aufnahme und den vielseitigen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten.

Ein großes Dankeschön gebührt meiner Familie und meinen Freunden für die tolle Unterstützung während des gesamten Studiums und während des Erstellens dieser Arbeit.