

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**PI3K-Inhibitoren in der Therapie des PIK3CA-mutierten Mammakarzinoms:
Methodischer Vergleich molekularpathologischer Analyseverfahren zur Detektion von
PIK3CA-Varianten aus Langzeit-asserviertem Tumorgewebe**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

Vorgelegt von: Simon-Alexander Kammer

Geboren am: 05.03.1999 in Bielefeld

soli deo gloria

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	4
2.1 <i>Das Mammakarzinom.....</i>	<i>4</i>
2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	4
2.1.2 TNM-Klassifikation	5
2.1.3 Histologische Klassifikation	5
2.1.4 Grading.....	6
2.1.5 Hormonrezeptorstatus.....	6
2.1.6 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER 2/neu) Status.....	7
2.1.7 Ki-67-Proliferationsindex.....	7
2.1.8 Intrinsische Subtypen	7
2.1.9 Therapie	8
2.2 <i>Das PIK3CA-Gen</i>	<i>10</i>
2.2.1 PIK3CA-Mutation.....	10
2.2.2 Mutationsfrequenzen auf dem PIK3CA-Gen bei Brustkrebs	11
2.2.3 Behandelbarkeit bei PIK3CA Mutation - Alpelisib	12
2.3 <i>Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks).....</i>	<i>12</i>
2.3.1 Die Familie der PI3K	12

2.3.2	Die Signalkaskade der PI3Ks der Klasse I	13
2.3.3	Die katalytische Untereinheit p110 α	16
2.3.4	Pathophysiologie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen	17
2.4	<i>Fragestellung und Zielsetzung</i>	18
3	Material und Methodik	19
3.1	<i>Material</i>	19
3.1.1	Probenmaterial	19
3.1.2	Geräte und Versuchsmaterialien	19
3.1.3	Reagenzien	20
3.1.4	Verwendete Programme	21
3.1.5	Verwendete Primer (Jeweils in 5'- 3' Orientierung)	22
3.2	<i>Methodik</i>	23
3.2.1	Umsetzung	23
3.2.2	Asservierung	23
3.2.3	Molekulargenetische DNA-Analysen	24
4	Ergebnisse	39
4.1	<i>Klinisch-histopathologische Standardparameter</i>	39
4.1.1	Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter	39
4.2	<i>Sequenzierung nach Sanger</i>	40
4.2.1	Exon 7 und Exon 20	40
4.2.2	Exon 9	46
4.3	<i>Quantitative Echtzeit-PCR und Next-Generation-Sequencing</i>	49

4.3.1	Ergebnisse der klinisch-histopathologischen Standardparameter.....	49
4.3.2	Auswertung der Echtzeit-PCR	49
4.3.3	Auswertung des Next-Generation-Sequencing.....	51
4.4	<i>Vergleich der DNA-Analyse Verfahren</i>	53
4.4.1	Vierfeldertafel und Cohen's-Kappa	56
5	Diskussion	59
5.1.1	Patientenkollektiv	59
5.2	<i>Sequenzierung nach Sanger</i>	60
5.2.1	Exon 7 und Exon 20	60
5.2.2	Exon 9.....	60
5.3	<i>Quantitative Echtzeit-PCR</i>	61
5.4	<i>Next-Generation-Sequencing</i>	62
5.4.1	Variant Allele Frequency	63
5.5	<i>Vergleich der DNA-Analyseverfahren</i>	64
5.5.1	Vierfeldertafel und Cohen's-Kappa	65
5.5.2	Empfehlung für die Praxis	66
5.5.3	Langzeitarchivierung	67
5.6	<i>PIK3CA</i>	68
5.6.1	Die prognostische Aussagekraft von PIK3CA.....	68
5.6.2	Die prädiktive Aussagekraft von PIK3CA	69
5.6.3	Prognostische Aussagekraft von Exon 9 und 20.....	69
5.7	<i>Alpelisib</i>	70

5.7.1	SOLAR-1-Studie	70
5.7.2	Marktrücknahme Alpelisib	71
5.7.3	BYLieve-Studie.....	71
5.7.4	PIK3CA als “target of therapy” – PI3K-Inhibitoren	71
6	Literaturverzeichnis.....	73
7	Dank	85
8	Lebenslauf.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorgelagerte Signale, die in PI3Ks der Klasse I einfließen nach Vanhaesebroeck et al. 2010 [126].	14
Abbildung 2: Die Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalkaskade nach Courtney et al. 2010	16
Abbildung 3: Bänderdiagramm des p110 α /niSH2-Heterodimers nach Huang et al. 2008	17
Abbildung 4: Agarose-Gelelektrophorese	27
Abbildung 5: Sequenzanalyse - Probe1 Exon9 Forward - 4Peaks	29
Abbildung 6: Sequenz PIK3CA Exon 20 Wildtyp	30
Abbildung 7: Sequenz PIK3CA Exon 20 H1047R	30
Abbildung 8: Schema der Library preparation beim NGS	34
Abbildung 9: Schema der Amplifikation und Clusterbildung beim NGS	34
Abbildung 10: Schema der Sequenzierung beim NGS	35
Abbildung 11: Schema der Datenanalyse beim NGS	35
Abbildung 12: Sequenzierung nach Sanger - Luminal A - Primer	41
Abbildung 13: Sequenzierung nach Sanger - Luminal A – PIK3CA Mutationsstatus	41
Abbildung 14: Sequenzierung nach Sanger - Luminal B - Primer	42
Abbildung 15: Sequenzierung nach Sanger - Luminal B – PIK3CA Mutationsstatus	42
Abbildung 16: Sequenzierung nach Sanger - Her2/neu - Primer	43
Abbildung 17: Sequenzierung nach Sanger - Her2/neu – PIK3CA Mutationsstatus	43
Abbildung 18: Sequenzierung nach Sanger - Triple negativ - Primer	44
Abbildung 19: Sequenzierung nach Sanger - Triple negativ – PIK3CA Mutationsstatus	44
Abbildung 20: Ergebnisse Exon 7 und Exon 20	45
Abbildung 21: Mutationsverteilung - Exon 7 und Exon 20	45

<i>Abbildung 22: Exon 9 – Pseudogen</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 23: Sequenzierung nach Sanger - Exon 9.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 24: Sequenzierung nach Sanger - Exon 9 - Mutationsstatus</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 25: Mutationsstatus – Quantitative Echtzeit-PCR.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 26: Mutationsverteilung - Quantitative Echtzeit-PCR</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 27: Mutationsstatus - Next-Generation-Sequencing.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 28: Mutationsverteilung - Next-Generation-Sequencing</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 29: Vergleich Sequenzierung nach Sanger - rtPCR</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 30: Vergleich Sequenzierung nach Sanger - NGS</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 31: Vergleich NGS - rtPCR.....</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 32: Vergleich Sequenzierung nach Sanger - rtPCR - NGS.....</i>	<i>56</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Ins Deutsche übersetzte TNM-Klassifikation 8. Auflage [14]</i>	<i>5</i>
<i>Tabelle 2: Übersicht Grading des Mammakarzinoms nach Elston und Ellis</i>	<i>6</i>
<i>Tabelle 3: Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms.....</i>	<i>8</i>
<i>Tabelle 4: UICC-Stadien nach TNM-Klassifikation, 8. Auflage UICC 2017 [14]</i>	<i>9</i>
<i>Tabelle 5: Die in der SOLAR-1 Studie untersuchten PIK3CA-Mutationen mit dem jeweiligen Basentausch: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T).....</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 6: Häufigkeit der Mutationen im PIK3CA-Gen bei Brustkrebs. Modifiziert nach Dirican et al.[29]</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 7: Katalytische und regulatorische PI3K-Untereinheiten bei Säugetieren nach Kok et al. 2009 [61].....</i>	<i>13</i>
<i>Tabelle 8: Geräte und Versuchsmaterialien</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 9: Reagenzien.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 10: Verwendete Programme.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 11: Externe Primer</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 12: Nested Primer</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 13: Primer Exon 9 - Pseudogen Primer.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 14: Reaktionsansatz PCR.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 15: Reaktionsansatz Nested-PCR</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 16: Reaktionszyklus PCR.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 17: Reaktionsansatz Sequenzierungs-PCR</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 18: Reaktionszyklus Sequenzierungs-PCR</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 19: Farbkodierung – Sequenzierung</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 20: Quantitative-Echtzeit-PCR Plattenübersicht[4].....</i>	<i>31</i>

<i>Tabelle 21: Reaktionszyklus Quantitative Echtzeit-PCR [4]</i>	32
<i>Tabelle 22: Quantitative-Echtzeit-PCR Ergebnisbestimmung [4]</i>	33
<i>Tabelle 23: Reaktionsansatz NGS PCR</i>	36
<i>Tabelle 24: Reaktionszyklus NGS PCR</i>	36
<i>Tabelle 25: Reaktionszyklus FuPa-PCR</i>	37
<i>Tabelle 26: Reaktionsansatz Index Ligation</i>	37
<i>Tabelle 27: Reaktionszyklus Index Ligation</i>	37
<i>Tabelle 28: Reaktionsansatz Library Amplifikation</i>	38
<i>Tabelle 29: Reaktionszyklus Library Amplifikation</i>	38
<i>Tabelle 30: Klinisch-histologische Parameter des Patientenkollektivs</i>	40
<i>Tabelle 31: Exon 7 und Exon 20 Mutationen und deren histopathologischen Parameter</i>	46
<i>Tabelle 32: Exon 9 Mutationen und deren histopathologischen Parameter</i>	48
<i>Tabelle 33: Mutationen in der Gruppe HR-positiv und HER2/neu-negativ</i>	49
<i>Tabelle 34: Echtzeit-PCR-PIK3CA-Mutationen und deren histopathologischen Parameter</i>	51
<i>Tabelle 35: NGS-Mutationen und deren histopathologische Parameter</i>	53
<i>Tabelle 36: Tabellarische Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen DNA-Analysen</i>	54
<i>Tabelle 37: Vierfeldertafel und Testgütekriterien Sequenzierung nach Sanger</i>	57
<i>Tabelle 38: Übereinstimmungsmatrizes NGS und Echtzeit-PCR in Mutation/ Wildtyp</i>	57
<i>Tabelle 39: Interpretation von Cohen's Kappa angepasst nach Landis und Koch [64] und Altman [3]</i>	58
<i>Tabelle 40: Modifizierte und hypothetische Übereinstimmungsmatrix NGS und Echtzeit-PCR in Mutation/ Wildtyp</i>	66
<i>Tabelle 41: Vorgehensempfehlung zur PIK3CA-Mutatationsanalyse aus Langzeit-asserviertem Tumorgewebe</i> .	67

Tabelle 42: Übersicht der Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges modifiziert nach Lux et al. [71] 72

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AACR	American Association for Cancer Research
ABD	adaptor binding domain
AKT	Proteinkinase B
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ASCO	American Society of Clinical Oncology
BAD	Bcl-2 associated agonist of cell death protein
BAX	Bcl-2 associated X protein
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
BET	Brusterhaltenden Therapie
BRCA	Breast Cancer Gene
CAP	College of American Pathologists
CCD	charge coupled device
CDK	cyclin dependent kinase
CIS	Carcinoma in situ
Ct	cycle threshold
ctDNA	circulating Tumor DNA
ddATP	Didesoxyriboadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxyribocytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyriboguanosintriphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleosid-Triphosphate
ddTTP	Didesoxyribothymidintriphosphat
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	desoxyNukleosidTriPhosphat
Echtzeit-PCR	rt-PCR

EDTA.....	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EMA	<i>Europäischen Arzneimittelagentur</i>
ER	<i>Östrogenrezeptor</i>
et al.....	<i>et alii</i>
EU	<i>Europäische Union</i>
EV-DNA.....	<i>extrazelluläre Vesikel-DNA</i>
FAM.....	<i>Carboxyfluorescein</i>
FFPE	<i>Formalin-fixiert und in Paraffin-eingebettet</i>
FOXO	<i>Forkhead-Box-Protein O3</i>
GPCR.....	<i>G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren</i>
GSK-3	<i>Glykogensynthase-Kinase 3</i>
GTP.....	<i>Guanosintriphosphat</i>
h	<i>Stunde</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HER2neu.....	<i>human epidermal growth factor receptor neural</i>
HEX.....	<i>Hexachlorfluorescein</i>
HiDi	<i>highly deionized</i>
HPLC	<i>Hochleistungsflüssigchromatographie</i>
HR.....	<i>Hormonrezeptor, Hazard Ratio</i>
i5	<i>Index 2</i>
i7	<i>Index 1</i>
IRS	<i>Immunreaktive Score</i>
ISH.....	<i>In-situ-Hybridisierung</i>
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
KI.....	<i>Konfidenzintervall</i>
Ki-67	<i>Kiel-Antigen Nr. 67</i>
LOH.....	<i>loss of heterozygosity</i>

LRM.....	<i>Local Run Manager</i>
Mdm2.....	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
Mg ²⁺	<i>Magnesium</i>
min.....	<i>Minuten</i>
ml.....	<i>Milliliter</i>
mM.....	<i>Millimolar</i>
MTA.....	<i>Medizinischer Technologe/Technologin</i>
mTOR.....	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC2.....	<i>mammalian Target Of Rapamycin-Complex 2</i>
ng.....	<i>nanogramm</i>
NGS.....	<i>Next-Generation-Sequencing</i>
NST.....	<i>no special type</i>
NTCs.....	<i>No Template Control</i>
p53.....	<i>tumor protein p53</i>
PALB2.....	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PC.....	<i>Positive Control</i>
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i>
PDK1.....	<i>Phosphoinositide-dependent Kinase 1</i>
PFS.....	<i>progressionsfreien Überlebens</i>
PgR.....	<i>Progesteronrezeptor</i>
PH.....	<i>Pleckstrin-Homologie</i>
PI.....	<i>Ki-67-Proliferationsindex</i>
PI3K.....	<i>Phosphoinosit 3-Kinase</i>
PIK3CA.....	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i>
PIP ₃	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat</i>
PTEN.....	<i>phosphatase and tensin homolog</i>

RAS.....	<i>Rat sarcoma</i>
RBD.....	<i>RAS-Bindungsdomäne</i>
Rheb.....	<i>Ras homolog enriched in brain</i>
rpm.....	<i>revolutions per minute</i>
RTKs.....	<i>Rezeptortyrosinkinasen</i>
s.....	<i>Sekunden</i>
SH2.....	<i>Src-Homologie-2-Domäne</i>
SNPs.....	<i>Einzelnukleotid-Polymorphismen</i>
TIF.....	<i>Tagged Image File Format</i>
TNBC.....	<i>Triple negative breast cancer</i>
TSC2.....	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
UICC.....	<i>Union Internationale Contre le Cancer</i>
UKS.....	<i>Universitätsklinikum des Saarlandes</i>
UV.....	<i>ultraviolette</i>
V.....	<i>Volt</i>
VAF.....	<i>Allelfrequenz</i>
vgl.....	<i>vergleiche</i>
VIC.....	<i>2'-chloro-7'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein</i>
WHO.....	<i>World Health Organisation</i>
µl.....	<i>Mikroliter</i>
µm.....	<i>Mikrometer</i>

1 Zusammenfassung

Einleitung

Das Mammakarzinom ist das häufigste Karzinom der Frau. Neben den konventionellen Therapieansätzen steht, nach der SOLAR1 Studie von Andre et al. aus dem Jahr 2019, mit dem PI3K-Inhibitor Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant seit 2020 eine weitere Behandlungsmöglichkeit für das PIK3CA-mutierte, Hormonrezeptorpositive, HER2neu-negative, endokrin vortherafierte, lokal fortgeschrittene oder metastasierte Mammakarzinom zur Verfügung. Voraussetzung für den Einsatz dieser Medikamentenkombination ist der vorherige Nachweis einer PIK3CA-Mutation durch „liquid-biopsy“, oder aus einer Gewebeprobe. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Alpelisib um eine Zweitlinientherapie handelt, welche erst 2020 zugelassen wurde, findet eine solche Testung aktuell vor allem nachträglich aus asserviertem, formalin-fixierten und paraffin-eingebetteten Tumorgewebe statt. Vor diesem Hintergrund ist es Ziel dieser methodischen Arbeit die Validität der drei gängigsten Methoden, Sequenzierung nach Sanger, Echtzeit-PCR und das „Next-Generation-Sequencing“, für den Nachweis oder Ausschluss von PIK3CA-Mutationen im Langzeit-archiviertem Tumorgewebe zu vergleichen und somit möglicherweise eine präferenzielle Empfehlung für die molekularpathologische Diagnostik zu geben.

Material und Methodik

Untersucht wurde in neutral-gepuffertem Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Überschussmaterial von Mamma-Resektaten aus den Jahren 2006 bis 2011. Das Untersuchungsmaterial besteht in dieser Arbeit ausschließlich aus DNA-Proben, welche aus nicht-spezifischer-Typ- (NST) lobulären und kombinierten Karzinomen der Mamma isoliert wurden. Das verwendete Probenmaterial wurde ursprünglich in der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin (Leitung: Prof. Dr. E.-F. Solomayer) am Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) gewonnen und im Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie am UKS (Leitung: Prof. Dr. Rainer M. Bohle) nach leitliniengerechter Diagnostik untersucht. In dieser Arbeit wurden die Proben mittels Sequenzierung nach Sanger, Quantitativer Echtzeit-PCR und Next-Generation-Sequencing (NGS) untersucht. Anschließend wurden die molekulargenetischen Untersuchungsmethoden unabhängig voneinander im Hinblick auf die Mutationsfrequenz unter Berücksichtigung der Mutationsloki Exon 7, Exon 9 und Exon 20 des PIK3CA und der intrinsischen Subtypen Luminal A, Luminal B, HER2-positiv und Triple-negativ ausgewertet. Zusätzlich wurde mittels Cohens's Kappa die Reliabilität der drei verwendeten PIK3CA-Mutationsanalyseverfahren statistisch ermittelt.

Ergebnisse

Von den 59 Patientinnen gehören 22 zu der Gruppe HR-positiv und HER2/neu-negativ. Das Vorhandensein eines PIK3CA-Pseudogens auf dem Chromosom 22 erschwerte die Mutationsanalyse mittels Sequenzierung nach Sanger. Bei circa 75% der Proben konnte mittels Sequenzierung nach Sanger das Exon 9 des PIK3CA nicht vollständig analysiert werden. In der Echtzeit-PCR konnte eine Probe nicht analysiert werden. Mit der NGS konnten alle Patientinnen-Proben analysiert werden. Die Sensitivität der Sequenzierung nach Sanger lag in dieser Arbeit bei 33%. Die Spezifität liegt in dieser Arbeit für die Sequenzierung nach Sanger bei 100%. Die Quantitative Echtzeit-PCR und das Next-Generation-Sequencing hatten nach *Altman* eine sehr gute und nach *Landis und Koch* eine fast perfekte Reliabilität.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend ergibt sich, dass für eine primär separate PIK3CA-Mutationsanalyse aus mehrere Jahre als Paraffinblock asserviertem Tumorgewebe zunächst die Sequenzierung nach Sanger verwendet werden sollte. Falls die Sequenzierung nach Sanger den Wildtyp oder ein inkomplettes Ergebnis nachweist, sollte eine erneute Analyse mittels NGS stattfinden. Detektiert die Sequenzierung nach Sanger eine Mutation, ist keine weitere Analyse notwendig.

Summary

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women. In addition to conventional treatment approaches, the PI3K inhibitor alpelisib in combination with fulvestrant has been available since 2020 as a further treatment option for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, HER2-negative, endocrine-pretreated, locally advanced or metastatic breast cancer following the SOLAR1 study by Andre et al. in 2019. The prerequisite for the use of this drug combination is the prior detection of a PIK3CA mutation by liquid biopsy or from a tissue sample. Since alpelisib is a second-line therapy that was only approved in 2020, such testing is currently mainly carried out retrospectively from preserved excess tissue. Against this background, the aim of this methodological work is to practically compare the three established methods, sequencing according to Sanger, real-time PCR and next-generation sequencing, for this application and thus provide a recommendation for practice.

Methods and Material

Excess material from breast resections obtained between 2006 to 2011. The tissue analyzed was formalin-fixed and paraffin-embedded. The test material in this study consists exclusively of DNA samples isolated from lobular, NST and combined carcinomas of the breast. The sample material used was originally obtained at the Department of Gynaecology, Obstetrics and Reproductive Medicine (Head: Prof. Dr E.-F. Solomayer) at Saarland University Hospital (UKS) and examined at the Institute of General and Special Pathology at UKS (Head: Prof. Dr Rainer M. Bohle) according to guideline-based diagnostics. In this study, the samples were analysed using Sanger sequencing, quantitative real-time PCR and next-generation sequencing. The molecular genetic examination methods were then analysed independently of each other regarding detection of mutation frequency at loci in the PIK3CA gene in exon 7, exon 9 and exon 20 in the intrinsic breast cancer subtypes luminal A, luminal B, HER2-positive and triple-negative. In addition, the reliability of the three PIK3CA mutation analysis methods used was calculated and statistically analysed using Cohen's Kappa.

Results

Of the 59 patients, 22 belonged to the HR-positive and HER2/neu-negative group. The presence of a PIK3CA pseudogene on chromosome 22 made it difficult to analyse the mutation using Sanger sequencing. In approximately 75% of the samples, exon 9 could not be fully analysed by Sanger sequencing. One sample could not be analysed using quantitative real-time PCR. All patient samples could be analysed using NGS. The sensitivity of Sanger sequencing in this study was 33%. The specificity for Sanger sequencing in this study was 100%. Next-generation-sequencing and real-time PCR showed a very good reliability according to Altman and almost perfect reliability according to Landis and Koch.

Conclusion

In summary, Sanger sequencing should initially be used for a PIK3CA mutation analysis from long time preserved paraffin-embedded tumour tissue. If Sanger sequencing is negative or detects only the wild type gene, a new analysis should be performed using NGS. If Sanger sequencing detects a mutation, no further analysis is necessary.

2 Einleitung

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Das Mammakarzinom ist mit 2,088,849 Neuerkrankungen weltweit pro Jahr das häufigste Karzinom der Frau und zusammen mit dem Bronchialkarzinom die häufigste maligne Erkrankung insgesamt (Stand 2018 [13]). Etwa 1 Prozent aller Neuerkrankungen betrifft Männer. Seit 1980 ist die Inzidenz in Deutschland stetig angestiegen und machte einen Sprung mit der schrittweisen Einführung der flächendeckenden Früherkennung im Jahr 2005. Seit 2009 fällt die Neuerkrankungsrate [131].

Es existieren mehrere Risikofaktoren, um an Brustkrebs zu erkranken. Hierbei sind „endokrine Faktoren“, wie ein langer hormonell aktiver Zeitraum (frühe Menarche und späte Menopause), eine späte, oder keine Gravität und Adipositas oder starke Gewichtszunahme in der Postmenopause an erster Stelle zu nennen. Zurückgeführt wird das auf das in Fettzellen enthaltene Enzym Aromatase, welches Östrogen produziert [19]. Auch eine postmenopausale Hormonersatztherapie kann das Brustkrebsrisiko erhöhen [131]. Es gibt Hinweise darauf, dass die Einnahme von hormoneller Kontrazeptiva das Risiko an Brustkrebs zu erkranken ebenfalls erhöht [84].

Die zweite Gruppe umfasst die hereditären Faktoren. 5-10 % der Mammakarzinome gelten als erblich bedingt [138]. Ein hohes Risiko besteht vor allem bei Keimbahnmutationen in den Tumorsuppressorgenen. Hier zu nennen sind Mutationen der BRCA1-, BRCA2- oder PALB2-Gene. Manche Quellen zählen auch die RAD51C Varianten zu den Faktoren, die mit erhöhtem Risiko einhergehen (Fanconi Anämie [131]). Ein niedrigeres Risiko wird den Keimbahnmutationen in den STK11-, ATM-, PTEN-, und CHEK-2-Genen zugeschrieben [124].

Die dritte Gruppe umfasst vor allem toxische und Lifestyle-Faktoren, wie Strahlungsexposition der Mamma (gerade in jungem Alter), hohen Alkoholkonsum und Nikotinabusus. Aber auch höheres Alter, hohe Brustdichte und Diabetes mellitus II werden zu den Risikofaktoren gezählt. Nicht zuletzt erhöht auch ein unilaterales Mammakarzinom das Risiko, kontralateral erneut zu erkranken[86] [121].

2.1.2 TNM-Klassifikation

Die Beschreibung und Einteilung der Mammakarzinome, sowohl bei den männlichen als auch den weiblichen Patienten, erfolgt anhand der TNM-Klassifikation nach Wittekind und Meyer. Beschrieben werden Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und Metastasierung (M) [20].

TNM-Klassifikation	Tumorausbreitung
Tumorgröße	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumorgröße $\leq 2\text{cm}$
T2	Tumorgröße $> 2\text{cm}$ und $\leq 5\text{cm}$
T3	Tumorgröße $> 5\text{cm}$
T4	Tumor jeder Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut
Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II
N2	Metastase(n) in ipsilateralen axillären Lymphknoten der Level I und II, untereinander oder an andere Strukturen fixiert <i>oder</i> in Abwesenheit von klinisch erkennbaren axillären Lymphknotenmetastasen, bei klinisch erkennbaren ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
N3	Metastase(n) in ipsilateralen infra- oder supraclaviculären Lymphknoten (Level III) bei gleichzeitigem Befall von axillären und A. mammaria interna Lymphknoten
Metastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: Ins Deutsche übersetzte TNM-Klassifikation 8. Auflage [14]

2.1.3 Histologische Klassifikation

Die histologische Beschreibung und Klassifikation des Mammakarzinoms erfolgen gemäß der aktuellen Leitlinien der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) [139]. Grundsätzlich werden in situ Karzinome (CIS) von invasiven Karzinomen unterschieden. Bei ersteren handelt es sich um Risikoläsionen, welche die Basalmembran noch nicht durchbrochen haben. Hier wird zwischen dem duktalem CIS und lobulären CIS differenziert. Beim invasiven Mammakarzinom unterscheidet man zwischen verschiedenen histologischen Subtypen. Der häufigste Tumortyp des invasiven Mammakarzinoms ist das invasive Karzinom *kein spezieller Typ (no special type, NST)*, zu der bis zu 80% aller invasiven Karzinome gehören. Ihr gemeinsames Merkmal ist das Ausbleiben ausreichender Charakteristika, um einer speziellen Gruppe zugeordnet werden zu können. Die invasiven Karzinome

spezieller Typen werden durch ihre Morphologie definiert. Die größte Gruppe stellt das *invasive lobuläre Karzinom* dar. Dieses macht bis zu 15% der invasiven Karzinome aus. Weitere Arten sind das *muzinöse Karzinom*, das *tubuläre* und das *kribriforme Karzinom*. Letztere scheinen mit einer sehr guten Prognose einher zu gehen [65].

2.1.4 Grading

Für die histologische Graduierung (engl.: Grading) des invasiven Mammakarzinoms wird das von Elston und Ellis modifizierte Bloom-Richardson-Grading System verwendet [35]. Hierbei handelt es sich um einen Summenscore, der Scorewerte für eine Drüsenbildung, Kernpleomorphie/-atypie und eine klassierte Mitoserate berücksichtigt. Jede dieser drei Kategorien kann mit 1 bis 3 Punkten bewertet werden. Dabei werden geringe oder komplett fehlende tubuläre Differenzierung, stark form- und größenveränderte Zellkerne und eine hohe Mitosen-Anzahl jeweils mit einer hohen Punktzahl bewertet. Nach Addition der einzelnen Scores teilt man die Mammakarzinome in drei Gruppen ein.

Summenscore	Grading
3-5	G1: gut differenziert, geringer Malignitätsgrad
6-7	G2: mäßig differenziert, mittlerer Malignitätsgrad
8-9	G3: gering differenziert, hoher Malignitätsgrad

Tabelle 2: Übersicht Grading des Mammakarzinoms nach Elston und Ellis

Das Grading nach Elston und Ellis korreliert statistisch signifikant mit der Prognose. Hier geht ein niedriges Grading mit einer verbesserten Überlebensrate und einem verlängerten rezidivfreien Intervall einher [35]. Auch unabhängig von Tumorgröße und Nodalstatus ist ein hohes Grading mit einer verkürzten 10-Jahres-Überlebensrate assoziiert [109].

2.1.5 Hormonrezeptorstatus

Gemäß der S3-Leitlinie Mammakarzinom, sollten in der Primärdiagnostik beim invasiven Mammakarzinom der Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptorstatus (PgR) bestimmt werden [139]. Dabei ist die Bestimmung mittels Immunhistochemie die empfohlene Methode. Die Interpretation der immunhistochemischen Reaktionsergebnisse sollte den Empfehlungen der American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists (ASCO/CAP) -Leitlinien folgen: Für die Bewertung als ER- bzw. PgR-positiv bedarf es mindestens 1% positiver Tumorzellkerne. Ein ER- bzw. PgR-negatives Ergebnis liegt vor, wenn bei eindeutig positiver interner Kontrolle im Tumorgewebe weniger als 1% der Zellkerne immunreaktiv sind [45]. Da es Hinweise darauf gibt, dass Tumoren mit niedriger ER-Positivität (1-9% positive Zellen) tumorbiologisch und prognostisch ER-/PgR-negativen

Mammakarzinomen näher stehen, wird empfohlen, diese gesondert zu betrachten [133]. Neben dem Prozentsatz der positiven Tumorzellkerne empfiehlt die ASCO/CAP – Leitlinie auch die Färbeintensität anzugeben. Als Zusatz und zur weiteren Spezifizierung können noch weitere Scores angegeben werden, wie beispielsweise der Allred-Score [46] oder der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner [98]. Hier werden auch Färbeintensität (0-3 Punkte) und der Prozentsatz an positiv-gefärbten Zellkernen (0-4 Punkte) bewertet. Nach Multiplikation beider Werte erhält man einen Scorewert zwischen 0 und 12. Ab einem Wert ≥ 2 gilt die Probe als Hormonrezeptor-positiv.

2.1.6 Human epidermal growth factor receptor 2 (HER 2/neu) Status

Die Bestimmung des HER2/neu Status wird im Zuge der Primärdiagnostik in der S3-Leitlinie Mammakarzinom empfohlen. Der HER2/neu Status kann sowohl über die Protein-Expression als auch über die Genamplifikation des HER2-Gens bestimmt werden. Den Leitlinien folgend, wird die Protein-Expression mittels Immunhistochemie und die Genamplifikation durch In-situ-Hybridisierung (ISH) nachgewiesen [130]. HER2/neu gehört zu der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren. Durch die Stimulation mehrerer Signalkaskaden, wie des PI3K/AKT-Signalweges, ermöglicht es Zellwachstum, Überleben und Zelldifferenzierung [52]. Etwa in 25-30% der Mammakarzinome liegt ein positiver HER2/neu Status vor [96]. Insgesamt ist ein positiver Her2/neu Status mit einer schlechteren Prognose assoziiert [57]. Durch die Therapie mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab kann die Prognose verbessert werden [120].

2.1.7 Ki-67-Proliferationsindex

Ki-67 ist ein Biomarker für Proliferation, welcher in sich teilenden Zellen exprimiert wird und sich in der Interphase im Zellkern nachweisen lässt [40]. Die S3-Leitlinie Mammakarzinom empfiehlt konsensbasiert, den Ki-67-Proliferationsindex (PI) in der Primärdiagnostik bestimmen zu lassen [139]. In der Routinediagnostik wird der PI mittels Immunhistochemie ermittelt. Es existiert aber noch keine konsentrierte Richtlinie, zur Durchführung und Interpretation des PI [31]. Allgemein sind niedrige Werte $<10\%$ mit einem langsamen Wachstum assoziiert, wohingegen sehr hohe Werte $>25\%$ für ein schnelles Tumorstadium sprechen. Die Prognose der Tumoren mit hoher Ki-67-Positivität ist signifikant schlechter als die der Ki-67-niedrigexprimierenden Tumoren (Hazard Ratio, HR=1,57; 95% CI 1,33-1,87; $p<0,00001$) [139].

2.1.8 Intrinsische Subtypen

Das Mammakarzinom NST ist morphomolekular gesehen eine heterogene Erkrankung. Durch die Analyse von Genexpressionsprofilen, konnten molekulare Untergruppen bestimmt werden, welche sich sowohl im klinischen Verlauf als auch im Therapieansprechen deutlich unterscheiden [114]. Da die

Durchführung dieser Analysen – bislang - im klinischen Alltag flächendeckend nicht umsetzbar ist, wurde alternativ eine vereinfachte Klassifikation vorgeschlagen, welche die Tumoren anhand eines immunhistochemischen Algorithmus subtypisiert [93].

Intrinsischer Subtyp	Östrogenrezeptor	Progesteronrezeptor	HER2/neu Status	Ki-67-Proliferationsindex
<i>Luminal A</i>	ER-positiv und/oder	PgR-positiv	HER2-negativ	Ki-67 niedrig
<i>Luminal B HER2-Negativ</i>	ER-positiv und/oder	PgR-positiv	HER2-negativ	Ki-67 hoch
<i>HER2-Positiv</i>	ER-positiv und/oder	PgR-positiv	HER2-positiv	Ki-67 hoch oder niedrig
<i>HER2-Positiv</i>	ER-negativ	PgR-negativ	HER2-positiv	
<i>Triple-Negativ</i>	ER-negativ	PgR-negativ	HER2-negativ	

Tabelle 3: Intrinsische Subtypen des Mammakarzinoms

Bei der Stratifizierung der luminalen Tumoren ist zu beachten, dass das ausschlaggebende und führende Merkmal die ER-Expression ist. Obwohl der PgR-Status hilfreiche Zusatzinformationen liefert, reicht eine geringe PgR-Expression (1-9% positive Tumorzellkerne) nicht aus, um ER-negative Tumore in die Gruppe der luminalen Tumore einzuordnen [90].

2.1.9 Therapie

Ziel der modernen Mammakarzinom-Therapie ist die individuelle Behandlung des Tumors. Dabei sind das UICC (Union Internationale Contre le Cancer) -Stadium der Erkrankung und die molekularpathologischen Eigenschaften des Tumors von essenzieller Bedeutung und Aussagekraft. Die UICC-Stadien werden anhand der TNM-Klassifikation zusammengefasst. Bis Stadium IV wird eine primär kurative Therapie angestrebt. Insgesamt fußt die Therapie auf drei Säulen: *Operative Therapie, systemische Therapie und Strahlentherapie.*

Operative Therapie: Ziel der Operation ist es, den Tumor in sano zu entfernen (R0-Resektion), da ein signifikanter Zusammenhang zwischen Resektionsrand und der Lokalrezidiv-Rate besteht [83]. Es besteht die Möglichkeit einer Brusterhaltenden Therapie (BET) und der Mastektomie. Dabei ist die BET mit anschließender Radiotherapie der gesamten Brust bezüglich des Überlebens der alleinigen Mastektomie gleichwertig [83,139].

Systemische Therapie: Die systemische Therapie kann unterteilt werden in die primäre, neoadjuvante Therapie und die adjuvante Therapie. Die neoadjuvante Therapie besteht aus einer präoperativen Chemotherapie und gegebenenfalls einer Antikörpertherapie und/oder einer Antihormontherapie. Eine neoadjuvante systemische Therapie wird als Standardbehandlung bei Patientinnen mit lokal fortgeschrittenen, primär inoperablen oder inflammatorischen Mammakarzinomen im Rahmen eines multimodalen Therapiekonzeptes angesehen. Ziel ist die Reduktion der Tumorgröße bis hin zur Operabilität. Wenn die gleiche postoperative, adjuvante Chemotherapie indiziert ist, sollte eine neoadjuvante systemische Therapie bevorzugt werden [138]. Die adjuvante systemische Therapie folgt im Anschluss an eine Operation. Sie umfasst ebenfalls Chemotherapie, endokrine Therapie (für Hormonrezeptor-positive Tumore) und Antikörper Therapie (für HER2-positive Tumore mit einem Durchmesser >1cm). Weitere wichtige Faktoren sind Lymphknotenstatus, Grading, Menopausen-Status und Alter [33].

Strahlentherapie: Die S3-Leitlinien Mammakarzinom empfehlen nach einer BET, aufgrund eines invasiven Karzinoms, eine Bestrahlung der Brust. In seltenen Ausnahmefällen kann auf eine Bestrahlung verzichtet werden [139]. Ziel ist es, das Risiko eines intramammären Rezidivs zu senken. Die Effektivität konnte mit höchster Evidenz durch zahlreiche Studien belegt werden [24]. Bei Nodal-positivem und lokal fortgeschrittenem Tumor senkt eine postoperative Radiotherapie auch bei Mastektomie das Risiko eines lokoregionären Rezidivs und verbessert so das Gesamtüberleben [42].

UICC-Stadium	TNM-Klassifikation
0	Tis, N0, M0
IA	T1, N0, M0
IB	T0-T1, pN1mi, M0
IIA	T0-T1, N1, M0 <i>oder</i> T2, N0, M0
IIB	T2, N1, M0 <i>oder</i> T3, N0, M0
IIIA	T0-T2, N2, M0 <i>oder</i> T3, N1-N2, M0
IIIB	T4, N0-N2, M0
IIIC	Jedes T, N3, M0
IV	Jedes T, jedes N, M1

Tabelle 4: UICC-Stadien nach TNM-Klassifikation, 8. Auflage UICC 2017 [14]

2.1.9.1 Therapie des Hormonrezeptorpositivem, HER2/neu-negativem Mammakarzinoms im fortgeschrittenen oder metastasierten Tumorstadium

Für die Therapie des fortgeschrittenen oder metastasierten Hormonrezeptor-positiven und HER2/neu-negativen Mammakarzinoms der postmenopausalen Frau steht neben einer möglichen Operation und Bestrahlung zunächst entweder eine alleinige endokrine Therapie, oder eine endokrine Therapie in

Kombination mit einem CDK4/6-Inhibitor zur Verfügung. Bei Rezidiv oder Nichtansprechen dieser Therapie wird Fulvestrant (ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antiöstrogene), oder Fulvestrant und ein CDK4/6-Inhibitor, oder Exemestan (Aromataseinhibitor) und Everolimus (mTOR-Inhibitor) oder Tamoxifen (Antioestrogen) empfohlen [140].

2.2 Das PIK3CA-Gen

Über 70 % der Mammakarzinome sind HR-positiv und HER2-negativ. Die richtliniengemäße adjuvante Behandlung ist in diesem Fall die endokrine Therapie, die allerdings nicht bei allen Patienten anschlägt. Bei 40 – 50 % dieser HR-positiven/HER2-negativen Patienten mit einem Brustkrebs im fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium sind aktivierende PIK3CA-Mutationen im Tumor nachweisbar, welche zu einer Hyperaktivierung des PI3K-Akt-Signalwegs führen [5].

Das PIK3CA-Gen ist auf Chromosom 3 lokalisiert und kodiert die p110 α -Untereinheit des Phosphoinositid-3-Kinase-(PI3K) Enzyms. Somit spielt PIK3CA eine zentrale Rolle im PI3K-Akt-Signalwegs, welcher für Zell- Proliferation, Überleben, Wachstum und Metabolismus verantwortlich ist (siehe 2.3). Von den verschiedenen Isoformen der katalytischen p110-Untereinheit von PI3K ist PIK3CA das einzige Gen, das bei menschlichem Krebs häufig mutiert ist [21].

2.2.1 PIK3CA-Mutation

Nach Wu et al. (2005) sind somatische Punktmutationen die häufigsten Varianten des PIK3CA-Gens die zum Fortschreiten von Brustkrebs beitragen, aber auch eine Erhöhung der Genkopien konnten bei einigen Proben feststellen [132]. Die für die Onkogenese von zahlreichen Malignomen (s. 2.3.4) spezifischen PIK3CA-Mutationen können in vier Gruppen eingeteilt werden, definiert jeweils durch die vier Domänen der katalytischen Untereinheit, in der sie auftreten: die ABD (adaptor binding domain)-, C2-, helikale- und Kinase-katalytische Domäne [80]. Bis zu 80% der PI3KCA-Mutationen treten an zwei Hotspot-Regionen auf. In der helikalen, (E542K und E545K Exon 9) und Kinase-Domäne (H1047R oder H1047L Exon 20) von p110 α [81]. Analog zu der Alpelisib Zulassungsstudie SOLAR-1, wurden im Rahmen dieser Arbeit vor allem die elf häufigsten PIK3CA-Mutationen untersucht [5]. Diese befinden sich auf Exon 7, 9 und 20 [71]. Im Exon 7 erfolgt ein Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin an Genposition 1258. Im Exon 9 werden sieben verschiedene Mutationen untersucht, welche das Codieren von insgesamt drei verschiedenen Aminosäuren beeinflussen. Es handelt sich um Position 542, 545 und 546. Dabei ist die Mutation an Position E545K mit der Cosmic ID 763 die mit am häufigsten auftretende [7]. Hier erfolgt ein Basentausch an der Genposition 1633 von Guanin gegen Adenin. Im Exon 20 werden drei verschiedene Mutationen untersucht, welche die Codierung der Aminosäure Histidin an der Position 1047 beeinflussen. H1047R (Cosmic ID 775) ist dabei die häufigste somatische Mutation des PIK3CA-Gen [21]. Hier wird an der Basenposition 3140 Guanin anstelle von

Adenin eingebaut. In der Tabelle sind die in der SOLAR-1 Studie untersuchten PIK3CA-Mutationen aufgeführt [137].

Exon	Mutation	Cosmic ID	Basentausch
7	C420R	757	1258 T>C
9	E542K	760	1624 G>A
9	E545A	12458	1634 A>C
9	E545D	765	1635 G>T
9	E545G	764	1634 A>G
9	E545K	763	1633 G>A
9	Q546E	6147	1636 C>G
9	Q546R	12459	1637 A>G
20	H1047L	776	3140 A>T
20	H1047R	775	3140 A>G
20	H1047Y	774	3139 C>T

Tabelle 5: Die in der SOLAR-1 Studie untersuchten PIK3CA-Mutationen mit dem jeweiligen Basentausch: Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T)

Eine Mutation des PIK3CA-Gens führt einer Hyperaktivierung des PI3K/Akt-Signalweges [5]. Diese Hyperaktivierung ist mit einer Stimulierung des Tumorwachstums, einer Resistenzentwicklung gegenüber der Hormontherapie und mit einer schlechteren Prognose für die Patienten assoziiert [35] [82].

2.2.2 Mutationsfrequenzen auf dem PIK3CA-Gen bei Brustkrebs

Referenz	Anzahl der PIK3CA-mutierten Patienten (%)	Region	Methode
Sudhakar et al. [117]	5/25 (20)	Exon 9 und 20	PCR
Pogue-Geile et al. [92]	166/671 (24,7)	Exon 9 und 20	Mass array
Cizkova et al. [23]	17/80 (21,3)	Exon 9 und 20	RT-PCR
Janku et al. [54]	6/29 (20,7)	Exon 9 und 20	PCR
Martínez-Sáez et al. [74]	2261/6338 (35,7)	Ganzes Gen	Meta-Analyse

Tabelle 6: Häufigkeit der Mutationen im PIK3CA-Gen bei Brustkrebs. Modifiziert nach Dirican et al.[29]

Es existieren diverse Studien, welche die generelle Mutationsfrequenz auf dem PIK3CA-Gen bei Brustkrebs untersucht haben. Insgesamt gibt es keine standardisierten Untersuchungsmethoden am Langzeit-archiviertem Tumorgewebe. Am häufigsten wurden Sequenzierung nach Sanger, NGS und Realtime-PCR verwendet. Auch die untersuchten Regionen unterscheiden sich, umfassen aber in der

Mehrheit Exon 9 und Exon 20. In Tabelle 9 sind fünf exemplarische Studien mit Mutationsfrequenz, untersuchter Region und Methode aufgeführt. Es fällt auf, dass sich die Mutationsfrequenzen unterscheiden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit von Martínez-Sáez et al. [74], mit einer Mutationsfrequenz von 35,7%, aufgrund der höchsten Stichprobengröße als Vergleichsarbeit herangezogen.

2.2.3 Behandelbarkeit bei PIK3CA Mutation - Alpelisib

Für die Patientengruppe der Hormonrezeptor-positiven, HER2-negativen und endokrin vortherafierten Brustkrebs-Patientinnen im fortgeschrittenen oder metastasierten Tumorstadium, wurde Ende Juli 2020 für Europa der orale α -spezifische PI3K-Inhibitor Alpelisib auf Basis der randomisierten, plazebokontrollierten Phase-III-Studie SOLAR-1-Studie zugelassen [116]. Diese evaluierte die Zugabe von Alpelisib zu dem Antiöstrogen Fulvestrant im Vergleich zu Fulvestrant allein bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs im fortgeschrittenen Stadium (HR+, HER2-), die einen Rückfall oder ein Fortschreiten auf oder nach einer vorherigen Aromatasehemmer-Behandlung erlitten haben. Die Studie zeigte eine signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (PFS) in der PIK3CA-mutierten Patientenkohorte durch Gabe des PI3K-Inhibitors Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant (11 Monate vs. 5 Monate) HR=0,65, 95% KI, 0,5-0,85, P<0,001) [6,77]. Alpelisib setzt selektiv an der katalytischen α -Untereinheit des Membranmoleküls an und unterbindet dadurch die Phosphorylierung der nachgeschalteten Signalkaskade.

Der Nachweis eines positiven PI3K-Status durch eine aktivierende *PIK3CA*-Mutation, entweder im Tumorgewebe oder im Blutplasma, ist eine weitere Voraussetzung für den Einsatz des PI3K-Inhibitors [99]. Weitere PI3K-Inhibitoren sind Bestandteil aktueller Forschung.

2.3 Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3Ks)

2.3.1 Die Familie der PI3K

Die Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) gehört zu den Lipidkinasen. Sie erzeugen intrazelluläre Lipide, welche eine Vielzahl intrazellulärer Prozesse beeinflussen. Stimuliert durch extrazelluläre Reize wie Wachstumsfaktoren und Hormone, phosphorylieren sie die 3-OH-Gruppe von Inositol-Membranlipiden. So regulieren sie zahlreiche Aspekte der Zellfunktion, wie Zellwachstum, Zellüberleben und den Glucose-Metabolismus [127]. Darüber hinaus werden sie auch mit der Angiogenese und der kardiovaskulären Homöostase in Verbindung gebracht. Die PI3K-Signalübertragung ist eine der am häufigsten deregulierten bei Krebs [126].

Es existieren acht PI3K-Isoformen, die man, aufgrund von Proteinstruktur, Substratspezifität und Art der Regulation, in drei Klassen einteilen kann [123]. Die PI3Ks der Klasse I sind am besten verstanden,

auch wenn es noch einiges über ihre Aktivierung und spezielle Funktion zu erforschen gibt [125]. Sie sind Heterodimere, bestehend aus einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen Untereinheit (p85 genannt). Weiter können sie noch, abhängig von Struktur der regulatorischen und katalytischen Untereinheit, in Klasse IA und Klasse IB unterteilt werden [53]. In der Klasse IA besitzen Säugetiere drei verschiedene Isoformen der katalytischen Untereinheit p110 (p110 α , p110 β und p110 δ), welche jeweils durch drei verschiedene Gene (PIK3CA, PIK3CB und PIK3CD) codiert werden [87]. Außerdem verfügen sie über mindestens fünf verschiedene regulatorische Untereinheiten, welche die Rezeptorbindung, Aktivierung und Lokalisation des Enzyms vermitteln. Diese werden durch die Gene PIK3R1, PIK3R2 und PIK3R3 codiert. Namentlich sind das p85 α (und ihre Spleiß-Varianten p55 α und p50 α), p85 β und p55 γ [61]. All diese bilden funktionelle Komplexe mit p110 [124]. Die Klasse IB ist ebenfalls ein Heterodimer, bestehend aus einer katalytischen (p110 γ) und einer regulatorischen Untereinheit (p101, p87,p84) [69]. Die PI3Ks der Klasse I kommen bei Säugetieren in allen Zellen vor, wobei p110 δ und p110 γ vor allem in Leukozyten vermehrt vorkommen [126].

Klasse	Untereinheit	Protein	Name des Gens
IA	<i>Katalytisch</i>	p110 α	PIK3CA
		p110 β	PIK3CB
		p110 δ	PIK3CD
	<i>Regulatorisch (p85)</i>	p85 α	PIK3R1
		p55 α	PIK3R1
		p50 α	PIK3R1
		p85 β	PIK3R2
		p55 γ	PIK3R3
IB	<i>Katalytisch</i>	p110 γ	PIK3CG
	<i>Regulatorisch</i>	p101	PIK3R5
		p84/p87	PIK3R6

Tabelle 7: Katalytische und regulatorische PI3K-Untereinheiten bei Säugetieren nach Kok et al. 2009 [61]

Relevant für die Einteilung und genauere Definition der einzelnen Klassen ist sowohl die Sequenzhomologie, als auch die jeweilige Substratpräferenz, da die verschiedenen PI3K-Klassen unterschiedliche Aufgaben in der zellulären Signaltransduktion haben [36].

2.3.2 Die Signalkaskade der PI3Ks der Klasse I

Da die PI3Ks der Klasse I am deutlichsten mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht werden [26] und sich die vorliegende Arbeit auf Mutationen im PIK3CA-Gen konzentriert, wird im Folgenden der Signalweg der Klasse I genauer betrachtet. Die Abbildung 2 nach Courtney et al. 2010 dient zur allgemeinen Veranschaulichung. Abbildung 1 von Vanhaesebroeck et al. 2010 skizziert die vorgeschalteten Signale.

Es wird davon ausgegangen, dass bei ruhenden Zellen im Zytoplasma, ein inaktiver p85-p110-Komplex vorliegt, der als Reaktion auf adäquate Signale aktiviert werden kann [129]. Insgesamt existieren drei bekannte Aktivierungswege des Signalweges. PI3Ks der Klasse IA werden einerseits von Wachstumsfaktoren durch Stimulation der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) aktiviert. Hierbei bindet die regulatorische Untereinheit p85 direkt an Phosphotyrosinresten auf den RTKs und/oder auf Adaptoren. Das führt zur Aufhebung der intermolekularen Hemmung von der katalytischen Untereinheit p110 durch p85. PI3K lokalisiert sich daraufhin an die Plasmamembran, wo sich ihr Substrat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat befindet. Die PI3K kann außerdem durch RAS-Proteine stimuliert werden, welche zuvor durch RTKs oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) aktiviert wurden [126]. Die RAS-Proteine binden p110 direkt an eine N-terminale RAS-Bindungsdomäne (RBD). Diese wirken synergistisch mit Tyrosin-phosphorylierten Proteinen zusammen, um die Lipidkinasen-Aktivität zu aktivieren [37]. Auch andere kleine GTPasen wie Rac, Rho und Cdc42 können mit p85-Isoformen interagieren, was eine weitere Alternative der Aktivierung darstellt [126]. Als letzte Möglichkeit kann p110 noch durch GPCR aktiviert werden [26]. Grundsätzlich übertragen GPCRs ihr Signal intrazellulär meist durch allosterische Aktivierung heterotrimerer G-Proteine. *In vitro* können G $\beta\gamma$ -Untereinheiten p110 β und p110 γ aktivieren. Nicht aber p110 α und p110 δ [126]. Es deutet darauf hin, dass dies auch in intakten Zellen der Fall ist [56]. Durch das Aktivieren von Tyr-Kinasen und Ras, können auch die PI3K Isoformen stimuliert werden, die nicht direkt auf G $\beta\gamma$ -Untereinheiten reagieren [126].

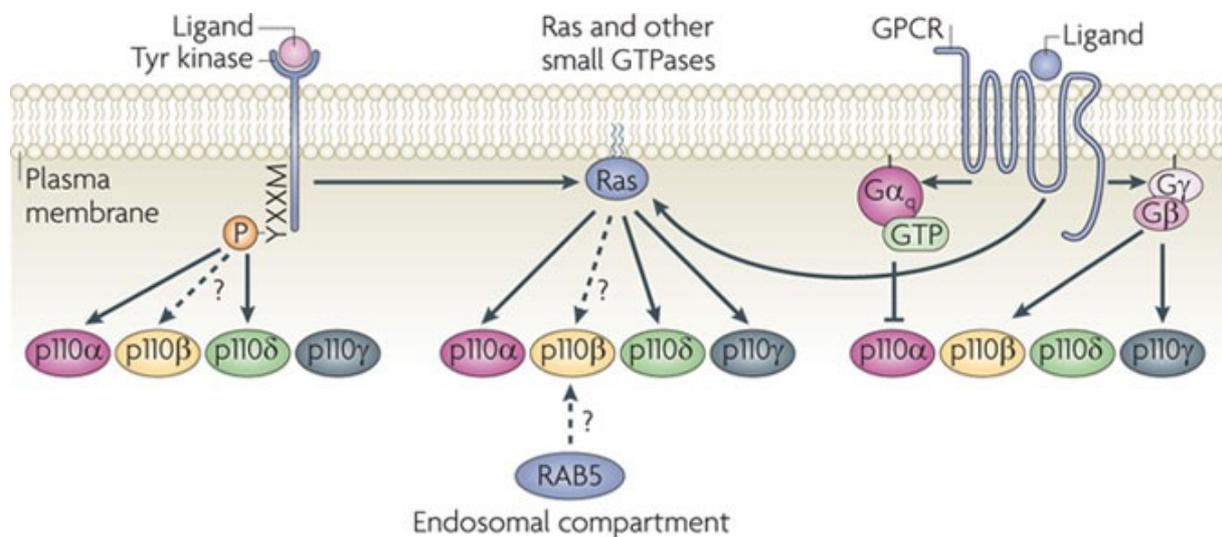


Abbildung 1: Vorgelagerte Signale, die in PI3Ks der Klasse I einfließen nach Vanhaesebroeck et al. 2010 [126]

Nachdem die PI3Ks aktiviert wurden, phosphoryliert die katalytische Untereinheit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP₃) an der inneren Zellmembran [25]. Das Endprodukt dieser Phosphorylierung, PIP₃, übernimmt als „second messenger“ die wichtigste Funktion als Hauptvermittler in der PI3K-Aktivitätsregulierung. PIP₂ und PIP₃ stellen gemeinsam eine Andockstelle für Proteine mit Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne dar [126]. Dadurch können sie deren

Lokalisation und Aktivität bestimmen [75]. Die Lipidphosphatase „phosphatase and tensin homolog“ PTEN wandelt PIP₃ wieder in PIP₂ um und beendet so die Signalkaskade [43]. Ein Schlüsselenzym, welches auf das von PI3K generierte PIP₃-Signal reagiert, ist die Serine/Threonin-Kinase AKT (auch bekannt als Proteinkinase B). Insgesamt existieren drei AKT-Isoformen (AKT1, AKT2 und AKT3), welche generell weit exprimiert werden, obwohl es einige isoformspezifische Merkmale gibt [129]. Daneben gibt es aber auch viele weitere Ziele der PI3K, welche auch bestimmte Signalkaskaden auslösen können, die dann im weiteren Verlauf in derselben nachgeschalteten Kaskade konvergieren [43]. PIP₃ bringt die „Phosphoinositide-dependent Kinase 1“ (PDK1) und AKT durch Bindung ihrer PH-Domänen in unmittelbare Nähe zueinander [26]. PDK1 aktiviert daraufhin AKT durch die Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 [28,38]. Neben PDK1 benötigt AKT auch noch den Plasmaproteinkomplex „mammalian Target Of Rapamycin-Complex 2“ kurz mTORC2 für die vollständige Aktivierung [108]. Dieser phosphoryliert AKT an Serin 473. Die wichtigsten biologischen Folgen für die Krebszellenentwicklung der PI3K-AKT Signalübertragung lassen sich in drei Kategorien einteilen: Überleben, Proliferation und Wachstum.

Das Zellüberleben wird unter anderem durch die Hemmung der proapoptischen Bcl-2-Familie, BAD und BAX, durch AKT gesichert. BAD bildet ein nicht-funktionales-Hetero-Dimer mit dem Überlebensfaktor BCL-XL. Die Phosphorylierung von BAD verhindert diese Interaktion und BCL-XL erlangt wieder seine anti-apoptische Funktion [129]. Außerdem wirkt die Phosphorylierung von Mdm2 der p53-vermittelten Apoptose entgegen. Mdm2 ist ein negativer Regulator des Tumorsuppressors p53. Durch die AKT-Phosphorylierung wird die Translokation von Mdm2 in den Zellkern erleichtert [78]. Dort bindet Mdm2 das p53 Protein und begünstigt dessen Abbau [129].

Die Proliferation beeinflusst die PI3K/AKT Signalkaskade durch ihren engen Zusammenhang mit dem Zellzyklus [18]. Die Phosphorylierung des „Forkhead-Box-Protein O₃“ (FOXO, oder älter FKHL1), einem Mitglied der „Forkhead-Transkription-Faktor“ Familie, führt zu einem Verbleib von FOXO im Zytoplasma. Die Expression seiner zelltod-induzierenden Gene wie das „Fas-ligand-Gen“ wird gehemmt [16]. Außerdem wird die Expression der CK-Inhibitoren wie p27 und p21 negativ beeinflusst, was in einem gesteigerten Zellzyklus resultiert [41]. Durch Phosphorylierung und die darauf folgende Hemmung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK-3), beeinflusst AKT auch den Glucose-Metabolismus, da dieses im Aufbau von Glykogen resultiert [27].

Das Wachstum wird von AKT beeinflusst, indem es mTOR aktiviert. mTOR ist ein molekularer Sensor, der die Proteinsynthese in Abhängigkeit von Nährstoffen reguliert [129]. AKT phosphoryliert TSC2 und hemmt dadurch die hemmende Rheb-GTPase-Aktivität des TSC1/TSC2-Dimers. Aktiviertes Rheb stimuliert den Proteinkomplex mTORC1, was zu einer erhöhten p70-S6-Kinase Aktivität führt [24] [25].

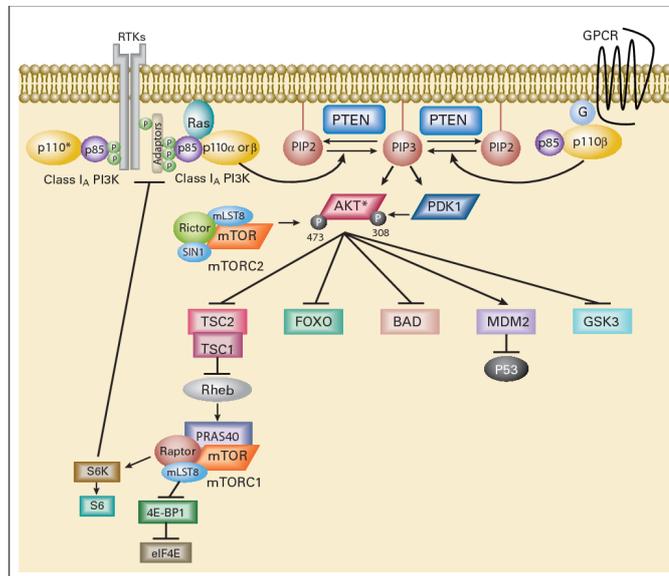


Abbildung 2: Die Phosphatidylinositol-3-Kinase Signalkaskade nach Courtney et al. 2010

2.3.3 Die katalytische Untereinheit p110 α

Das PIK3CA-Gen kodiert für die katalytische Untereinheit p110 α der PI3Ks. Es ist auf Chromosom 3 lokalisiert (3q26.32) und besteht aus 21 Exons, von denen 20 kodierende Exons unterschiedlicher Länge sind. Insgesamt nimmt es eine Größe von 86190 Basen ein [91]. Pseudogene von PIK3CA wurden von Qiu et al. (2006) auf Chromosom 16 (gi 28913054) und 22 (gi 5931525) beschrieben. Zweites befindet sich in der Region des Katzenaugensyndroms [95]. Beide Regionen sind den Sequenzen von PIK3CA auf Exon 9 und 11-13 sehr ähnlich. Ein weiteres Pseudogen wurde auf Chromosom 20 (LOC100422375) gefunden. Dieses erstreckt sich über Exon 9 bis 13 mit einer 95% Homologie, sowohl Exons als auch Introns beinhaltend [91]. Unspezifische Amplifikationen von PIK3CA und vor allem von Exon 9, können wegen der Pseudogene einen falsch-positiven Mutationsstatus aufzeigen. Diese Problematik und Lösungsfindungen werden in den folgenden Kapiteln besprochen. Im Menschen umfasst das Transkript von PIK3CA 3207 Basenpaare. Das entspricht 1068 Aminosäuren [91].

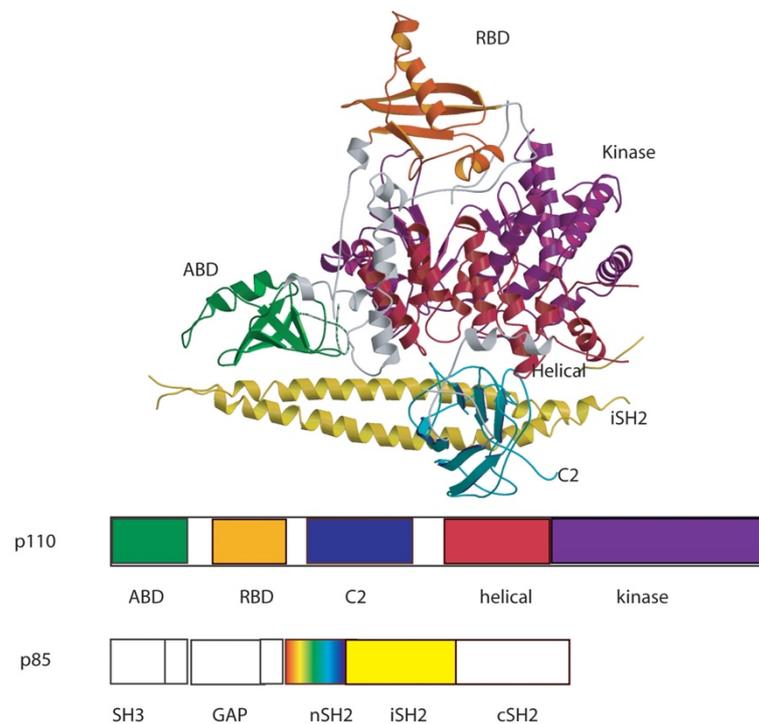


Abbildung 3: Bänderdiagramm des p110 α /niSH2-Heterodimers nach Huang et al. 2008

2.3.4 Pathophysiologie der Phosphatidylinositol-3-Kinasen

Der PI3K-Signalweg ist bei einer Vielzahl von malignen Tumoren aktiviert. Darunter zählen unter anderem Brust-, Darm-, Eierstock-, Pankreas- und Hirn-Tumore [48]. Dass die PI3K-Proteine bei der Onkogenese eine zentrale Rolle einnehmen, konnte durch mehrere Studien bestätigt werden [63]. Aberrationen in diesem Signalweg sind potenzielle Ursachen für Zellveränderungen. Dazu zählen Veränderungen von PTEN, PI3K-Proteinen, PDK1, AKT1 und AKT2 [47]. Auf Exon 7 erfolgt ein Basenaustausch von Cytosin gegen Thymin an Genposition 1258. Als Folge dessen wird statt der Aminosäure Cystein an Position 420 Arginin codiert. Das beeinflusst die C2 Domäne [58]. Diese Mutation der C2-Domäne kann die PI3K durch Erhöhung der Affinität für substrathaltige Membranen hochregulieren [80]. Auf Exon 9 erfolgt ein Basenaustausch an der Genposition 1633 von Guanin gegen Adenin. In der Konsequenz wird statt der Aminosäure Glutaminsäure, Lysin codiert. Diese Mutation in der helikalen Domäne verändert die Wechselbeziehung zwischen der katalytischen Untereinheit p110 α und der SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit p85. Es wird vermutet, dass die Inhibition von p110 α durch p85 dadurch abgeschwächt wird [80]. Die Mutation in Exon 9 soll p110 α in die Lage versetzen, der hemmenden Wirkung von p58 über die Src-Homologie-2-Domäne (SH2) zu entgehen [87]. Auf Exon 20 wird an der Basenposition 3140 Guanin anstelle von Adenin eingebaut. Das führt zu der Codierung von Arginin anstelle von Histidin [141]. Das hat zur

Folge, dass die Kinase-Domäne ihre Konformation ändert und p110 α eine veränderte Interaktion mit der Zellmembran hat. Ihre Affinität zu PIP₂, welches in der Zellmembran vorhanden ist, wird gesteigert [72].

2.4 Fragestellung und Zielsetzung

Über 70 % der Mammakarzinome sind HR-positiv und HER2-negativ. Bei 40 – 50 % dieser HR-positiven/HER2-negativen Patienten mit einem Brustkrebs im fortgeschrittenen oder metastasierten Stadium sind aktivierende PIK3CA-Mutationen im Tumor nachweisbar [5]. Für die Patientengruppe, der Hormonrezeptor-positiven/HER2-negativen und endokrin vortherapierten Brustkrebs-Patientinnen im fortgeschrittenen oder metastasierten Tumorstadium, wurde Ende Juli 2020 für Europa der orale α -spezifische PI3K-Inhibitor Alpelisib auf Basis der SOLAR-1-Studienergebnisse zugelassen [116]. Der Nachweis eines positiven PI3K-Status durch eine aktivierende *PIK3CA*-Mutation, entweder im Tumorgewebe oder im Blutplasma, ist eine Voraussetzung für den Einsatz des PI3K-Inhibitors [99].

Für Patientinnen, welche klinisch für eine Therapie mit PI3K-Inhibitor infrage kommen und bei denen vor der Zulassung von Alpelisib ein Mamma-Karzinom diagnostiziert wurde, muss der PIK3CA-Status nachträglich bestimmt werden. In dieser Arbeit wird untersucht, welches Verfahren (Pyrosequenzierung, RealTime-PCR oder Next-Generation-Sequencing) für die nachträgliche PIK3CA-Status Bestimmung aus Langzeit-asserviertem Überschussmaterial am geeignetsten ist und für die klinische Praxis empfohlen werden kann.

3 Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Probenmaterial

59 in neutral-gepuffertem-Formalin-fixierte und paraffin-eingebettete Gewebeproben wurden im Zuge der Arbeit molekulargenetisch untersucht. Das Untersuchungsmaterial besteht in dieser Arbeit ausschließlich aus Überschussmaterial, welches im Rahmen von operativen Mamma-Ablationen in der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin (Leitung: Prof. Dr. E.-F. Solomayer) am Universitätsklinikum des Saarlandes (UKS) und anschließender leitliniengerechter Diagnostik im Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie am UKS (Leitung: Prof. Dr. Rainer M. Bohle) im Zeitraum von 2006 bis 2011 angefallen ist und somit Archivlagerungszeiten von 9 Jahren bis 14 Jahren aufwies. Es wurden Tumorgewebe von lobulären, NST und kombinierten Karzinomen der Mamma untersucht. Die Diagnosestellung erfolgte durch Fachärzte der oben genannten Pathologie an Hämatoxylin-Eosin gefärbten und zuvor immunhistochemisch analysierten Tumorresektaten.

3.1.2 Geräte und Versuchsmaterialien

Produktbezeichnung	Produktname	Firma, Ort
96 Well Platte	Thermo Fast 96 PCR Detection Plate	ThermoFisher, Waltham
DNA-Sequenzierautomat	3500 Genetic-Analyzer	Applied Biosystems, Foster City
Elektrophoresekammer	Power Source 300V	VWR, Radnor
Eppendorfer Reaktionsgefäß 2,0 ml	Biosphere Safe Seal Tube 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfer Reaktionsgefäß 0,5 ml	Biosphere Safe Seal Tube 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfer Reaktionsgefäß 0,2 ml	Multiply-Pro 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen	Microlance 1,2 mm x 40 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Kapillare 3500	8-Capillary	Applied Biosystems, Foster City
Kühlschrank	Premium NotFrost	Liebherr, Kirchdorf
Magnetrührer	RET Basic	IKA Labortechnik, Staufen
Mikroskop	Axioskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop-Kamera	AxioCam MRc 5	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop-Kamera	DFC340 FX	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom	Rotary 3003	Pfm medical, Nonnweiler
Mikrowelle	M708	Miele, Gütersloh

Next-Generation-Sequencing Gerät	iSeq 100	Illumina, San Diego
Objektträger	Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipette	Eppendorfer Research 10y, 100y, 200y, 1000y	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	Filter Tips Clearline	Biosigma, Cona
Programmierbarer Heizblock	peqSTAR 96 Universal Thermocycler	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Quantitative-Echtzeit-PCR System	QuantStudio 3	ThermoFisher, Waltham
Spectrophotometer	NanoDrop-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlanger
UV-Lichtkammer	Syngene	InGenius, Ottawa
Vortex Mixer	peqTWIST	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Waage	BP 110S	Sartorius, Göttingen
Workstation	UV Sterilizing PCR Workstation	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Zentrifuge	Z 326 K	Hermle Labortechnik, Gosheim

Tabelle 8: Geräte und Versuchsmaterialien

3.1.3 Reagenzien

Produktbezeichnung	Produktname	Firma, Ort
Agarose	peqGOLD Universal Agarose	Peqlab, Biotechnologie, Erlangen
Aqua dest.	Aqua	B. Braun AG, Sembach
EDTA	EDTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, St. Louis
Farbstoff zum Nachweis von Nukleinsäuren	Ethidiumbromid	VWR, Erlangen
Oligodesoxynukleotide	Primer	Eurofins Genomics, Ebersberg
Reagenzien DNS-Isolierung	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit: ATL buffer, Proteinkinase K, AL buffer,	Qiagen, Hilden

	AW1 buffer, AW2 buffer	
Reagenzien Next- Generation-Sequencing	AmpliSeq™	Illumina, San Diego
Reagenzien PCR Template Aufreinigung	QIAamp MinElute PCR Purification Kit: PB buffer, PE buffer, EB buffer, MiniElute Column	Qiagen, Hilden
Reagenzien Sequenzierungs- PCR	BigDye Terminator v1.1: Ready Reaction Mix v1.1 (2,5x); BigDye buffer (5x)	Applied Biosystems, Foster City
Reagenzien Quantitative- Echtzeit-PCR	AmoyDx PIK3CA Mutation Detection Kit: 11 Mutationsspezifische Reaction Mix, PIK3CA External Control Reaction Mix, PIK3CA Enzyme Mix, PIK3CA Positive Control	Amoy Diagnostics Co, Xiamen, China
Taq Polymerase	peqGOLD Taq-DNA-Polymerase	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
TBE Puffer	Tris-Puffer, EDTA, Boric acid Molecular biology grade	AppliChem, Darmstadt
Xylol	Xylol Pharm. Helv VI	Aug. Hedinger GmbH, Stuttgart

Tabelle 9: Reagenzien

3.1.4 Verwendete Programme

Name	Firma, Ort	Verwendung
4Peaks	Nucleobytes B.V., Amsterdam	DNA-Analyse
Chromas lite	Technelysium, South Bisbane	DNA-Analyse
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/ Auswertung
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/ Auswertung
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond	Dokumentation/ Auswertung
QuantStudio Design & Analysis Software v1.5.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham	Dokumentation/ Auswertung
SPSS	SPSS/IBM, Armonk	Dokumentation/ Auswertung

Zotero	George Mason University, Washington DC	Dokumentation/ Auswertung
--------	--	---------------------------

Tabelle 10: Verwendete Programme

3.1.5 Verwendete Primer (Jeweils in 5'-3' Orientierung)

Alle Primer wurden am Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des UKS designt und von der Firma Eurofins Genomics synthetisiert.

3.1.5.1 Externe Primer

Ziel-DNS	Ausrichtung	Sequenz	„Annealing“-Temperatur	GC-Gehalt
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 7</i>	Forward	TGAATTTTCCTTTTGGGGAAG (21)	54,0 °C	38,1%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 7</i>	Reverse	GCCATTTTCCAGATACTAG (20)	53,2 °C	40%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 9</i>	Forward	GGGAAAATGACAAAGAACAG (20)	53,2 °C	40%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 9</i>	Reverse	TATGGTAAAAACATGCTGAG (20)	51,1 °C	35%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 20</i>	Forward	TTGCATACATTCGAAAGACC (20)	53,2 °C	40%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 20</i>	Reverse	CATGCTGTTTAATTGTGTGG (20)	53,2 °C	40%

Tabelle 11: Externe Primer

3.1.5.2 Nested Primer

Ziel-DNS	Ausrichtung	Sequenz	„Annealing“-Temperatur	GC-Gehalt
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 7</i>	Forward	GGGGAAGAAAAGTGTTTTG (19)	52,4 °C	42,1%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 7</i>	Reverse	AGTTTATATTTCCCATGCC (20)	53,2 °C	40%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 9</i>	Forward	CAAAGCAATTTCTACACGAG (20)	53,2 °C	40%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 9</i>	Reverse	TCCATTTTAGCACTTACCTG (20)	53,2 °C	40%

<i>PIK3CA</i> <i>Exon 20</i>	Forward	GAGGCTTTGGAGTATTTTCAT (20)	53,2 °C	40%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 20</i>	Reverse	TCCATTTTTGTTGTCCAGC (19)	52,4 °C	42,1%

Tabelle 12: Nested Primer

3.1.5.3 Primer Exon 9 - Pseudogen Primer

Ziel-DNS	Ausrichtung	Sequenz	„Annealing“- Temperatur	GC-Gehalt
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 9</i>	Forward	TTTACAGAGTAACAGACTAG (20)	51,1 °C	35%
<i>PIK3CA</i> <i>Exon 9</i>	Reverse	TAGCACTTACCTGTGACTCC (20)	57,3 °C	50%

Tabelle 13: Primer Exon 9 - Pseudogen Primer

3.2 Methodik

3.2.1 Umsetzung

Bei der Durchführung der Laborversuche, vor allem beim Anfertigen der Leerschnitte und der Durchführung der Next-Generation-Sequencing, wurde ich von einem erfahrenen und routinierten MTA-Team der Allgemeinen und Speziellen Pathologie der Universitätsklinik des Saarlandes unterstützt.

3.2.2 Asservierung

Das zur Beurteilung entnommene Gewebe, wurde an der Klinik für Frauenheilkunde, Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin am UKS zeitnah in neutral gepuffertem Formalin dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie des UKS zur Diagnosestellung übersandt. Dort wurde es nach abgeschlossener technischer und fachärztlicher Bearbeitung in Paraffin eingebettet archiviert.

3.2.3 Molekulargenetische DNA-Analysen

3.2.3.1 DNA-Isolation und Aufbereitung

Makrodissektion der Tumorareale:

Um die vom Karzinom befallenen Areale zu detektieren, wurden die Hämatoxylin-Eosin (HE)–Schnitte eines repräsentativen Tumorblocks bei 10-facher Vergrößerung mikroskopiert und die ausgemachten Tumorareale mittels externer farblicher Markierung auf dem Deckglas kenntlich gemacht. Nach dem Anfertigen von jeweils vier Leerschnitten mit 5µm Dicke konnten mithilfe einer sterilen Kanüle die ausgemachten Tumorareale vom restlichen Mamma-Gewebe abgetragen werden und in einem, mit 1000µl Xylol gefülltem, 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesammelt werden.

Isolation der abgetragenen DNS und Aufbereitung der DNS zur Amplifizierung:

Um das Tumormaterial aus dem Paraffin zu lösen, wurden die frisch abgetragenen Zellverbände im Xylol für 10 Sekunden im Vortex-Mixer gemischt. Im Anschluss wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 21°C mit 14.000rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das Procedere zur Aufreinigung zweimal mit 1000µl Ethanol (>99,8%) wiederholt. Das gelöste Material wurde im Anschluss für 15 Minuten bei 37°C getrocknet.

Im nächsten Schritt folgte die Auftrennung der zellulären Strukturen und die anschließende Isolation und Aufbereitung der DNA mithilfe einer Reagenzien-Kombination der Firma Qiagen (Hilden). Dazu wurden 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase K zu dem getrockneten Material gegeben. Das Gemisch wurde unter leichtem Schütteln (300rpm) bei 56°C für mindestens 12 Stunden im Thermoblock lysiert. Hierbei ist die Proteinase K für den endo- und exoproteolytischen Abbau zuständig. Im Anschluss daran wurden die aufgeschwemmten Sedimente für 15 Minuten auf 90°C erhitzt. Der Probe wurden dann 200µl AL-Puffer und für die DNA-Fällung 200µl Ethanol hinzugefügt. Unter Verwendung der Zentrifuge konnte die überschüssige Flüssigkeit verworfen werden. Zum Waschen wurden der Probe nacheinander erst 500µl AW1 und dann 500µl AW2 Puffer hinzugefügt und dann wurde jeweils anschließend eine Minute lang bei 8000rpm zentrifugiert. Zum Abschluss wurden die Proben drei Minuten lang bei 14.000rpm getrocknet. Die gewaschene DNA wurde anschließend in 20µl H₂O eluiert. Die Bestimmung der Nukleinsäuren-Konzentration erfolgte am Spectrophotometer nach vorangegangener Leermessung unter der Nutzung von 1,5µl der gewaschenen Probe.

3.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist die Standardmethode der Molekularbiologie, um bestimmte Gen-Sequenzen (Templates) einer DNA-Doppelhelix zu amplifizieren [88,105]. Das Prinzip, entwickelt von Mullis und Faloona, basiert auf drei Teilschritten, dem Denaturierungs-, Annealing-, und

Elongationsschritt. Die Standard-PCR sieht 30 Zyklen vor und fängt mit einer initialen Denaturierung bei 94°C von fünf Minuten an. Während des Zyklus, benötigt die Denaturierungsphase 30 Sekunden. Dabei werden die Bindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen aufgetrennt. Die DNA liegt nun in Einzelsträngen vor. Anschließend folgt bei 55°C für 30 Sekunden der Annealingschritt. Hierbei findet die Hybridisierung der in großen Mengen vorhandenen synthetisierten Oligonucleotidprimer an die Einzelstränge statt. Die Temperatur wird anschließend für 90 Sekunden auf 72°C erhöht. In der jetzt stattfindenden Elongationsphase verlängert die Taq-Polymerase die hybridisierten Primer, bis ein zweisträngiger DNA-Abschnitt vorliegt, der dem Template exakt gleicht. Da diese Elongation an beiden Strängen abläuft, verdoppelt man durch einen Zyklus die Menge der Template-DNA. Die 30 Zyklen enden mit einer finalen Elongationsphase von 5 Minuten. Von zentraler Bedeutung für jede PCR sind die individuell entworfenen Primer. Beim Erstellen wird eine Länge von 18-30 Basen, ein Guanidin und Cytosin Anteil von 40-60% und eine Schmelztemperatur von 55-80°C angestrebt. Außerdem sollten vier gleiche Basen in Folge vermieden werden. Die Primer dieser Arbeit wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert. Um die Spezifität der gewünschten Zielsequenz zu erhöhen, kann eine Nested-PCR (auch verschachtelte PCR genannt) durchgeführt werden. Hierbei wird das Produkt der vorangegangenen PCR als Template für die anschließende PCR genutzt. Das neue Primerpaar hat im Verhältnis zum vorherigen einen geringeren Abstand zueinander. Im Zuge dieser Arbeit wurden die Exone 7, 9 und 20 des PIK3CA-Gens mittels PCR untersucht. Zur Optimierung wurden für die Exone 7 und 20 jeweils die Nested-PCR verwendet. Für das Exon 9 wurden aufgrund eines bekannten Pseudogens spezielle Primer verwendet.

In der praktischen Durchführung wurde zu Beginn ein „MasterMix“ angesetzt. Dieser bestand aus 5µl 10x Puffer, 1µl dNTPs, 1µl Primer Forward (1:10 vorverdünnt), 1µl Primer Reverse (1:10 vorverdünnt) und 0,3µl Taq-Polymerase. Dann wurden 3µl DNA-Template, mit einer angestrebten Konzentration von jeweils 50 ng/µl hinzugefügt und der gesamte „MasterMix“ mit 38,7µl HPLC-H₂O aufgefüllt. Die fertig zusammengestellte Probe wurde anschließend im Thermocycler amplifiziert.

Reaktionsansatz PCR

Menge	Substanz
5µl	10x Puffer
1µl	dNTPs
1µl	Primer Forward (1:10 vorverdünnt)
1µl	Primer Reverse (1:10 vorverdünnt)
0,3µl	Taq-Polymerase
3µl	Template

38,7µl	H ₂ O
---------------	------------------

Tabelle 14: Reaktionsansatz PCR

Reaktionsansatz Nested-PCR

Menge	Substanz
5µl	10x Puffer
1µl	dNTPs
1µl	Primer Forward (1:10 vorverdünnt)
1µl	Primer Reverse (1:10 vorverdünnt)
0,3µl	Taq-Polymerase
1µl	Template
40,7µl	H ₂ O

Tabelle 15: Reaktionsansatz Nested-PCR

Reaktionszyklus PCR

Stufe	Temperatur	Zeit	
I.	95°C	5min	
II.	95°C	45s	30cy
	55,3°C	1min	
	72°C	45s	
III.	72°C	5min	
IV.	8°C	Aufbewahren	

Tabelle 16: Reaktionszyklus PCR

3.2.3.3 Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung

Gelelektrophorese:

Für die Elektrophorese wurde zunächst das Gel gegossen. Dieses setzt sich aus 2g Agarose und 100ml TBE-Puffer zusammen. Zusätzlich wurde dem Gel zum Färben noch 5µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Den PCR-Proben wurden in einem 5:1 Verhältnis Ladepuffer hinzugefügt. Befüllt wurden die Geltaschen anschließend mit 5µl der gemischten Probe. Bei einer Dauer von 60 Minuten und einer konstanten Spannung von 70V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA-

Fragmente. Als Größenmarker diente ein DNA-Marker der Firma Invitrogen (Carlsbad). Zur Auswertung wurden die Banden im Gel mittels UV-Licht in dem IW Genius UV-Bio Imaging System (InGenius, Ottawa) sichtbar gemacht und als TIF/JPEG Datei gespeichert.

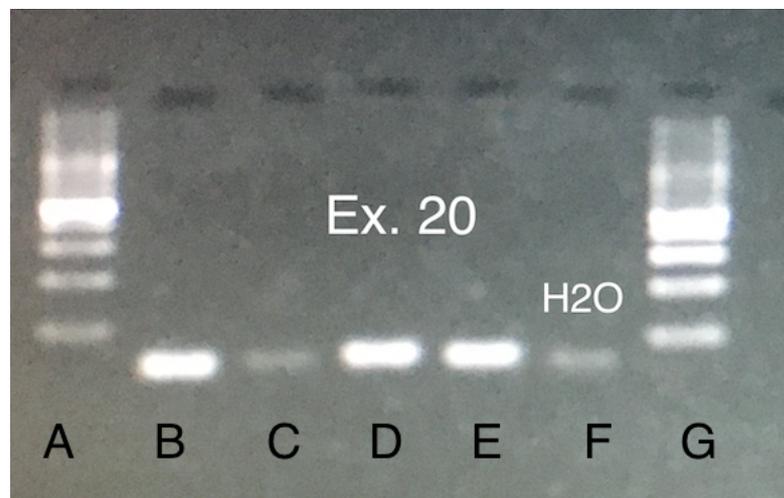


Abbildung 4: Agarose-Gelelektrophorese.
Agarosegel von amplifiziertem PIK3CA-Gen aus vier verschiedenen Tumorproben für Exon 20. A&G: DNA-Marker, B-E: Tumorproben Exon 20, F: Negativkontrolle HPLC-H₂O

Aufreinigung des PCR-Produkts:

Zur Aufreinigung der Proben wurde das „MiniElute PCR Purification“ Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Dem Ausgangsvolumen von 55µl wurden 275µl PB-Puffer hinzugefügt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und 750µl PE-Puffer hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die DNA-Fragmente, abhängig von der sichtbaren Stärke ihrer Bande im Gel, in 15µl oder 30µl EB-Puffer eluiert. Das Prinzip des Waschschriffs beruht auf der Tatsache, dass Silikat in Anwesenheit hoher chaotroper Salze die DNA bindet. In dem Kit der Firma Qiagen ist eine feste Silikat-Membran im Röhlchen. Diese Bindung kann mit einem Salz-Ethanol-Puffer wieder eluiert werden [88].

3.2.3.4 DNA-Sequenzierung

Um die DNA auf die gesuchten Mutationen zu untersuchen, wurden die amplifizierten DNA-Fragmente nach der Methode von Frederick Sanger sequenziert. Analog zur PCR durchläuft die klassische Sequenzierung mehrere Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Entscheidender Unterschied hierbei ist, dass für die Sequenzierung nur ein spezifischer Primer verwendet wird, weswegen die DNA nicht exponentiell amplifiziert, sondern lediglich um ein Vielfaches kopiert wird. Hinzu kommt, dass neben den klassischen dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) auch ddNTPs (Didesoxynukleosid-Triphosphate, auch

Terminatoren) verwendet werden, welche an der 2'- und an der 3'-Position der Ribose desoxygeniert sind und jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Diese werden deshalb von der Polymerase eingebaut, der Strang wird jedoch nicht verlängert. Das führt zum Abbruch der jeweiligen Elongation und resultiert in terminal markierten DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Die DNA-Fragmente mit einem der vier Terminatoren (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP), können durch ein automatisiertes Kapillar-Elektrophorese-Gerät mit Laser-gebundener Fluoreszenzdetektion detektiert und dann entsprechend ihrer Größe ausgelesen werden [15]. In der Praxis wurde das „BigDye Terminator v1.1“ - Kit von Applied Biosystems (Foster City) verwendet. Für den „MasterMix“ wurde der Polymerase und ddNTP-haltige Reaktionsansatz (BigDye), Sequenzierungs-Puffer, der jeweilige 1:20 vorverdünnte, exonspezifische Primer (5pmol/μl) und Wasser (HPLC-H₂O) in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Der fertige Mix wurde in die Wells einer 96 Wellplatte gegeben. Abschließend wurde noch das jeweilige DNA-Template hinzugefügt.

Reaktionsansatz Sequenzierungs-PCR

Menge	Substanz
1μl	Big Dye (2.5x)
3μl	Sequenzierungspuffer (5x)
1μl	Primer, 1:20 (5pmol/μl)
1μl	DNA-Template
14μl	HPLC-H ₂ O

Tabelle 17: Reaktionsansatz Sequenzierungs-PCR

Reaktionszyklus Sequenzierungs-PCR

Stufe	Temperatur	Zeit	
I.	96°C	1min	
II.	96°C	10s	25cy (Ramp Rate 1°C/sec oder 80%)
	50°C	5s	
	60°C	2min	
III.	4°C	Aufbewahren	

Tabelle 18: Reaktionszyklus Sequenzierungs-PCR

DNA-Fällung und elektrophoretische Sequenzanalyse:

Im Anschluss an die Sequenzierungs-PCR wurde die gesamte 96 Wellplatte zentrifugiert. Für die Fällung der DNA wurden zunächst 5µl EDTA (125mM) und 60µl Ethanol (100%) den 20µl Reaktionsansatz hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Das EDTA bildet Chelatkomplexe mit Kationen wie Mg²⁺. Dieses erfüllt mehrere Aufgaben während der PCR. Unter anderem stabilisiert es die Primer bei der Anlagerung an die Template DNA und dient als Co-Faktor bei der DNA-Polymerase [142]. So führt das EDTA zur Beendigung der Reaktion. Nach anschließender Zentrifugation und erneuter Waschung mit 60µl Ethanol (70%), wurde das Präzipitat bei Raumluft getrocknet und abschließend mit 15µl HiDi Formamide aufgefüllt. Die anschließende Auftrennung und Fluoreszenz-Detektion mittels Kapillar-Elektrophorese und CCD-Kamera erfolgte in einem 3500-Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Der Computer erstellte, durch das Erkennen der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe die zu untersuchende Basenabfolge automatisch. Dargestellt wurde die Abfolge graphisch durch basenspezifische farbige Kurven und deren Ausschläge. Die Auswertung erfolgte sowohl über das Computerprogramm „Chromas lite 2.2.1“ (Technelysium, South Brisbane) als auch über „4Peaks“ (Nucleobytes B.V., Amsterdam).

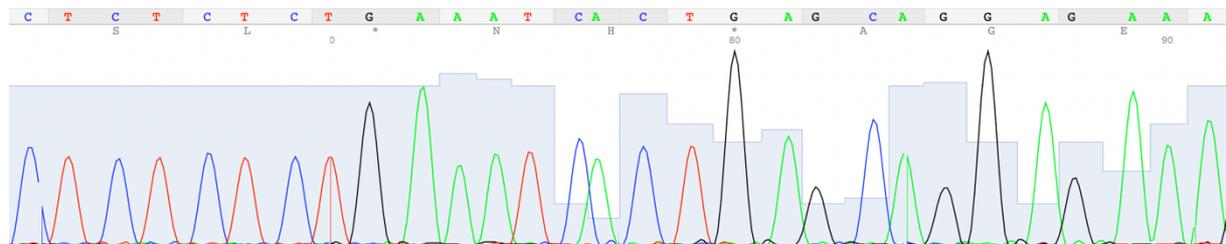


Abbildung 5: Sequenzanalyse - Probe1 Exon9 Forward - 4Peaks

3.2.3.5 Auswertung der DNA-Sequenzierung nach Sanger

Wie in 3.2.2.4 beschrieben wurde, erfolgte die Auswertung der Sequenzierung über die Computerprogramme „Chromas lite 2.2.1“ und „4Peaks“. Anhand der jeweiligen Fluoreszenzintensität wurde vom Programm ein graphisches Korrelat in Form eines farbigen Ausschlags („Peak“) erstellt. Jeder Base wurde vom Programm eine individuelle Farbe zugeordnet.

Base	Adenin	Thymin	Cytosin	Guanin
Farbe	Grün	Rot	Blau	Schwarz

Tabelle 19: Farbkodierung – Sequenzierung

Die vom Programm generierte Sequenz wurde dann mit der regulären Basenabfolge verglichen (siehe Abbildung 7). Wenn die reguläre Sequenz abgebildet und nur ein deutlicher Peak bei der jeweiligen Base zu sehen war, dann wurde die Probe als Wildtyp eingestuft. Hat sich noch ein anderer Peak bei

einer Base gezeigt, der sich deutlich von den „Background Noises“ abgehoben hat, dann wurde diese Probe als mutiert angesehen (siehe Abbildung 8).

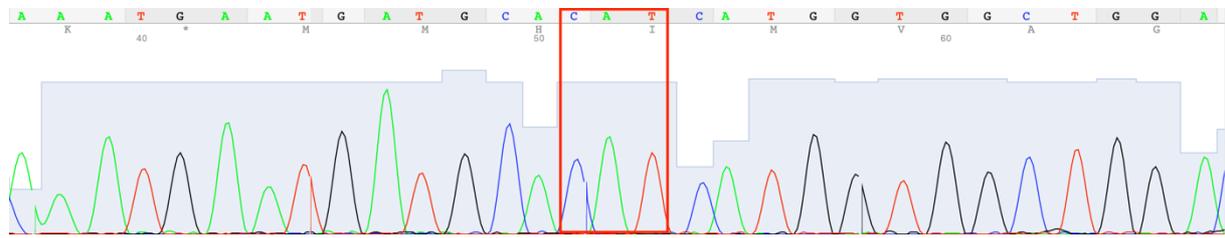


Abbildung 6: Sequenz PIK3CA Exon 20 Wildtyp

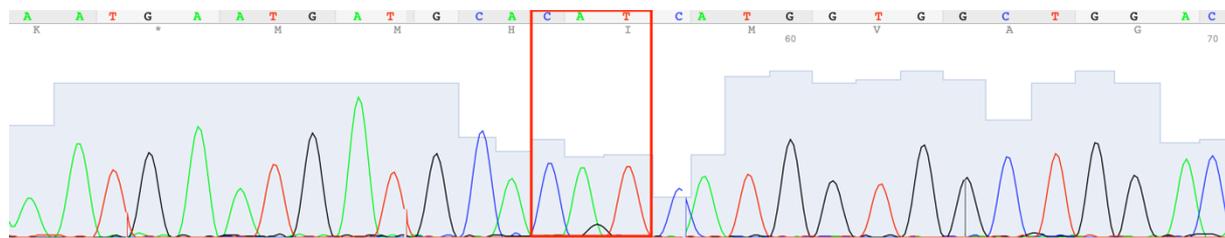


Abbildung 7: Sequenz PIK3CA Exon 20 H1047R

3.2.3.6 Quantitative Echtzeit-PCR

Grundlagen:

Die Echtzeit-PCR ist eine Methode zur Amplifikation für Nukleinsäuren, welche auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht (vgl. 3.2.3.2) und darüber hinaus die Möglichkeit der Quantifizierung bietet, ohne die Proben im Anschluss der PCR weiterzuverarbeiten. Das minimiert die Gefahr der Kontamination. Parallel dazu muss neben den zu untersuchenden Proben eine Kontrollprobe mit bekannter Konzentration für eine lineare Regression oder Proben mit definierter DNA-Kopienzahl zur Erstellung einer Standardkurve mitgeführt werden. Detektiert werden die vervielfältigten Proben mittels Fluoreszenzmessung [49,143]. Für die Detektion stehen zwei Methoden zur Verfügung, die Echtzeit-PCR mit *interkalierenden Farbstoffen* und mit *fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonden (TaqMan-Prinzip)*.

Bei den interkalierenden DNA-Farbstoffen werden beispielsweise Ethidiumbromid oder SYBR® Green I verwendet. Diese lagern sich unspezifisch in die doppelsträngige DNA ein. Bei adäquater Bestrahlung steigt die Fluoreszenz dieser Farbstoffe. Also resultiert die Zunahme der DNA-Amplifikate mit einer Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Bei der Echtzeit-PCR mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten TagMan-Sonden besteht das Prinzip darin, dass sich farblich markierte Sonden spezifisch an die DNA-Einzelstränge anlagern. Kommt es durch die Polymerase zum Abbau dieser Sonden, setzen diese ein Farbsignal frei, welches detektiert werden kann.

Amplification Refractory Mutation System (ARMS):

Eine weitere Variante der PCR ist das Prinzip des Amplifikations-Refraktär-Mutations-Systems (ARMS). Dieses wird vor allem genutzt, um Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) auf das Basenpaar genau zu detektieren. Voraussetzung dazu sind exakte Kenntnisse über die zu analysierenden Allele und möglich auftretende SNPs. Es werden zwei nahezu identische PCR-Primer entworfen, welche sich nur an ihrem Nukleotid am 3'-Ende unterscheiden. Diese unterschiedliche Base ist entweder spezifisch für das Wildtyp- oder das mutierte Allel. Außerdem wird ein neutraler Primer benötigt, welcher als Startpunkt dient. Um bei unbekannter DNA festzustellen, welches Allel vorliegt, werden zwei unterschiedliche PCR-Ansätze mit jeweils einem Allel-spezifischen und einem neutralen Primer durchgeführt. Wenn das Nukleotid am 3'-Ende des Primers komplementär zur Ziel-DNA ist, erfolgt die Bindung des Allel-spezifischen Primers und die Amplifikation beginnt. Falls der Primer nicht komplementär zu der DNA ist, erfolgt eine sehr seltene Bindung und verzögerte Amplifikation [89].

Durchführung:

Für die Mutationsdetektion mittels Quantitativer-Echtzeit-ARMS-PCR wurde das Kit *AmoyDx PIK3CA Mutation Detection Kit* der Firma Amoy Diagnostics Co. (Xiamen, China) verwendet. Hierfür wurde zunächst DNA aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Gewebe extrahiert (siehe 3.2.2.1). Eine DNA-Konzentration von 2,5-3ng/ μ L wurde angestrebt. 12,5-15ng DNA wurde pro Reaktion empfohlen. Zu Beginn wurden die aufgetauten Reagenzien invertiert und zentrifugiert. Dann wurden 12 verschiedene PIK3CA Mastermixe (1-11 sind Mutationshotspots und 12 ist die externe Kontrolle), bestehend aus dem jeweiligen Reaction Mix (u.a. mutationspezifische Primer und fluoreszenzmarkierte Sonden) und dem PIK3CA Enzyme Mix (Taq DNA-Polymerase und Uracil-N-Glycosylase) vorbereitet. Für die NTCs (No Template Control) wurden jeweils 20 μ L der 12 PIK3CA Mastermix und 5 μ L nukleasefreies Wasser vermischt und in die jeweiligen Röhren einer 96-Well-Platte pipettiert. Dann wurden für jede DNA-Probe 12 Wells mit jeweils 20 μ L von den jeweiligen PIK3CA Mastermix gefüllt und mit jeweils 5 μ L der Proben-DNA gemischt. Als letztes wurden die für die PC (Positive Control) vorgesehenen Röhren auch mit jeweils 20 μ L des dazugehörigen PIK3CA Mastermix gefüllt und mit 5 μ L der PC gemischt. Eine Plattenübersicht ist nachstehend abgebildet.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DNA-Probe											
B	PC											
C	NTC											

Tabelle 20: Quantitative-Echtzeit-PCR Plattenübersicht[4]

Die 96-Wells-Platte wurde daraufhin kurz zentrifugiert, um die gesamte Flüssigkeit am Boden der Röhren zu sammeln. Dann wurde die Platte für die Quantitative-Echtzeit-PCR in den Thermocycler QuantStudio 3 der Firma ThermoFisher platziert. Der Reaktionszyklus ist unten aufgeführt. Nachdem die PCR abgeschlossen war, konnten die Daten am Computer mit der *QuantStudio Design & Analysis* Software analysiert werden.

Stufe	Zyklen	Temperatur	Zeit	Datensammlung
I.	1	95°C	5min	
II.	15	95°C	25s	
		64°C	20s	
		72°C	20s	
III.	31	93°C	25s	FAM und HEX/VIC
		60°C	35s	
		72°C	20s	

Tabelle 21: Reaktionszyklus Quantitative Echtzeit-PCR [4]

Auswertung:

Vor der eigentlichen Auswertung der Ergebnisse, musste geprüft werden, ob der erhobene Datensatz konkrete Voraussetzungen erfüllt. So wurden die Ergebnisse auf Verlässlichkeit validiert. Zunächst musste für die NTCs jeder FAM Ct Wert der Röhren 1-11 ≥ 31 sein. Der FAM Ct Wert zeigt die Reaktion der farblich markierten Sonden, spezifisch für die jeweilige PIK3CA Mutation an. Für die PCs musste der FAM Ct Wert der Röhren 1-12 und der HEX/VIC Ct Wert der Röhren 1-11 < 20 sein. Der HEX/VIC Ct Wert zeigt die Reaktion der Sonden für die interne Kontrolle, welche zusätzlich aus Primern für einen Bereich der genomischen DNA ohne bekannte Mutationen und Polymorphismen besteht, um das Vorhandensein von Inhibitoren nachzuweisen und die Gültigkeit jedes Experiments zu bestätigen. Für die interne Kontrolle der DNA-Proben, musste der HEX/VIC Ct Wert der Röhren 1-11 < 31 liegen. Falls das nicht der Fall war, musste der FAM Ct Wert < 31 sein. Abschließend mussten noch alle externen Kontrollen (MasterMix 12) der jeweiligen DNA-Proben kontrolliert werden. Hier sollte der FAM Ct Wert zwischen 15-21 liegen. Ein Ct Wert < 15 zeigt eine DNA-Überlagerung an. Ein Ct Wert > 21 weist auf Mängel der DNA oder PCR-Inhibitoren hin. Alle Proben, die diese Vorgaben nicht erfüllt haben, waren ungültig und mussten verworfen werden.

Für die Analyse des Mutationsstatus wurden bei jeder DNA-Probe die Röhren 1-11 mit den Werten der untenstehenden Tabelle verglichen. Bei FAM Ct Werten im „optimalen Bereich“ liegt ein positiver PIK3CA Status vor. Bei FAM Ct Werten im „akzeptablen Bereich“, musste der ΔCt Wert berechnet werden, um eine Mutation zu detektieren. Der ΔCt Wert berechnete sich aus dem jeweiligen FAM Ct

Wert, subtrahiert von der externen Kontrolle der jeweiligen DNA-Probe. Falls der errechnete ΔCt Wert unter dem „ ΔCt Schwellenwert“ liegt, wurde eine positiver Mutationsstatus detektiert. Ist der errechnete ΔCt Wert \geq als der „ ΔCt Schwellenwert“, dann konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Wenn alle FAM Ct Werte der Röhren 1-11 einer DNA-Probe im „negativen Ct Bereich“ liegen, konnte in der Probe keine Mutation festgestellt werden. Der Mutationsstatus ist negativ.

Mutation Assay	H1047R	H1047L	E542K	E545K	E545D	H1047Y	E545A	E545G	Q546R	Q546E	C420R	Ergebnisse
Optimaler Ct Bereich	Ct <25	Ct <26	Ct <25	Ct <26	Ct <26	Ct <26	Ct <25	Ct <25	Ct <25	Ct <26	Ct <24	Positiv
Akzeptabler Ct Bereich	25 ≤ Ct < 28	26 ≤ Ct < 29	25 ≤ Ct < 29	26 ≤ Ct < 29	26 ≤ Ct < 29	26 ≤ Ct < 28	25 ≤ Ct < 27	25 ≤ Ct < 27	25 ≤ Ct < 27	26 ≤ Ct < 28	24 ≤ Ct < 26	Interpretation der Ergebnisse nach dem ΔCt Wert
ΔCt Schwellenwert	11	12	12	12	12	9	8	8	8	9	8	
Negativer Ct Bereich	Ct ≥ 28	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 29	Ct ≥ 28	Ct ≥ 27	Ct ≥ 27	Ct ≥ 27	Ct ≥ 28	Ct ≥ 26	Negativ oder nicht messbar

Tabelle 22: Quantitative-Echtzeit-PCR Ergebnisbestimmung [4]

3.2.3.7 Next Generation Sequencing

Grundlagen:

Das *Next Generation Sequencing (NGS)* ist eine vergleichbar kostengünstige und schnelle Methode, um exakte molekularbiologische Informationen über die DNA herauszufinden. Der Name unterstreicht die Abgrenzung gegenüber der Sanger Sequenzierung, welche als *First Generation* bezeichnet wird [79]. Aktuell ist es das modernste Verfahren zur Sequenzierung großer Mengen in kurzer Zeit. Ein gesamtes menschliches Genom kann innerhalb eines Tages sequenziert werden. Das Prinzip der NGS beruht auf vier Teilschritten: *Fragmentation, Adaption, Amplifikation* und *Datenanalyse*. Es gibt verschiedene Formen der NGS. Im Rahmen dieser Arbeit, wurde das AmpliSeq™ Panel und das iSeq100-Gerät der Firma Illumina genutzt, welche auch ein eigenes Sequenzierungsverfahren, *Illumina Sequenzierung*, entwickelt hat.

Illumina-Sequenzierung:

Alle Abbildungen dieses Abschnittes entstammen aus dem Handbuch der Firma Illumina [51].

Am Anfang steht die *Bibliotheksvorbereitung (Library preparation)*. Hier wird die DNA mechanisch fragmentiert, so dass DNA-Fragmente mit einer Länge von circa 300 Basenpaaren entstehen. Im Anschluss werden dann an beiden Enden der Fragmente Adapter ligiert. Diese Adapter haben eine komplementäre Basensequenz zu den später verwendeten Primern.

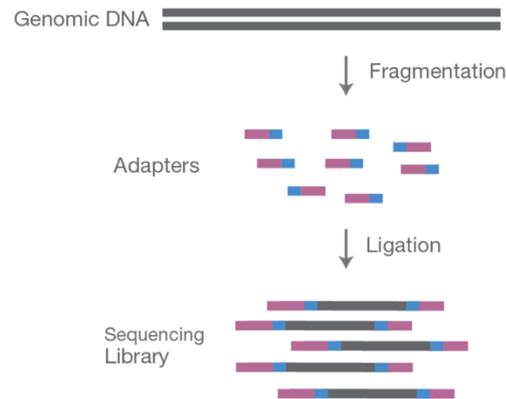


Abbildung 8: Schema der Library preparation beim NGS

Als nächstes folgt die *Clusterbildung*. Hier werden die Fragmente in zufälliger Anordnung mit ihren Adaptoren auf einer Platte gebunden. Neben den Fragmenten befinden sich auch Primer auf der Platte, welche komplementär zu den Adaptoren sind. Die DNA-Fragmente klappen sich mit dem freien Adapter zu einem Primern hin um und hybridisieren mit diesem. So bilden sie eine Brücke, weswegen dieses Verfahren auch *Brücken-PCR* genannt wird. Vom Primer aus wird mittels Polymerase ein komplementärer Strang synthetisiert. Dadurch werden zwei komplementäre Einzelstränge, ein Forward-Strang und ein Reverse-Strang, synthetisiert. Dies schafft eine weitere Möglichkeit der Kontrolle, da aufkommende Artefakte mit dem Komplementärstrang abgeglichen werden können. Durch Denaturierung werden beide Stränge wieder getrennt. Da das Signal eines einzelnen Fragments nicht detektiert werden könnte, wird die Brücken-PCR mehrfach wiederholt. Dadurch bilden sich auf der Platte verschiedene Cluster mit bis zu 1000 Kopien jeweils identischer Sequenzen.

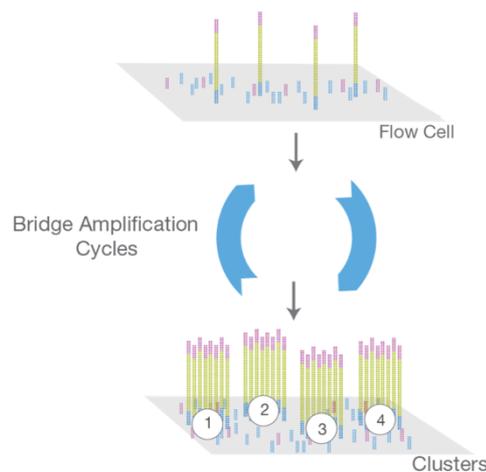


Abbildung 9: Schema der Amplifikation und Clusterbildung beim NGS

Die Sequenzierung von Illumina wird auch *Sequenzierung durch Synthese (Sequencing by Synthesis, SBS)* genannt. Es werden nun in vielen aufeinanderfolgenden Zyklen jeweils vier unterschiedlich fluoreszenz-markierte dNTPs, Primer und Polymerase hinzugegeben. Die entsprechenden Nukleotide binden an den Einzelstrang. Die Fluoreszenzmarkierung dient als Terminator, somit stoppt die Synthese. Dadurch wird pro Zyklus immer nur jeweils ein dNTP zugesetzt. Parallel werden die fluoreszenten Labels mit einem Laser angeregt. Auf der gesamten Platte leuchtet das eingebaute Nukleotid im Cluster auf. Durch eine Kamera wird das Bild gespeichert. Jedes Cluster wird vom System detektiert. Das Label wird enzymatisch abgespalten, ein neuer Zyklus startet und ein neues Nukleotid wird eingebaut. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis das gesamte Fragment synthetisiert ist.

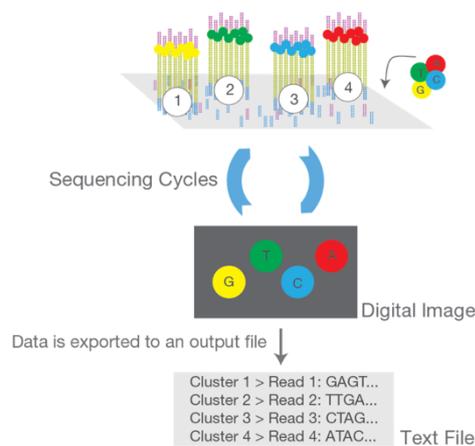


Abbildung 10: Schema der Sequenzierung beim NGS

Die erste *Datenanalyse (Primäranalyse)* wird noch im Sequenzierungsgerät durchgeführt. Hier werden automatische Base-Calls aus den Bilddateien in Echtzeit generiert. Das bedeutet, dass jedem Cluster auf der Grundlage des gemessenen Fluoreszenzsignals, eine Base (A, C, G oder T) zugeordnet wird. Im nächsten Schritt, der *Sekundäranalyse*, werden die frisch identifizierten Sequenzen an einem Referenzgenom aligniert. Abschließend wandeln weitere Programme die Sequenz in unterschiedliche Darstellungsformen und Formate um, um die DNA weiter zu analysieren und zu untersuchen.

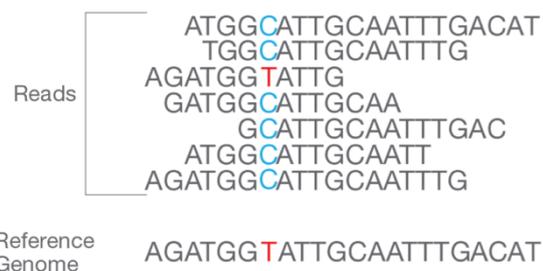


Abbildung 11: Schema der Datenanalyse beim NGS

Durchführung:

In der praktischen Durchführung wurde zunächst die DNA mittels Fluorometrie quantifiziert und auf die geeignete Konzentration mit Low TE Puffer verdünnt. Angestrebt wurde eine finale DNA-Menge von 10ng Gesamtinput. Im nächsten Schritt wurde die DNA mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde ein MasterMix, bestehend aus HiFi Mix, DNA-Panel und H₂O, angesetzt und auf eine 96-Wells-Platte pipettiert. Nach der Zugabe der DNA, wurde die Platte versiegelt, zentrifugiert und anschließend in den Thermocycler gegeben.

Reaktionsansatz PCR

Menge	Substanz
4µl	5X AmpliSeq HiFi Mix
4µl	5X AmpliSeq Focus DNA Panel
≤12µl	DNA
Um totales Volumen aufzufüllen	Nuklease-freies Wasser
20µl	Totales Volumen

Tabelle 23: Reaktionsansatz NGS PCR

Reaktionszyklus PCR

Stufe	Zyklen	Temperatur	Zeit
I.	1	99°C	2min
II.	17	99°C 60°C	15s 4min
III.		10°C	bis 24h

Tabelle 24: Reaktionszyklus NGS PCR

Im nächsten Schritt wurde das FuPa-Reagenz verwendet, um Primer Dimere und Amplikons abzubauen. Dazu wurde in jede Probe 2µl der FuPa-Reagenz hinzugegeben. Nach anschließendem Versiegeln und Zentrifugieren, wurde die Platte erneut in den Thermocycler gegeben.

Reaktionszyklus FuPa-PCR

Stufe	Zyklen	Temperatur	Zeit
I.	1	50°C	10min
II.	1	55°C	10min
III.	1	62°C	20min
IV.		10°C	bis 1h

Tabelle 25: Reaktionszyklus FuPa-PCR

Im nächsten Schritt wurden Index 1 (i7) und Index 2 (i5) Adapter an jede Probe ligiert. Indexsequenzen sind Proben-Identifikatoren, die das Pooling mehrerer Proben in einem einzigen Sequenzierungslauf ermöglichen. Die Indizes sind in einer Einwegplatte vorgemischt, um individuelle Kombinationen zu garantieren. Die aufgelisteten Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge in die Wells pipettiert. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Platte in den Thermocycler gebracht.

Reaktionsansatz Index Ligation

Menge	Substanz
4µl	Switch Solution
2µl	AmpliSeq CD Indexes
2µl	DNA Ligase
30µl	Totales Volumen (einschließlich Probe)

Tabelle 26: Reaktionsansatz Index Ligation

Reaktionszyklus Index Ligation

Stufe	Zyklen	Temperatur	Zeit
I.	1	22°C	30min
II.	1	68°C	5min
III.	1	72°C	5min
IV.		10°C	bis 24h

Tabelle 27: Reaktionszyklus Index Ligation

Als nächster Schritt wurden die Proben gewaschen. Dazu wurden unter anderem die magnetischen *Agencourt AMPure XP Beads* verwendet. Nachdem in jede Probe jeweils 30µl Beads hinzugegeben wurden, wurde die Platte auf eine magnetische Unterlage gestellt. Die mit Beads angereicherte DNA lagerte sich dadurch auf die Außenwände der Wells an. So konnte die Probe mit Ethanol gereinigt werden, ohne DNA zu verlieren. Es folgte die Amplifikation der *Library*. Dies wurde gemacht, um eine ausreichend große Menge für die Sequenzierung zu gewährleisten. Erst wurde der MasterMix aus den unten aufgeführten Reagenzien erstellt. Nachdem dieser in jedes Well pipettiert wurde, wurde die Platte nach kurzer Zentrifugation in den Thermocycler gebracht.

Reaktionsansatz Library Amplifikation

Menge	Substanz
45µl	1X Lib Amp Mix
5µl	10X Li
50µl	Totales Volumen

Tabelle 28: Reaktionsansatz Library Amplifikation

Reaktionszyklus Library Amplifikation

Stufe	Zyklen	Temperatur	Zeit
I.	1	98°C	2min
II.	7	98°C 64°C	15s 1min
III.		10°C	bis 24h

Tabelle 29: Reaktionszyklus Library Amplifikation

Anschließend folgte die zweite Reinigung der Produkte, basierend auf den magnetischen *Agencourt AMPure XP Beads*. Im ersten Schritt wird DNA mit hohem Molekulargewicht durch die Beads eingefangen und dann verworfen. Zurück bleiben Primer und Library. Nachdem diese auf eine frische Platte pipettiert wurden, wurden im nächsten Schritt die Primer ausgewaschen und die Library wird von den Beads eluiert. Im letzten Schritt wird die Library auf die Startkonzentration für die Sequenzierung verdünnt.

4 Ergebnisse

4.1 Klinisch-histopathologische Standardparameter

Zu den klinisch-histopathologischen Standardparametern wurden die Tumorhistologie, das Tumorgrading, das TNM-Stadium und die Stadiengruppe herangezogen. Im Rahmen der Auswertung der klinisch-histopathologischen Standardparameter wurde die Häufigkeit der einzelnen Ausprägungen dokumentiert.

4.1.1 Häufigkeitsverteilung der klinisch-histopathologischen Standardparameter

In Tabelle 30 sind die absoluten und relativen Häufigkeiten der jeweiligen klinischen Merkmale und histopathologischen Parameter im Hinblick auf das gesamte Patientenkollektiv wiedergegeben.

Das Patientenkollektiv für die Sequenzierung nach Sanger setzte sich aus 59 Patientinnen zusammen, deren klinisch-histopathologischen Daten dokumentiert und gemäß der achten TNM-Klassifikation aktualisiert wurden. Bei den 59 Patientinnen wurden 51 invasive Karzinome ohne speziellen Typ (invasive carcinoma of no special type, NST), ehemals „invasiv-duktales Karzinom“, diagnostiziert. Das entspricht einem Anteil von annähernd 86%. Bei sechs Patientinnen wurde ein invasiv lobuläres und bei zwei Patientinnen sowohl Anteile eines NST wie auch eines lobulären Karzinoms diagnostiziert. Die Gruppe Luminal B umfasst 15 Patientinnen. Die Gruppe Triple negativ und HER2/neu positiv sind jeweils mit 14 Patientinnen besetzt. In der Gruppe Luminal A befinden sich 16 Patientinnen. Wie in Kapitel 2.1.9 dargestellt, werden die Karzinome gemäß ihrem TNM-Stadium in UICC-Stadien (Union Internationale Contre le Cancer) eingeteilt. Knapp die Hälfte der Patientinnen konnte in Gruppe IA eingeteilt werden. Die Gruppe IIA umfasst 24,14 % der Patientinnen. Knapp 10% der Patientinnen erfüllten jeweils die Kriterien für Gruppe IIB und Gruppe IIIC.

Das Kollektiv für die Echtzeit-PCR (rt-PCR) und das Next-Generation-Sequencing (NGS) ging aus dem Kollektiv, welches oben beschrieben wurde, hervor. Die Anzahl der Patientinnen wurde reduziert und umfasste 20 Patientenproben. Davon waren 19 invasiv NST und eine invasiv lobulär. Die Hälfte der Proben wurde nach dem Grading von Elston und Ellis der Gruppe G2 zugeordnet. Die Gruppe G1 umfasste eine und die Gruppe G3 neun Proben. Die Gruppen der intrinsischen Subtypen HER2/neu positiv und Triple negativ sind jeweils mit 5 Patientinnen besetzt. In die Gruppe Luminal A wurden 7 und in die Gruppe Luminal B 3 Patientinnen aufgenommen. Knapp die Hälfte der Patientinnen (45%) konnte in UICC Gruppe IA eingeteilt werden. Die Gruppe IIA umfasst 35% der Patientinnen. Drei Patientinnen erfüllten die Kriterien für Gruppe IIIC.

Parameter	n	%	Gesamt
Geschlecht:			59
weiblich	59	100	
männlich	0	0	
Histologie:			59
Invasiv NST	51	86,4	
Invasiv lobulär	6	10,2	
Invasiv NST und lobulär	2	3,4	
Stadien Gruppierung:			58
0	0	0	
IA	26	44,8	
IB	0	0	
IIA	14	24,1	
IIB	7	12,1	
IIIA	4	6,9	
IIIB	2	3,5	
IIIC	5	8,6	
IV	0	0	
Intrinsischer Subtyp:			59
Luminal A	16	27,1	
Luminal B	15	25,4	
HER2/neu positiv	14	23,7	
Triple negativ	14	23,7	

Tabelle 30: Klinisch-histologische Parameter des Patientenkollektivs

4.2 Sequenzierung nach Sanger

4.2.1 Exon 7 und Exon 20

Da das Sequenzieren von Exon 9 aufgrund eines Pseudogens erschwert war und separat mit speziellen Primern erfolgte, werden im Folgenden zunächst die Ergebnisse von Exon 7 und 20 beschrieben. Anschließend werden die Ergebnisse von Exon 9 dargestellt.

Bei Exon 7 und Exon 20 erfolgte zunächst die Polymerasekettenreaktion und anschließende Sequenzierung mit den „Externen“ Primern (siehe 3.1.5.1). Bei jeder Sequenz, die daraufhin nicht auswertbar war, wurde die „Nested PCR“ durchgeführt. So konnte die Spezifität der Zielsequenz erhöht werden. Dafür wurde eine zweite PCR-Reaktion mit dem Produkt der ersten Reaktion und einem zweiten, innerhalb des Fragments lokalisierten, Primerpaar (vgl. 3.1.5.2) durchgeführt, mit der Intention, dass im Gegensatz zu den unspezifischen PCR-Fragmenten nur die Zielsequenz spezifisch amplifiziert wird.

4.2.1.1 Luminal A

In der Gruppe Luminal A konnte die Exon 7 Sequenz bei neun Proben durch die Externe PCR erfolgreich analysiert werden (siehe Abbildung 12). Bei sieben Patientinnen war die Nested-PCR notwendig, um das gewünschte Exon zu sequenzieren. Bei Exon 20 konnten zehn Proben durch die externen Primer sequenziert werden. Bei sechs Proben musste mit den Nested-Primern amplifiziert werden, um die Sequenz darstellen zu können.

Bei den 16 Proben konnten zwei Mutationen detektiert werden, welche sich beide auf Exon 20 befanden (Siehe Abbildung 13). Das Exon 7 war bei allen Proben ohne Mutation.

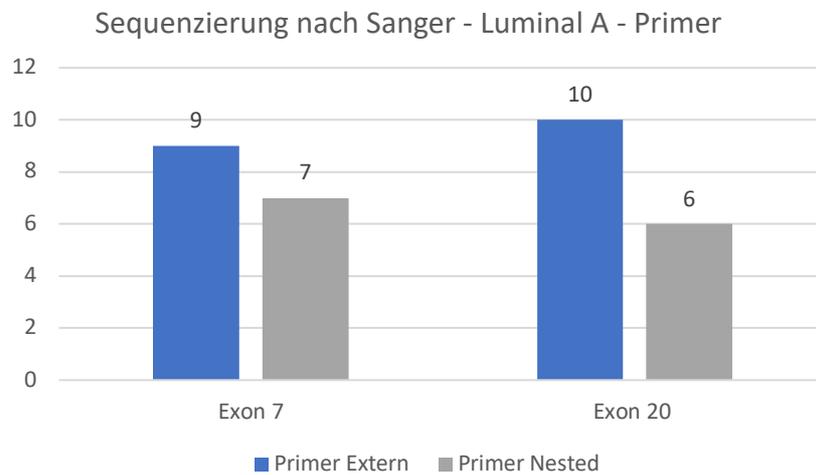


Abbildung 12: Sequenzierung nach Sanger - Luminal A - Primer

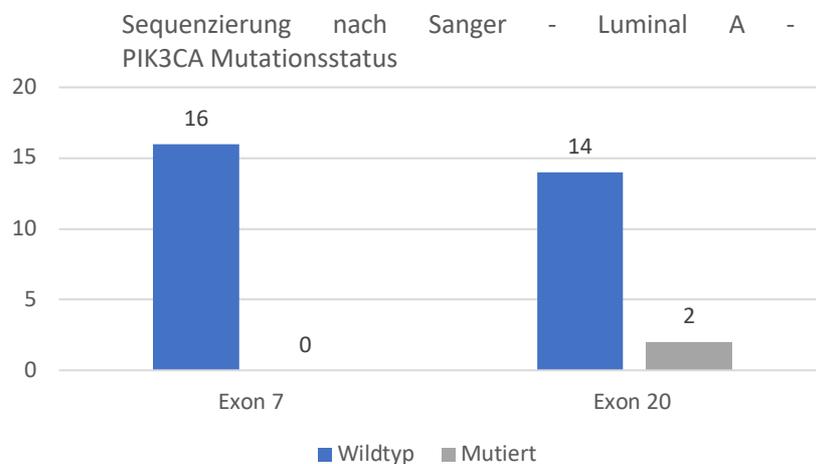


Abbildung 13: Sequenzierung nach Sanger - Luminal A - PIK3CA Mutationsstatus

4.2.1.2 Luminal B

In der Gruppe Luminal B konnte die Exon 7 Sequenz bei zehn Proben mit den externen Primern sequenziert werden. Bei fünf Patientinnen war zusätzlich die Nested-PCR notwendig, um den Zielabschnitt zu sequenzieren. Die Darstellung des Exon 20 gelang bei zwölf Patientinnen mit den externen Primern. Drei Proben konnten erst mit den Nested-Primerpaaren dargestellt werden.

Keine der 15 Proben der Gruppe Luminal B wies eine Mutation auf Exon 7 auf. Bei einer Patientin konnte eine Mutation auf Exon 20 detektiert werden (siehe Abbildung 15).

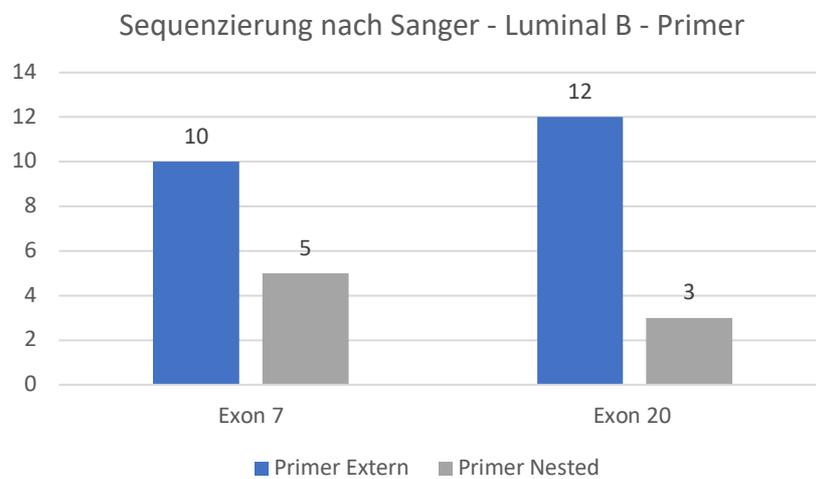


Abbildung 14: Sequenzierung nach Sanger - Luminal B - Primer

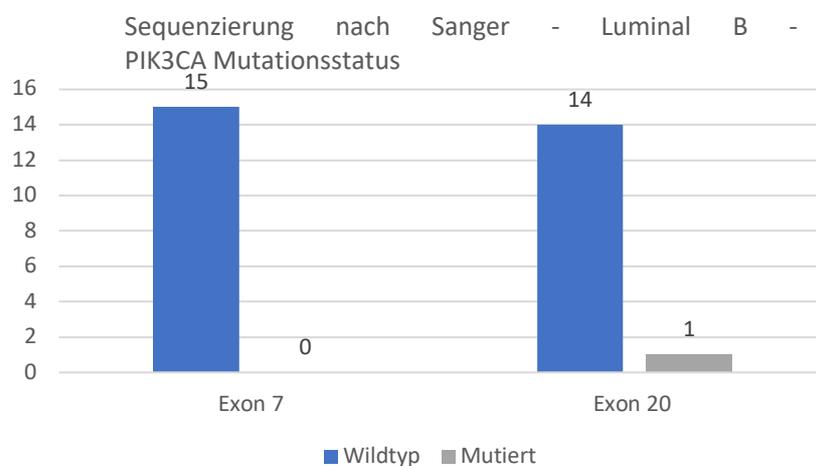


Abbildung 15: Sequenzierung nach Sanger - Luminal B – PIK3CA Mutationsstatus

4.2.1.3 Her2/neu

Die Gruppe Her2/neu bestand aus 14 Patientinnen, bei denen Her2/neu immunhistologisch positiv war. Die Sequenz auf Exon 7 konnte fünfmal mit den externen Primern erfolgreich amplifiziert und analysiert werden. Bei acht Proben wurde zusätzlich die Nested-PCR angewandt, um den Genabschnitt darzustellen. Bei einer Probe konnte mit keinem Primerpaar Exon 7 sequenziert werden. Die Sequenz auf Exon 20 konnte bei sechs Patientinnen mit den externen Primern dargestellt werden. Bei acht Proben wurden die Nested-Primer benötigt, um die Sequenz zu amplifizieren.

Das Exon 7 konnte in dieser Gruppe dreizehnmal sequenziert werden. Von diesen Proben war eine mutiert. Exon 20 war bei zwei von 14 Proben mutiert (siehe Abbildung 17).

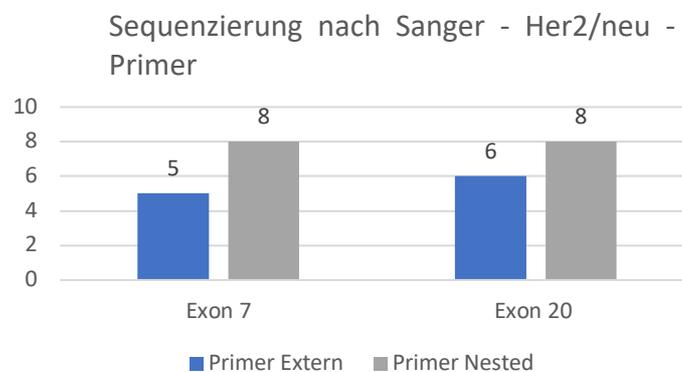


Abbildung 16: Sequenzierung nach Sanger - Her2/neu - Primer

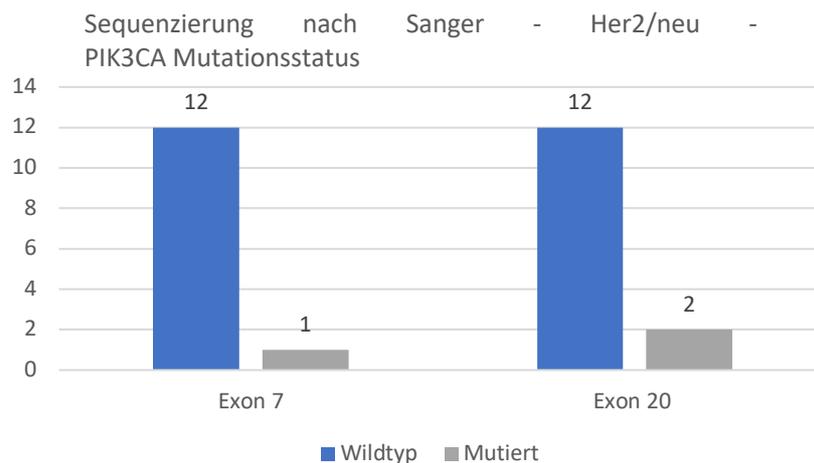


Abbildung 17: Sequenzierung nach Sanger - Her2/neu - PIK3CA Mutationsstatus

4.2.1.4 Triple negativ

Die Gruppe Triple-negativ umfasste ein Kollektiv von 14 Patientinnen. Die Exon 7-Sequenz konnte sowohl mittels externen, als auch mit den Nested Primern jeweils sieben Mal sequenziert werden. Der Exon 20 Genabschnitt konnte bei zehn Patientinnen mit der externen PCR analysiert werden. Bei vier Proben war die Nested-PCR notwendig, um die Sequenz darzustellen.

Bei den 14 Patientinnen konnte weder auf dem Exon 7 noch auf Exon 20 eine Mutation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19).

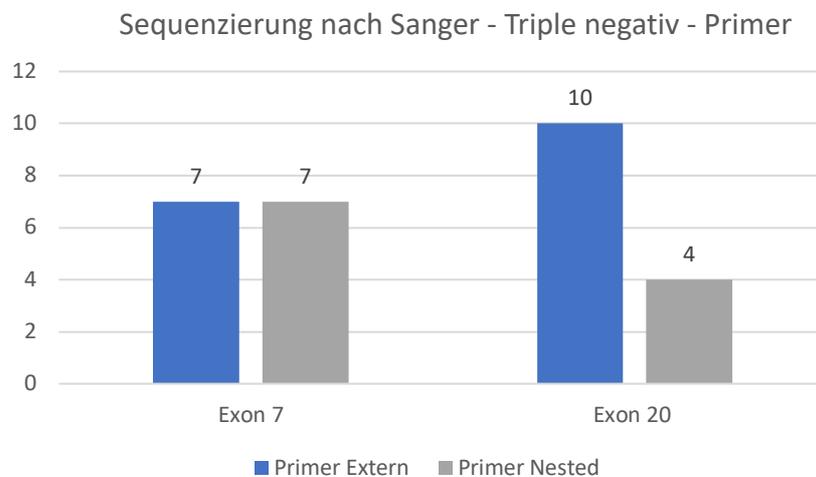


Abbildung 18: Sequenzierung nach Sanger - Triple negativ - Primer

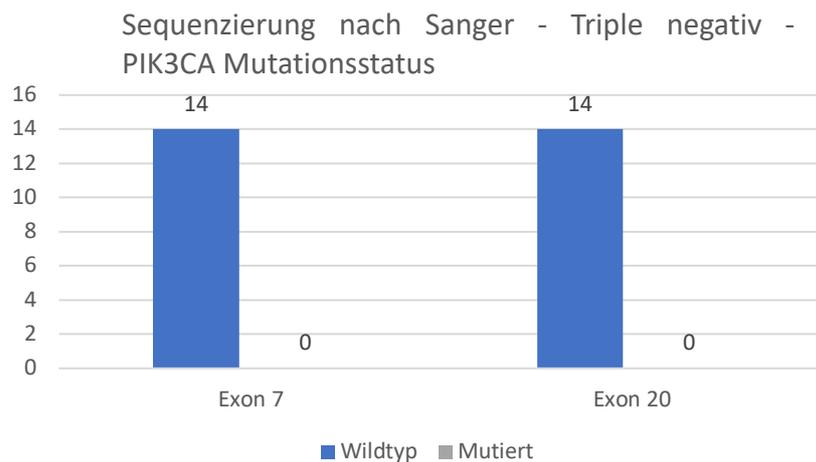


Abbildung 19: Sequenzierung nach Sanger - Triple negativ – PIK3CA Mutationsstatus

4.2.1.5 Mutationsverteilung Exon 7 und 20

Insgesamt konnten bei den 59 Patientinnen auf Exon 7 eine Mutation detektiert werden (1,7%). Eine konnte nicht sequenziert werden. Bei 57 Proben wurde der Wildtyp nachgewiesen. Fünf Mutationen konnten auf Exon 20 nachgewiesen werden (8,5%). Bei den restlichen 54 Patientinnen war keine Mutation feststellbar auf Exon 20. Insgesamt entspricht das einer Mutationsfrequenz von circa 10%.

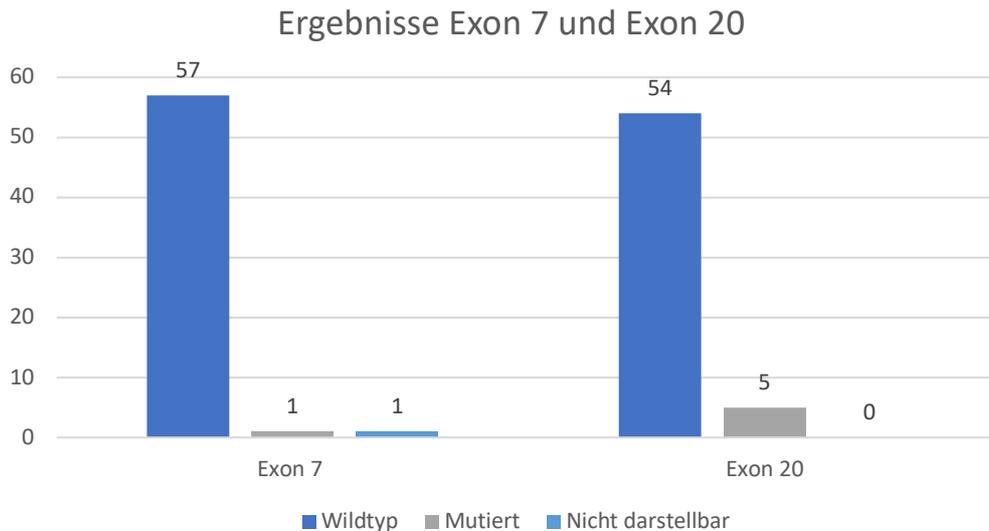


Abbildung 20: Ergebnisse Exon 7 und Exon 20

Mutationsverteilung - Exon 7 und Exon 20

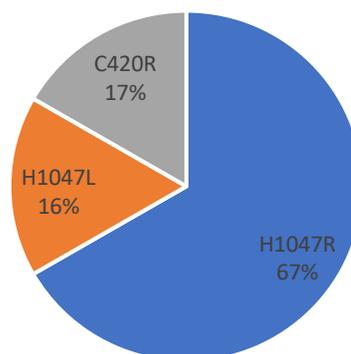


Abbildung 21: Mutationsverteilung - Exon 7 und Exon 20

Unter den sechs Mutationen wurde die Mutation H1047R auf Exon 20 viermal nachgewiesen. Das entspricht einem Anteil von 67%. Die Mutation H1047L, welche ebenfalls auf Exon 20 lokalisiert ist,

wurde einmal nachgewiesen (16,5%). Die Mutation C420R auf Exon 7 konnte ebenfalls einmal (16,5%) nachgewiesen werden.

4.2.1.6 Exon 7 und Exon 20 Mutationen und deren histopathologischen Parameter

Wie in Tabelle 31 dargestellt, waren unter den sechs mutierten Proben fünf NST-Karzinome. Eins wurde der Gruppe der invasiv lobulären zugeordnet. Bei Patientin „E52“ wurde histologisch ein NST und ein invasiv lobuläres Karzinom diagnostiziert. Bei Patientin „E35“ waren keine Informationen zum TNM und UICC-Status eruierbar. Bei den anderen fünf Patientinnen wurden zwei in die UICC Gruppe IA und drei in die Gruppe IIB zugeordnet.

Patient	Intr. Subtyp	T	N	M	UICC	Histo	ER	PRG	KI 67	HER	G	Mut.
2	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Neg.	10	Neg.	1	H1047R
E2	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Neg.	10	Neg.	2	H1047R
E29	Luminal B	2	1	X	IIB	NST	Neg.	Pos.	60	Pos.	3	H1047L
E32	HER2	2	1	X	IIB	NST	Neg.	Neg.	30	Pos.	3	H1047R
E35	HER2					Invasiv lobulär	Neg.	Neg.	15	Pos.		H1047R
E52	HER2	2	1	X	IIB	NST&invasiv lobulär	Neg.	Neg.	10	Pos.	3	C420R

Tabelle 31: Exon 7 und Exon 20 Mutationen und deren histopathologischen Parameter

4.2.2 Exon 9

Das Vorhandensein eines PIK3CA-Pseudogens auf dem Chromosom 22, das sich über die Exons 9 bis 13 erstreckt und eine Sequenzhomologie von 95% aufweist, kann die Erkennung der Mutationen in den Exons der helikalen Domäne beeinträchtigen. Die Sequenz des Pseudogens, die dem Codon 545 entspricht, ist GCG, während die Gensequenz GAG ist. Die Sequenz für Codon 542 ist für das Gen und das Pseudogen die gleiche [8]. In der Folge würde jede Sequenz auf Codon 545 als mutiert gewertet werden, da sowohl das Pseudogen, als auch die gewünschte Sequenz gleichermaßen amplifiziert werden (siehe Abbildung 22).

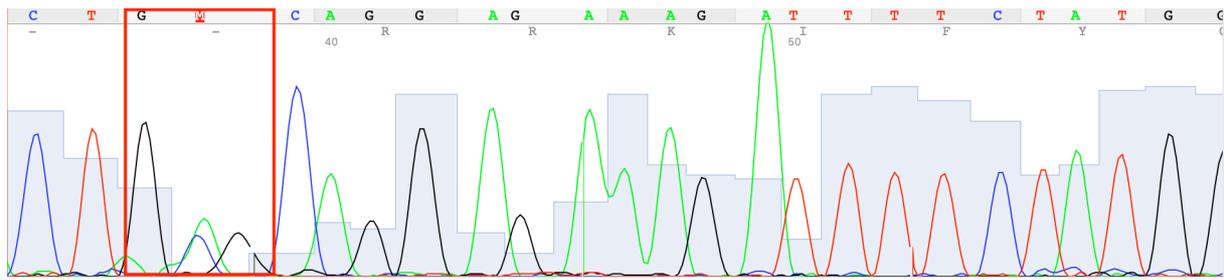


Abbildung 22: Exon 9 – Pseudogen

Aus diesem Grund wurden spezielle Primer generiert, bei denen das 3`-Ende des Reverse-Primers einen Unterschied von fünf Basenpaaren zu dem Pseudogen hat. Für die thermodynamische Stabilität und Qualität der Primer war es essenziell, dass unter der Basenabfolge ein Guanin- und Cytosin-Molekülanteil von 40-60% vorhanden ist, welcher gleichmäßig über den Primer verteilt ist.

Um die Ergebnis-Qualität zu verbessern, wurde bei den Proben, die sich nach der ersten PCR nicht auswerten ließen, eine zweite PCR mit denselben Primern angeschlossen. Bei den 59 untersuchten Proben waren 45 auch nach einer zweiten PCR nicht auswertbar. Acht Proben konnten nach der ersten PCR analysiert werden. Weitere sechs Sequenzen waren nach der zweiten Amplifikation auswertbar. Das entspricht einem grundsätzlichen Auswertungsanteil für das Exon 9 mittels Sequenzierung nach Sanger von 23,73%.

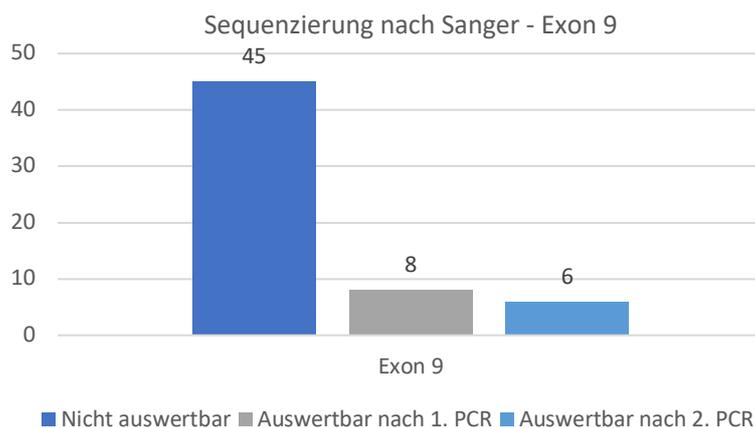


Abbildung 23: Sequenzierung nach Sanger - Exon 9

4.2.2.1 Mutationsverteilung Exon 9

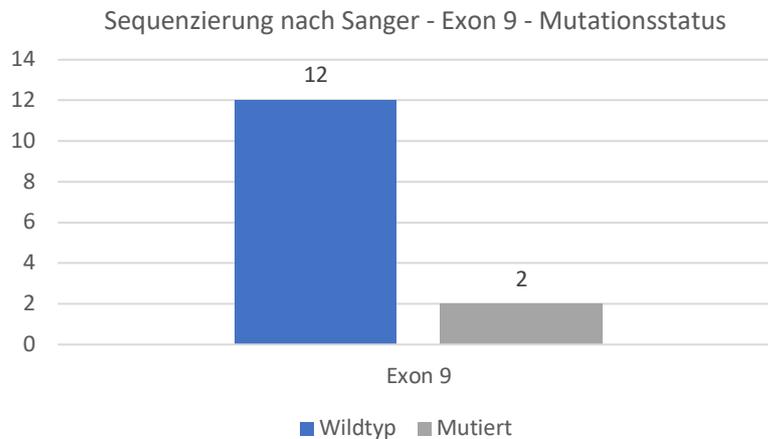


Abbildung 24: Sequenzierung nach Sanger - Exon 9 - Mutationsstatus

Unter den 14 auswertbaren Proben waren zwölf nicht mutiert. Bei zwei Proben konnte eine Mutation nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von circa 14%. Beide Mutationen waren auf dem „Pseudogen“-Codon 545. Einmal die Mutation E545G (Patientin E14) und einmal E545D (Patientin E3).

4.2.2.2 Exon 9 Mutationen und deren histopathologischen Parameter

Wie in Tabelle 32 aufgeführt, wurden beide Mutationen in die UICC-Gruppe IA zugeordnet. Histologisch handelte es sich bei beiden mutierten Proben um ein Karzinom „no special type“.

Patient	Intr. Subtyp	T	N	M	UICC	Histo	ER	PRG	KI 67	HER	G	Mut.
E3	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Pos.	10	Neg.	2	E545D
E14	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Pos.	10	Neg.	2	E545G

Tabelle 32: Exon 9 Mutationen und deren histopathologischen Parameter

4.2.2.3 HR-positiv und HER2/neu-negativ

Von den 59 Patientinnen konnten 22 zu der Gruppe HR-positiv und HER2/neu-negativ gezählt werden. Diese beinhaltet alle 16 Patientinnen aus Luminal A und sechs Patientinnen aus Luminal B. Von den 22 Patientinnen aus der Gruppe HR-positiv und HER2/neu-negativ konnte bei vier Proben eine Mutation im PIK3CA-Gen nachgewiesen werden. Das entspricht einem Anteil von circa 18%. Jeweils zwei Mutationen waren auf Exon 9 und Exon 20 nachweisbar. Die Ergebnisse sind in Tabelle 33 aufgeführt.

Patient	Intr. Subtyp	T	N	M	UICC	Histo	ER	PRG	KI 67	HER	G	Mut.
2	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Neg.	10	Neg.	1	H1047R
E2	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Neg.	10	Neg.	2	H1047R
E3	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Pos.	10	Neg.	2	E545D
E14	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Pos.	10	Neg.	2	E545G

Tabelle 33: Mutationen in der Gruppe HR-positiv und HER2/neu-negativ

4.3 Quantitative Echtzeit-PCR und Next-Generation-Sequencing

4.3.1 Ergebnisse der klinisch-histopathologischen Standardparameter

Zu den klinisch-histopathologischen Standardparametern wurden die Tumorphistologie, das Tumorgrading, das TNM-Stadium und die Stadiengruppe herangezogen. Im Rahmen der Auswertung der klinisch-histopathologischen Standardparameter wurde die Häufigkeit der einzelnen Ausprägungen dokumentiert.

4.3.2 Auswertung der Echtzeit-PCR

In 3.2.2.5 wurde der Algorithmus zur Auswertung der rt-PCR erläutert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Von den 20 Proben konnte eine nicht ausgewertet werden. Elf Proben wiesen keine Mutation auf und wurden der Gruppe Wildtyp zugeordnet. Bei acht Proben (40%) konnte eine Mutation detektiert werden.

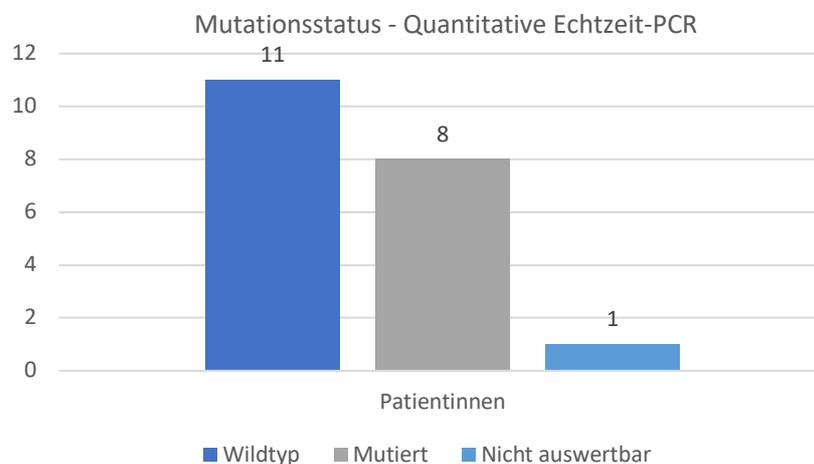


Abbildung 25: Mutationsstatus – Quantitative Echtzeit-PCR

Wie in Abbildung 26 dargestellt, konnte die Mutation „H1047R“ auf Exon 20 viermal nachgewiesen werden und machte somit 50% der Ingesamt-Mutationen aus. Die Mutation „Q546R“ auf Exon 9 wurde dreimal detektiert. Einmal konnte die Mutation „E545K“ auf Exon 9 analysiert werden. Auf Exon 7 wurde bei keiner Probe eine Mutation nachgewiesen.

Mutationsverteilung - Quantitative Echtzeit-PCR

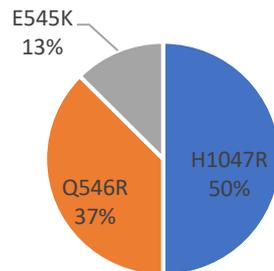


Abbildung 26: Mutationsverteilung - Quantitative Echtzeit-PCR

4.3.2.1 Echtzeit-PCR-Mutationen und deren histopathologische Parameter

In Tabelle 34 wurden die histopathologischen Parameter der mutierten Proben, welche durch die Echtzeit-PCR detektiert werden konnten, aufgeführt. Die Hälfte der Proben stammen aus der Gruppe „Luminal A“. Drei Proben gehören zu der Gruppe „HER2/neu“. Histologisch entsprechen alle Proben dem „no special type“.

Patient	Intr. Subtyp	T	N	M	UICC	Histo	ER	PRG	KI 67	HER	G	Mut.
2	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Neg.	10	Neg.	1	H1047R
E6	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Neg.	10	Neg.	2	Q546R
E14	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Pos.	10	Neg.	2	Q546R
E16	Luminal A	1c	0	X	IA	NST	Pos.	Pos.	10	Neg.	2	H1047R
E22	Luminal B	2	0	X	IIA	NST	Pos.	Neg.	30	Neg.	3	H1047R
E23	HER2	2	0	X	IIA	NST	Pos.	Neg.	30	Neg.	3	E545K

E32	HER2	2	1	X	IIB	NST	Neg.	Neg.	30	Pos.	3	H1047R
E37	HER2	2	3a	X	IIC	NST	Neg.	Neg.	30	Pos.	3	Q546R

Tabelle 34: Echtzeit-PCR-PIK3CA-Mutationen und deren histopathologischen Parameter

4.3.3 Auswertung des Next-Generation-Sequencing

Die Auswertung der NGS erfolgte automatisiert über die Software „Local Run Manager (LRM)“ der Firma Illumina. Bei elf Patientinnen (55%) konnte der Wildtyp nachgewiesen werden. 45% der Frauen waren im PIK3CA-Gen mutiert.

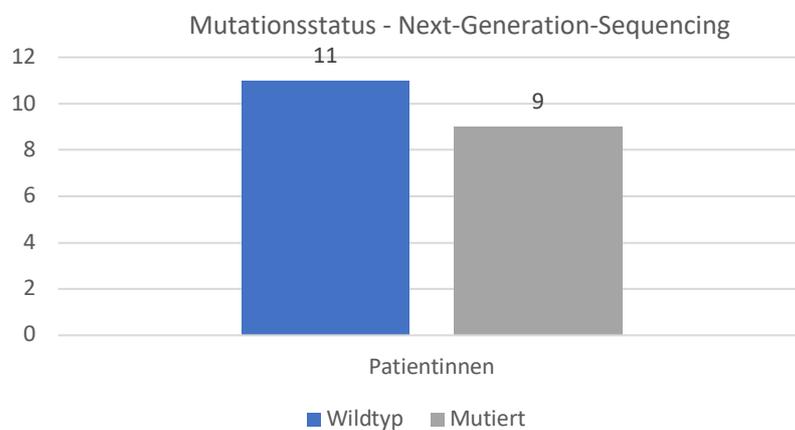


Abbildung 27: Mutationsstatus - Next-Generation-Sequencing

Mutationsverteilung - Next-Generation-Sequencing

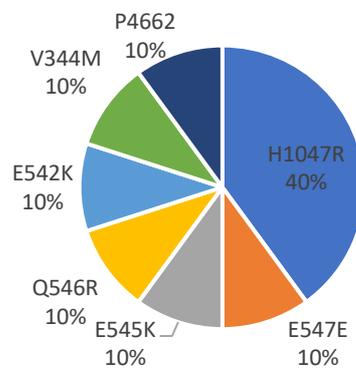


Abbildung 28: Mutationsverteilung - Next-Generation-Sequencing

Unter den neun mutierten Proben konnten bei einer Patientin zwei gleichzeitig auftretende Mutationen - „V344M“ und „P466S“ - festgestellt werden. Diese Mutationen haben Relevanz für das Gen PIK3CA und die Phosphatidylinositol-3-Kinasen [44], können aber durch die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die Sequenzierung nach Sanger und die Echtzeit-PCR nicht erfasst werden. Wie in Abbildung 29 veranschaulicht, konnten die Mutationen „E547E“, „E545K“, „Q546R“ und „E542K“, welche alle auf Exon 9 auftreten, jeweils einmal detektiert werden. Die Mutation „H1047R“ auf Exon 20 machte einen Anteil von 40% aus und konnte bei vier Patientinnen festgestellt werden.

4.3.3.1 NGS-Mutationen und deren histopathologischen Parameter

In Tabelle 35 wurden die histopathologischen Parameter, die Sequenzierungstiefe und die Allelfrequenz, die "variant allele frequency" (VAF), der mutierten Proben, welche durch das Next-Generation-Sequencing detektiert werden konnten, aufgeführt. 33% der mutierten Proben sind der Gruppe „HER2/neu“ zuzuordnen. 56% sind Hormonrezeptor-positiv. Histologisch entsprechen alle Proben dem „no special type“. Die Allelfrequenz betrug bei einer Probe mehr als 50% und bei einer weiteren knapp weniger als 50%. Bei zwei Proben betrug sie circa 25%. Für die restlichen fünf Proben befand sie sich in einem Bereich zwischen 10% bis 20%.

Patient	Intr. Subtyp	HER2	UICC	Histo	G	Mut.	VAF	Tiefe
2	Luminal A	Neg.	IA	NST	1	H1047R	25,6%	2142
E14	Luminal A	Neg.	IA	NST	2	E547E	8,5%	165
E16	Luminal A	Neg.	IA	NST	2	H1047R	19,2%	3378
E22	Luminal B	Neg.	IIA	NST	3	H1047R	61,5%	231
E23	Luminal B	Neg.	IIA	NST	3	E545K	27,6%	4728
E32	HER2	Pos.	IIB	NST	3	H1047R	47,7%	2013
E37	HER2	Pos.	IIIC	NST	3	Q546R	18,4%	2365
E45	Triple N	Neg.	IIA	NST	2	E542K	16,0%	876

E51	HER2	Pos.	IIA	NST	3	V344M, P466S	9,6% 12,7%	125 71
-----	------	------	-----	-----	---	-----------------	---------------	-----------

Tabelle 35: NGS-Mutationen und deren histopathologische Parameter

4.4 Vergleich der DNA-Analyse Verfahren

Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Verfahren miteinander verglichen. Dazu werden aus dem Patientinnen-Kollektiv für die Sequenzierung nach Sanger lediglich die Patientinnen herangezogen, welche auch mit den beiden anderen Verfahren untersucht wurden. Zur besseren Übersicht wurden die Patientinnen nachträglich von „1“ bis „20“ nummeriert. Hinter den Nummern sind in Klammern die ursprünglichen Laborbezeichnungen aufgeführt (vgl. 4.2.1.6, 4.2.2.2 und 4.2.2.3).

Patientin	Sanger	rt-PCR	NGS	Sequenzierungstiefe
1 (2)	H1047R	H1047R	H1047R	2142
2 (E6)	Wildtyp; Exon 9 nicht darstellbar	Q546R	Wildtyp	544
3	Wildtyp; Exon 9 nicht darstellbar	Nicht auswertbar	Wildtyp	151
4	Wildtyp; Exon 9 nicht darstellbar	Wildtyp	Wildtyp	100
5	Wildtyp; Exon 9 nicht darstellbar	Wildtyp	Wildtyp	275
6 (E14)	E545G	Q546R	E547E	165
7 (E16)	Wildtyp; Exon 9 nicht darstellbar	H1047R	H1047R	3378
8 (E22)	Wildtyp; Exon 9 nicht darstellbar	H1047R	H1047R	231
9 (E23)	Wildtyp	E545K	E545K	4728
10	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	540
11 (E32)	H1047R;	H1047R	H1047R	2013

	Exon 9 nicht darstellbar			
12 (E37)	Wildtyp;	Q546R	Q546R	2365
	Exon 9 nicht darstellbar			
13	Wildtyp	Wildtyp	Wildtyp	349
14	Wildtyp;	Wildtyp	Wildtyp	1185
	Exon 9 nicht darstellbar			
15	Wildtyp;	Wildtyp	Wildtyp	1235
	Exon 9 nicht darstellbar			
16	Wildtyp;	Wildtyp	Wildtyp	6849
	Exon 9 nicht darstellbar			
17 (E45)	Wildtyp	Wildtyp	E542K	876
18	Wildtyp;	Wildtyp	Wildtyp	959
	Exon 9 nicht darstellbar			
19 (E51)	Wildtyp;	Wildtyp	V344M	125
	Exon 9 nicht darstellbar		P466S	71
20	Wildtyp;	Wildtyp	Wildtyp	420
	Exon 9 nicht darstellbar			

Tabelle 36: Tabellarische Gegenüberstellung der Ergebnisse der verschiedenen DNA-Analysen

Von den 20 untersuchten Patientinnen konnte bei 14 Proben mittels Sequenzierung nach Sanger nicht das Exon 9 untersucht werden. Das entspricht einem Anteil 70%. Ansonsten konnten alle Proben mittels Sanger Sequenzierung analysiert werden. Bei der Echtzeit-PCR konnte eine Probe nicht analysiert werden. Mit der NGS konnten alle Patientinnen-Proben analysiert werden. Die Sequenzierungstiefen der untersuchten Proben sind in circa 60 % zwischen 100 und 1000, in circa 40% über 1000 und in einem Fall bei 71.

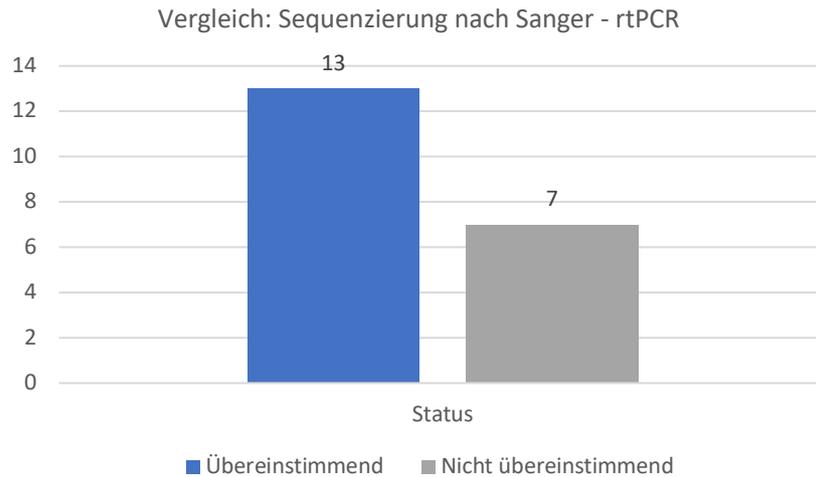


Abbildung 29: Vergleich Sequenzierung nach Sanger - rtPCR

In Abbildung 29 wurden die Ergebnisse von der Sequenzierung nach Sanger mit den Ergebnissen aus der Echtzeit-PCR verglichen. Bei 13 Proben konnte exakt derselbe Mutationsstatus festgestellt werden. Sieben Ergebnisse (35%) stimmten nicht überein.

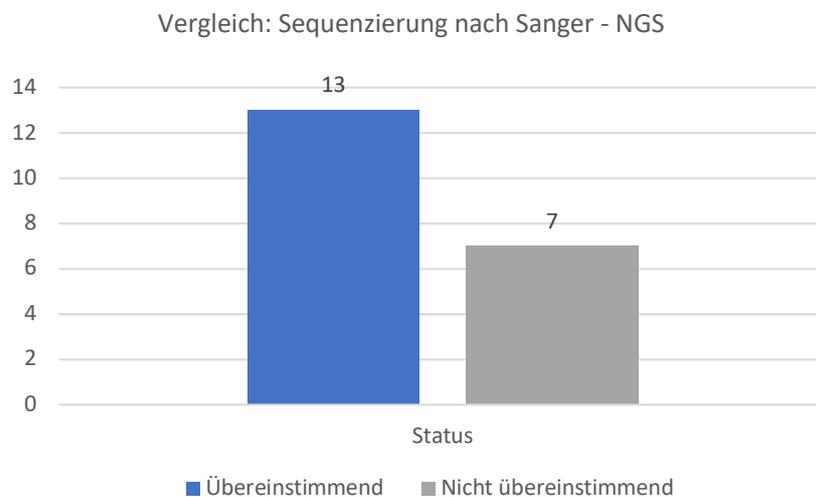


Abbildung 30: Vergleich Sequenzierung nach Sanger - NGS

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger mit denen des Next-Generation-Sequencing gegenübergestellt. Bei 13 Proben konnte exakt derselbe Mutationsstatus festgestellt werden. Bei sieben Proben stimmten die Ergebnisse nicht überein.

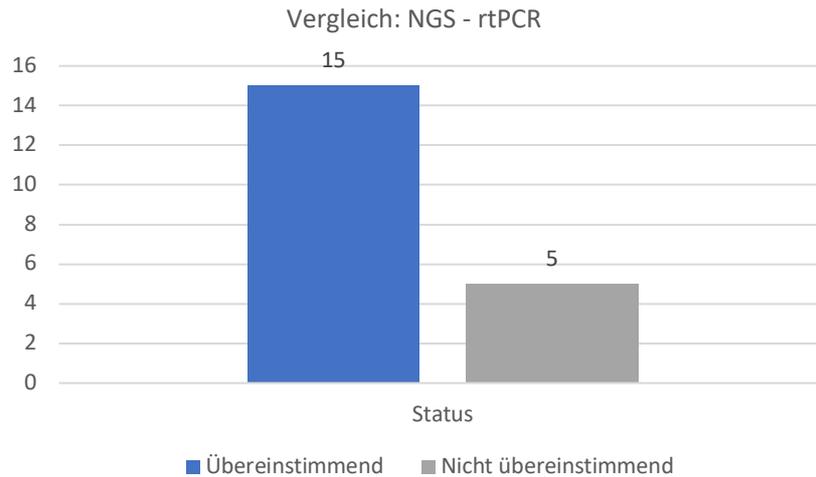


Abbildung 31: Vergleich NGS - rtPCR

Die Abbildung 31 zeigt den Vergleich der NGS und der Echtzeit-PCR. Hier stimmten 15 Ergebnisse (75%) überein. In 25 Prozent der Fälle haben die Verfahren ein unterschiedliches Ergebnis gezeigt.

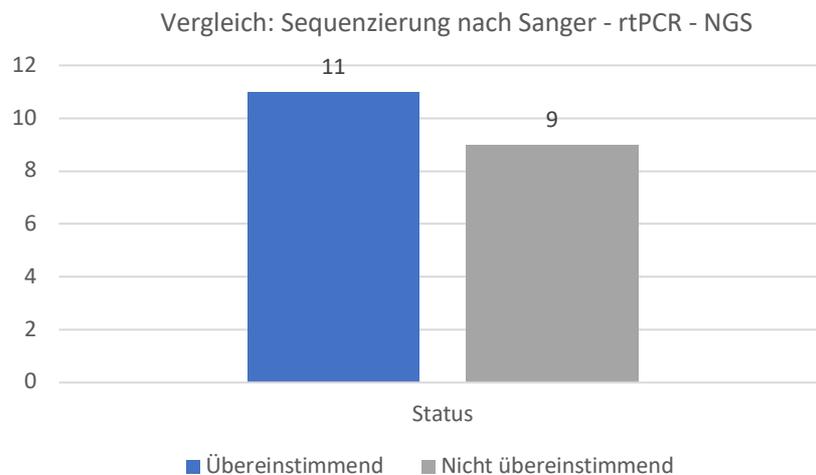


Abbildung 32: Vergleich Sequenzierung nach Sanger - rtPCR - NGS

Abbildung 32 vergleicht alle verwendeten Verfahren miteinander. Bei elf Proben (55%) wurde dasselbe Ergebnis ermittelt. Bei neun Proben (45%) ergaben die Verfahren unterschiedliche Ergebnisse.

4.4.1 Vierfeldertafel und Cohen's-Kappa

Um Aussagen unter anderem über Spezifität, Sensitivität und Präzision der Sequenzierung nach Sanger treffen zu können, wurden die Ergebnisse in der Vierfeldertafel (Tabelle 37) mit denen der NGS ins

Verhältnis gesetzt. Es wurde vorausgesetzt, dass die Ergebnisse des Next-Generation-Sequencing den tatsächlichen Mutationsstatus am exaktesten detektiert. Der positive prädiktive Wert ist bei 100%. Der negative prädiktive Wert beträgt 64,7%. Die Sensitivität der Sequenzierung nach Sanger lag in dieser Arbeit bei 33%. Die Spezifität liegt in dieser Arbeit für die Sequenzierung nach Sanger bei 100%.

		Sanger (Test)		Testgütekriterien Sequenzierung nach Sanger	
		Mutiert (positiv)	Wildtyp (Negativ)		
NGS (Kriterium)	Mutiert	3	6	Sensitivität	0,333
	Wildtyp	0	11	Spezifität	1
				Positiver prädiktiver Wert	1
				Negativer prädiktiver Wert	0,647

Tabelle 37: Vierfeldertafel und Testgütekriterien Sequenzierung nach Sanger

Die Reliabilität der Echtzeit-PCR und des NGS wurde mittels Cohen's-Kappa [128] berechnet und statistisch aufgezeigt. Es wurde der grundsätzlich ermittelten Mutationsstatus auf „Mutiert“ und „Wildtyp“ miteinander verglichen. Die Probe 3, welche in der Echtzeit-PCR nicht auszuwerten war, wurde im Reliabilitäts-Vergleich immer als nicht übereinstimmend gewertet.

Cohen's Kappa, berechnet für die *Echtzeit-PCR* und das *Next-Generation-Sequencing* auf 20 Proben (Tabelle 38) für die generelle Detektion einer Mutation, ergab einen Anteil von Kappa = 0,596 (aufgerundet 0,6) als Anteil der Übereinstimmung, die über den Zufall hinaus geht. Das entspricht nach *Altman* und *Landis und Koch* einer moderaten Reliabilität (vgl. Tabelle 39).

		NGS	
		Wildtyp	Mutiert
Echtzeit-PCR	Wildtyp	9	2
	Mutiert	2	7

Tabelle 38: Übereinstimmungsmatrizes NGS und Echtzeit-PCR in Mutation/ Wildtyp

Kappa	Landis und Koch (1977)	Altman (1991)
Ab 0,8	Fast perfekt	Sehr gut
Ab 0,6	Substanziell	Gut
Ab 0,4	Moderat	Moderat
Ab 0,2	Mäßig	Gering
0 - 0,2	Gering	Mangelhaft
< 0,00	Mangelhaft	-

Tabelle 39: Interpretation von Cohen's Kappa angepasst nach Landis und Koch [64] und Altman [3]

5 Diskussion

Seit der Zulassung von Alpelisib im Jahr 2020, steht in der Therapie des Mammakarzinoms eine neue Medikamentenklasse zur Verfügung. Alpelisib ist in Kombination mit Fulvestrant für die Behandlung postmenopausaler Frauen und Männer mit Hormonrezeptor-positivem, HER2/neu-negativem, lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs mit einer PIK3CA-Mutation nach Fortschreiten der Erkrankung, unter endokriner Therapie als Monotherapie, indiziert [137]. Voraussetzung für eine Therapie mit Alpelisib ist zusätzlich der Nachweis einer PIK3CA-Mutation aus einer Tumor- oder Plasmaprobe [137]. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass Patientinnen und Patienten für die Alpelisib klinisch eine Option darstellt, die aber bei Diagnosestellung nicht auf eine PIK3CA-Mutation untersucht wurden, nachträglich auf eine PIK3CA-Mutation untersucht werden müssen. Initial war Ziel dieser Arbeit, ausschließlich mittels Sequenzierung nach Sanger eine PIK3CA-Mutation aus über 10 Jahre altem, asserviertem Tumormaterial zu detektieren, um so die Praktikabilität dieser Methode für diesen Einsatz in der Praxis zu untersuchen. Aufgrund Schwierigkeiten, welche im Folgenden diskutiert werden, vor allem das Exon 9 zu untersuchen, wurden nachträglich noch die Real-Time PCR und das Next-Generation-Sequencing hinzugezogen. Diese werden im Folgenden miteinander verglichen und bieten die Grundlage, um eine methodische Empfehlung für die Praxis zu geben.

5.1.1 Patientenkollektiv

Das betrachtete Kollektiv (n=59) umfasste lediglich Patientinnen, welche zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme systemisch noch unbehandelt waren, also keine neoadjuvante Chemotherapie erhielten. Ein Vorteil des untersuchten Kollektivs ist, dass die vier intrinsischen Subtypen, *Luminal A*, *Luminal B*, *HER2-positiv* und *Triple-negativ*, nahezu in gleicher Größe repräsentiert sind. Dennoch muss man sagen, dass die Größe des Kollektivs im Vergleich zu Studien mit ähnlicher Fragestellung und Thematik deutlich kleiner und somit weniger aussagefähig ist. Beispielsweise wurden bei Reinhardt et al. [97] 1270 Patientenproben und bei Martínez-Sáez et al. [74] 6338 Brustkrebspatientinnen, aus zehn öffentlich zugänglichen Studien, miteinander verglichen.

Da das Kollektiv aus Patientinnen bestand, welche systemisch noch nicht therapiert wurden, ist das Tumorstadium der einzelnen Patientinnen überwiegend gering. Circa 80% sind den UICC-Stadien I-II zuzuordnen. Die restlichen 20% gehören dem UICC-Stadium III an. Insgesamt erfüllte keine der Patientinnen zum Zeitpunkt der Probenentnahmen die Kriterien für eine Therapie mit Alpelisib. Ob es daher sinnvoll ist, auf asserviertes Tumorgewebe zur Evaluation einer Therapie mit Alpelisib zurückzugreifen, wird im Folgenden diskutiert.

5.2 Sequenzierung nach Sanger

5.2.1 Exon 7 und Exon 20

Ein Vorteil dieser Arbeit ist, dass auch Mutationen auf Exon 7 untersucht wurden. Denn da bis zu 80 % der PIK3CA-Mutationen an Hotspots innerhalb der Helix- (*E542K* und *E545K*; Exon 9) und Kinase-Domänen (*H1047R*; Exon 20) von p110 α auftreten [81], konzentrieren sich viele Studien ausschließlich auf diese beiden Exons (vgl. Tabelle 6). In der SOLAR 1 – Studie, auf welcher die Alpelsib Zulassung basiert, wird aber ebenfalls das Exon 7 untersucht [101].

Insgesamt wiesen circa 10% der untersuchten Proben eine Mutation auf. Mutationen auf Exon 7 (*C420R*) traten bei 1,7% der Proben auf. Das Exon 20 war in 8,5% der Fälle mutiert. Die Mutation *H1047R* trat dabei viermal auf. Das entspricht einem Anteil von 67%. Die Mutation *H1047L* wurde einmal detektiert (16%). Bei Martínez-Sáez et al. konnte bei insgesamt 36% der Proben eine Mutation ermittelt werden. Die Arbeitsgruppe hat allerdings das gesamte Gen PIK3CA untersucht. *H1047R* machte mit 35% den größten Mutationsanteil aus. *H1047L* war bei 103 Proben mutiert. Das entspricht einem Anteil von 4%. Die Mutation auf Exon 7 *C420R* hatte eine Mutationsfrequenz von 1,9 %. Insgesamt kann man bei dem Vergleich feststellen, dass sich die Arbeiten in den Mutationstendenzen nicht widersprechen. Beide Arbeiten ermittelten den größten Mutationsanteil bei *H1047R* (Exon 20). Auch bei der Mutation *C420R* stimmen die Tendenzen überein. Die Mutation auf Exon 7 ist im Vergleich zu den anderen selten.

Für die Amplifikation der untersuchten Genomfragmente, welche durch die konventionelle PCR nicht auswertbar waren, wurde die Nested-PCR angewandt. Dazu wurde zusätzlich eine weitere Primer-Kombination verwendet (vergleiche 3.1.5.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Anwendung dieser Methode zu einem deutlich besseren Ergebnis führt. Die Sequenz auf Exon 7 konnte durch die Nested-PCR bei 27 von 58 Patientinnen noch analysiert werden. Das entspricht einem Anteil von knapp 45%. Zur Amplifikation des Exon 20 kam die verschachtelte PCR bei 21 von 59 Patientinnen zum Einsatz. Das entspricht einem Anteil von circa 36%.

5.2.2 Exon 9

Die Sequenzierung des Exon 9 ergab eine Mutationsfrequenz von knapp 14%. Also war in 14% der analysierbaren Proben eine Mutation nachweisbar. Da von den insgesamt 59 Patientinnen, auch nach der zweiten Amplifikation, nur 14 Proben auswertbar waren, ist dieses Ergebnis nur schwer in den Kontext zu setzen. Die beiden detektierten Mutationen sind *E545D* und *E545G*. Nach Martínez-Sáez et al. [74], welche eine PIK3CA-Mutationsfrequenz von insgesamt 36% nachweisen konnten, lag der Anteil der drei am häufigsten auftretenden Exon 9 Mutationen (*E545K*, *E542K* und *Q546R*) bei zusammenfassend 29,3%. Somit ist das Exon 9 von circa jeder dritten Mutation betroffen.

Zusammenfassend ist eine große Diskrepanz bezüglich Exon 9 von Martínez-Sáez et al. zu den Ergebnissen dieser Arbeit feststellbar. Die größte Schwierigkeit dieser Arbeit bestand darin, das Exon 9 korrekt zu sequenzieren. Wie in 4.2.2 aufgeführt, ist das Vorkommen des Pseudogens auf Chromosom 22 ein großer Störfaktor in der korrekten Amplifikation. Aber auch nach Modifizierung der Primerpaare gelang es lediglich bei 14 von 59 Patientinnen, das Exon 9 darzustellen. Probenqualität und Verarbeitung können als Fehlerquelle nahezu ausgeschlossen werden, da die Exons 7 und 20 aus denselben Proben und nach derselben Technik vom selben Team (siehe 3.2.1) im Labor verarbeitet wurden. Einen erheblicheren Einfluss auf die Ergebnisse hatten vermutlich die Primerpaare, welche erstellt wurden, um das Pseudogen auf Chromosom 22 zu umgehen. Zum einen war der GC-Gehalt beim Forwardprimer mit 35% zu gering. Nach Chuang et al. [22] liegt der optimale Guanin-Cytosin-Gehalt bei 40-60%. Das liegt unter anderem daran, dass GC-Bindungen thermodynamisch stabiler sind als AT-Bindungen. Zum anderen war der „Annealing“-Temperatur Gradient der beiden Primer mit 6,2 °C zu groß. Die Schmelztemperatur ist der wichtigste Wert für die erfolgreiche Durchführung einer PCR. Nach Chuang et al. liegt die optimale Schmelztemperatur eines Primerpaares zwischen 50 °C und 62 °C. Am besten funktionieren die Experimente, wenn die Schmelztemperaturdifferenz des Primerpaares nicht mehr als 5 °C beträgt. Optimalerweise beträgt die Differenz 0 °C, da die Primer im Zuge des PCR-Versuch Ablaufs in ein Röhrchen gegeben werden.

Um die Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung validieren, und Rückschlüsse auf Methodik und Aussagekraft treffen zu können, wurden in einem nächsten Schritt 20 Proben im Anschluss der Sequenzierung nach Sanger mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Next-Generation-Sequencing amplifiziert und sequenziert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei verschiedenen Methoden miteinander verglichen und Inkongruenzen und Kongruenzen diskutiert. Bei der Zusammenstellung dieses Kollektivs wurde auch darauf geachtet, dass die vier intrinsischen Untergruppen, nahezu gleichstark vertreten sind.

5.3 Quantitative Echtzeit-PCR

In der Alpelisib-Zulassungsstudie SOLAR-1 erfolgte die molekulare Testung sowohl am Tumorgewebe, als auch an Liquid Biopsies des Blutplasmas mithilfe eines Realtime-PCR basierten Assays der Firma QIAGEN (therascreen PIK3CA RGQ PCR Kit)[101,116]. Dieses Testverfahren bildet die 11 häufigsten PIK3CA-Mutationen ab [94]. Das Kit, *AmoyDx PIK3CA Mutation Detection Kit* der Firma Amoy Diagnostics Co., welches in dieser Arbeit verwendet wurde (vgl. 3.2.3.6) deckt dieselben Mutationen ab.

Bei acht Proben konnte eine Mutation auf dem PIK3CA-Gen detektiert werden. Das entspricht in dem betrachteten Kollektiv einem Anteil von 40%. Somit ist die Mutationsfrequenz im Vergleich zu den von Martínez-Sáez et al. [74] ermittelten 36% leicht erhöht, aber in der Tendenz übereinstimmend. Der

Unterschied ist vermutlich vor allem auf die Stichprobengrößendifferenz zurückzuführen. Die Mutation „H1047R“ auf Exon 20 wurde viermal nachgewiesen und machte somit 50% der Ingesamt-Mutationen aus. Die Mutation „Q546R“ auf Exon 9 wurde dreimal detektiert. Einmal konnte die Mutation „E545K“ auf Exon 9 analysiert werden. Auf Exon 7 wurde bei keiner Probe eine Mutation nachgewiesen. Auch hier stimmen die Tendenzen mit Martínez-Sáez et al. überein. Exon 20 und vor allem „H1047R“ nimmt den größten Anteil ein, das Exon 9 den zweitgrößten Anteil. Wobei auffällt, dass die in dieser Arbeit dreimal detektierte Mutation „Q546R“, die hier einen Anteil von circa 38% ausmacht, bei Martínez-Sáez et al. mit einem Mutationsanteil von 1,1% beschrieben wird. Martínez-Sáez et al. konnten vor allem „E545K“ (17,5%) und „E542K“ (10,7%) als vorrangiges Mutationsgeschehen auf Exon 9 detektieren. Grund hierfür wird vor allem die Stichprobengrößendifferenz sein, da sich bei steigenden Fallzahlen die häufigeren Mutationen statistisch durchsetzen.

Histopathologisch gehören von den detektierten Mutationen circa 63% zu den luminalen intrinsischen Typen (Luminal A & Luminal B). 37% gehören der Gruppe „HER2/neu“ zu. Auch diese Ergebnisse decken sich in der Tendenz mit denen von Martínez-Sáez et al. (vgl. 4.3.2.1)

5.4 Next-Generation-Sequencing

Durch das Next-Generation-Sequencing konnte bei neun von den 20 untersuchten Proben eine Mutation auf dem PIK3CA-Gen detektiert werden. Das entspricht einer Mutationsfrequenz von 45% und ist damit um neun Prozent höher als bei Martínez-Sáez et al. [74]. Hier ist, analog zu der Quantitativen-Echtzeit-PCR (5.2.2), der Unterschied am ehesten auf die Stichprobengrößendifferenz zurückzuführen. Denn in Studien mit kleineren Patientenkollektiven variiert die Gesamtmutationsfrequenz stark. So haben beispielsweise Sudhakar et al. [117] in ihrer Studie mit 25 Patientinnen eine Mutationsfrequenz von 20% mittels PCR detektiert. Als einziges, in dieser Arbeit verwendetes, Verfahren wurden durch das Next-Generation-Sequencing die Mutationen „V344M“ und „P466S“ festgestellt. „V344M“ kommt auf Exon 4 vor und wird unter anderem bei Haley et al. [44] als auftretende Mutation bei Kolorektalen-Karzinomen beschrieben. Auch in der Arbeit von Haley et al. wurde die Mutation mittels Next-Generation-Sequencing festgestellt. „P466S“ liegt auf Exon 8. Insgesamt finden die Mutationen „V344M“ und „P466S“ wenig Erwähnung in der Literatur. Das *American Association for Cancer Research* (AACR) hat im Rahmen ihres GENIE Projekts (Genomics, Evidence, Neoplasia, Information, Exchange) herausgefunden, dass V344M bei 0,04% aller Brustkrebspatientinnen vorkommt [1]. Die Mutation „H1047R“ auf Exon 20 machte mit 40% den größten Anteil aus. Die Mutationen auf Exon 9 „E547E“, „E545K“, „Q546R“ und „E542K“ haben jeweils einen Anteil von 10%. Im Vergleich zu Martínez-Sáez et al. decken sich diese Anteile [74]. Die Mutation „E547E“ ist eine synonyme Mutation. Shen et al. konnten in ihrer Arbeit von 2022 allerdings zeigen, dass synonyme Mutation, entgegen der etablierten Meinung, einen signifikanten Einfluss auf die Fitness der Zelle hat. Mögliche Gründe dafür sind Änderungen in der Transkriptions- oder Translationsrate sowie der mRNA-Stabilität [111].

Insgesamt konnten durch das NGS mit „V344M“, „P466S“ und „E547E“ drei „Nicht-SOLAR-1-Mutationen“ detektiert werden. Bei 10 detektierten Mutation entspricht das einem Anteil von 30%. Diese konnten also nicht in der zulassungsrelevanten SOLAR-1-Studie hinsichtlich einer Sensitivität gegenüber Alpelisib untersucht werden. Auch Strohkamp et al. diskutieren dieses Problem und weisen darauf hin, dass es weitere Daten benötigt, um die klinische Relevanz der selteneren Nicht-SOLAR-1-Mutationen besser abschätzen zu können. Sequenzierungen des gesamten PIK3CA-Gens mittels NGS können diese Daten liefern [116].

Molekularpathologisch sind 56% der mutierten Proben Hormonrezeptor-positiv. Ein Drittel der mutierten Proben stammt aus der Gruppe HER2/neu. Zu „Triple negative“ zählt eine mutierte Probe. Histologisch entsprechen alle Proben (100%) dem „No-special-type“. Das ist im Vergleich zu Martínez-Sáez et al. nicht übereinstimmend, dort machte hormonrezeptorpositiver, HER2-negativer Brustkrebs (Luminal A und Luminal B) den höchsten Anteil von PIK3CA-Mutationen aus, gefolgt von „HER2+“ und TNBC-Brustkrebs. Obwohl die Mutationen bei HER2+ und TNBC seltener vorkommen, ist der Anteil nicht zu vernachlässigen, und mehrere Studien, darunter auch klinische Zulassungsstudien wie die von Sharma et al. [110], konzentrieren sich auf diese beiden Populationen [74]. Auch hier lassen sich die Unterschiede am ehesten mit der kleineren Stichprobengröße erklären.

Die Sequenziertiefe ist ein Maß der Genauigkeit, mit der eine Variante detektiert wird, wenn sie vorhanden ist. Für diagnostisch relevante Fragestellungen wird eine Sequenziertiefe von mehr als 20 Sequenzen pro Base in 100% der analysierten Regionen gefordert (Typ-A-Qualität), sodass eine Detektionsgenauigkeit von > 99% erreicht wird [11]. In dieser Arbeit ist bei jeder Probe die Sequenzierungstiefe über 20. Somit ist hier von einem sehr sensitiven Verfahren auszugehen. Aus diesem Grund wurde das NGS in dieser Arbeit als Referenz-Verfahren zur Sequenzierung nach Sanger gewählt.

5.4.1 Variant Allele Frequency

Die Variant Allele Frequency (VAF) bei den mutierten Proben beträgt überwiegend weniger als 50%. Das schließt in den allermeisten Fällen das Vorliegen einer Keimbahnvariante aus. Bei nur einer Probe wurde ein VAF von über 50% ermittelt. Dies kann unter Berücksichtigung der Ploidie auf das Vorliegen einer Keimbahnsequenz hinweisen, ist dafür aber nicht beweisend [66]. Vielmehr ist hier vermutlich ein „loss of heterozygosity“ (LOH) die Ursache [104]. Insgesamt handelt es sich also sehr wahrscheinlich bei den Mutationen um erworbene, somatische Mutationen. Andere Arbeiten wie von Li et al. von 2006, kamen durch den Vergleich von Tumor-, und Normalgewebe ebenfalls zu dem Schluss, dass es sich bei den PIK3CA-Mutationen um somatische Mutationen handele [68]. Das Wissen, dass es sich beim Mamma-Karzinom um somatische PIK3CA-Mutationen handelt, gibt dem Zeitpunkt der Testung und dem Material aus dem getestet wird noch einmal eine höhere Relevanz (vgl. 5.7.1)

5.5 Vergleich der DNA-Analyseverfahren

Was aus der Tabelle 9 und den Ergebnissen dieser Arbeit deutlich wird, ist, dass sich die Mutationsfrequenzen für PIK3CA unter verschiedenen Arbeitsgruppen stark unterscheiden. Der Grund dafür ist vermutlich multifaktoriell. Individuelle Kohorten-Strukturen, unterschiedliche Stichprobengrößen und auch verschiedene Mutationsanalyseverfahren erschweren eine objektive Vergleichbarkeit. Daher werden Standardmethoden mit hoher Sensitivität und Spezifität benötigt, die zuverlässige und vergleichbare Ergebnisse liefern, um die prädiktive und prognostische Bedeutung von PIK3CA-Mutationen beim Mammakarzinom abschließend zu untersuchen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit drei verschiedene DNA-Analyseverfahren miteinander verglichen.

Die erste Methode zum Nachweis von PIK3CA-Mutationen war die Sanger-Sequenzierung. Vor allem bei dem Versuch, das Exon 9 zu analysieren, entstanden große Herausforderungen. Lediglich circa 25 Prozent (vgl. 4.1.5) der Proben konnten überhaupt auf eine Mutation auf Exon 9 untersucht werden. Bei den restlichen 75% war eine Auswertung nicht möglich. Die Gründe hierfür wurden in 5.2.2 diskutiert. Ruiz et al. haben in ihrer Studie von 2007 50% der in Paraffin eingebetteten Proben mittels PCR analysieren können. 100% konnten dagegen in der Gruppe mit gefrorenen Proben sequenziert werden [39]. Ruiz et al. konnten zeigen, dass die Art des Fixiermittels ein Hauptgrund für das Scheitern der PCR ist. Es ist denkbar, dass das auch in dieser Arbeit ein Grund war. Grundsätzlich ist eine Mutationsanalyse aus Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem (FFPE)-Gewebe eine Schwachstelle der Sequenzierung nach Sanger. Ming et al. beschreiben in Ihrer Arbeit eine Sensitivität von 20-50% für den Nachweis mutierter Zellen in FFPE-Gewebe. Zusätzlich ist eine subjektive Interpretation schwer zu vermeiden, wenn das Signal-Rausch-Verhältnis niedrig ist [82].

Das ARMS-Kit der Echtzeit-PCR hat viele Vorteile. Zum einen stellt es ein in sich geschlossenes System dar. Dadurch wird es resistenter gegenüber Kontaminationen. Zusätzlich geht es mit einer, im Vergleich, schnelleren Durchlaufzeit einher, welche in einigen klinischen Situationen relevant sein kann, und eine benutzerfreundliche, softwaregestützte Datenauswertung, die eine subjektive Interpretation verhindert [82].

Ihle et al. führen in Ihrer Arbeit über den Vergleich verschiedener Mutationsanalysemethoden mehrere Gesichtspunkte über das NGS auf. Die Sequenzierung der nächsten Generation ermöglicht den sensitiven und simultanen Nachweis verschiedener Mutationen in unterschiedlichen Genen in einem Multiplex-Ansatz. Auf der anderen Seite zeichnet sich die NGS durch einen hohen Arbeitsaufwand mit viel Hands-on-Zeit und hohen Kosten aus. Diese Nachteile würden nach Ihle et al. aber durch die Multiplexing-Möglichkeiten, das breite Spektrum der entdeckten Mutationen und die hohe Sensitivität kompensiert. Veröffentlichungen wie die von Ross et al. zeigen nämlich, dass fast 75% der Genvariationen von Krebserkrankungen durch einen Ansatz, der nur Hotspot-Mutationen analysiert, wie

es bei der Echtzeit-PCR der Falls ist, übersehen werden könnten [50,100]. Deshalb ist es von großem Vorteil, wenn eine gesamte Sequenz untersucht werden kann und nicht nur einzelne Hotspots fokussiert werden. Insgesamt ist aber nach Strohkamp et al. die bloße Analyse des PIK3CA-Status (ohne zusätzliche BRCA 1/2-Anforderung) mittels NGS nicht kostendeckend darstellbar [116].

Wenn dieses Verfahren in der Zukunft routiniert eingesetzt werden soll, müssen unter anderem nach Ihle et al. [50] noch einige Fragen einheitlich geklärt werden: Wo ist der Cut-off-Wert für eine zuverlässige Mutation zu definieren, welches Mutationsspektrum ist zu melden, wie werden die Ergebnisse validiert und wie werden die riesigen Datenmengen gehandhabt? Standardisierung und Validierung des Testverfahrens und der Dateninterpretation und Kostensenkung sind die Herausforderungen der Zukunft.

5.5.1 Vierfeldertafel und Cohen's-Kappa

Die Testgütekriterien der Sequenzierung nach Sanger werden in dieser Arbeit in Relation zur NGS berechnet. Die Next-Generation-Sequencing wird aufgrund ihrer hohen Sensitivität als zuverlässige Referenz genutzt. Der positive prädiktive Wert war in dieser Arbeit für die Sequenzierung nach Sanger bei 100%. Zeigte die Sequenzierung nach Sanger in dieser Arbeit einen positiven Mutationsstatus auf, lag in 100% der Fälle eine Mutation vor. Zudem ist die Spezifität der Sequenzierung nach Sanger in dieser Arbeit bei 100%. Es wurden also keine falsch-positiven Ergebnisse erzeugt. Der negative prädiktive Wert der Sequenzierung nach Sanger ist in dieser Arbeit bei 64,7%. Bei 35,3% lag eine Mutation auf dem PIK3CA-Gen vor, obwohl die Sequenzierung nach Sanger den Wildtyp detektierte. Die Sensitivität beträgt 33,3%. Lediglich jede Dritte Patientin mit PIK3CA-Mutation wird durch die Sequenzierung nach Sanger detektiert.

Um die verschiedenen Verfahren objektiv miteinander vergleichen zu können, wurde die Inter-Rater-Reliabilität berechnet. So kann verglichen werden, ob die verschiedenen Verfahren zuverlässig zu denselben Ergebnissen kommen. Cohen's Kappa ist hierbei ein Maß für die Übereinstimmung zweier Verfahren. Die Verfahren, die Ergebnisse liefern, werden hier zu den Ratern. Der Wert des Cohens-Kappas kann dann nach Tabellen von *Altman*, oder *Landis und Koch* (vgl. Tabelle 39) ausgewertet und eingeordnet werden.

Vergleicht man das Next-Generation-Sequencing mit der Echtzeit-PCR mit einem Kappa von circa 0,6, dann spricht das für eine knapp gute Reliabilität. Die beiden Verfahren kommen in einem guten und zuverlässigen Verhältnis zu demselben Ergebnis. Geht man davon aus, dass das Next-Generation-Sequencing, aus den in 5.4 und 5.5 aufgeführten Argumenten die zuverlässigste Methode von denen hier untersuchten ist, dann sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Echtzeit-PCR eine gute Alternative ist, um die SOLAR-1-Mutationen zu detektieren. Sie ist kostengünstiger und von der Durchführung her

schneller und unkomplizierter. Schaut man auf die sich unterscheidenden Ergebnisse von NGS und rt-PCR (vgl. Tabelle 38), dann fällt auf, dass sich die Ergebnisse zweimal grundlegend unterscheiden. Bei Probe 2 ermittelt die rt-PCR eine Mutation, die durch das NGS nicht bestätigt werden kann und bei Probe 17 umgekehrt. Die Unstimmigkeiten aller anderen Proben, haben andere Gründe. Probe 3 konnte beispielsweise durch die rt-PCR nicht analysiert werden. Bei Probe 6 zeigen beide Verfahren eine Mutation auf Exon 9 an, allerdings zwei verschiedene Mutationen. Bei Probe 19 detektiert das NGS die Mutationen „V344M“ und „P466S“, die mittels dem hier verwendeten KIT nicht über die Echtzeit-PCR analysiert werden können. Zusammengefasst kann man erkennen, dass die grundlegenden falschen und widersprüchlichen Detektionen sich auf zwei von 20 Proben (10%) beschränken. Berücksichtigt man diese Resultate in der Cohens-Kappa Berechnung, kommt man auf ein Ergebnis von Cohen’s Kappa, berechnet für die *Echtzeit-PCR* und das *Next-Generation-Sequencing* auf 20 Proben (Tabelle 43) für die generelle Detektion einer Mutation, von $Kappa = 0,798$ (aufgerundet 0,8) als Anteil der Übereinstimmung, die über den Zufall hinausgeht. Das entspricht nach *Altman* knapp einer sehr guten und nach *Landis und Koch* einer fast perfekten Reliabilität (vgl. Tabelle 39).

		NGS	
		Wildtyp	Mutiert
Echtzeit-PCR	Wildtyp	11	1
	Mutiert	1	7

Tabelle 40: Modifizierte und hypothetische Übereinstimmungsmatrix NGS und Echtzeit-PCR in Mutation/ Wildtyp

5.5.2 Empfehlung für die Praxis

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für eine PIK3CA-Mutationsanalyse aus Langzeit-asserviertem Tumorgewebe zunächst die Sequenzierung nach Sanger verwendet werden sollte. Falls die Sequenzierung nach Sanger den Wildtyp oder kein Ergebnis nachweist, sollte eine erneute Analyse mittels NGS stattfinden. Detektiert die Sequenzierung nach Sanger eine Mutation, ist keine weitere Analyse notwendig. Für die initiale Analyse bietet sich die Sanger Sequenzierung aufgrund der geringen Kosten an. Weitere Vorteile sind hier die schnelle Bearbeitungszeit, da die Proben einzeln angesetzt werden können und nicht für einen "großen Lauf" gesammelt werden müssen. Dieses ist insbesondere von Relevanz, wenn einzelne Proben sehr dringend auf eine PIK3CA-Mutation untersucht werden müssen, um eine Therapie mit Alpelisib zu evaluieren. Abseits der „SOLAR-1 Mutationen“ können durch die Sequenzierung nach Sanger zusätzlich noch weitere Mutationen auf dem PIK3CA-Gen amplifiziert werden, welche für die Echtzeit-PCR nicht detektierbar und für die Alpelisib-Therapie entscheidungsrelevant sind. Bei einer Spezifität von 100% ist nach positivem Mutationsnachweis keine

weitere Analyse notwendig. Da die Sensitivität bei 33,3% liegt, ist nach negativem Mutationsnachweis eine weitere Analyse mittels NGS zu empfehlen. Das NGS und die Echtzeit-PCR haben zwar eine sehr gute Reliabilität, und das NGS ist im Vergleich zur Real-Time-PCR teurer und zeitaufwendiger, ermöglicht aber bei hoher Sensitivität den gesamten Genbereich von PIK3CA abzudecken. In dieser Arbeit umfasste die Gruppe der Nicht-SOLAR-1-Mutationen 30%. Strohkamp et al. ermittelten in einer retrospektiven Auswertung von 104 Mammakarzinomen mittels NGS den PIK3CA-Status. Hier lag der Anteil der Nicht-SOLAR-1-Mutationen bei 24%[116]. Klinisch würde das ein Ausbleiben der Alpelisib-Therapie für circa ein Viertel der Patientinnen bedeuten, sollte die PIK3CA-Mutationsdiagnostik mit der RT-PCR stattfinden. Diese Problematik beschreiben beispielsweise auch Lehmann et al. und Rugo et al. [67,103].

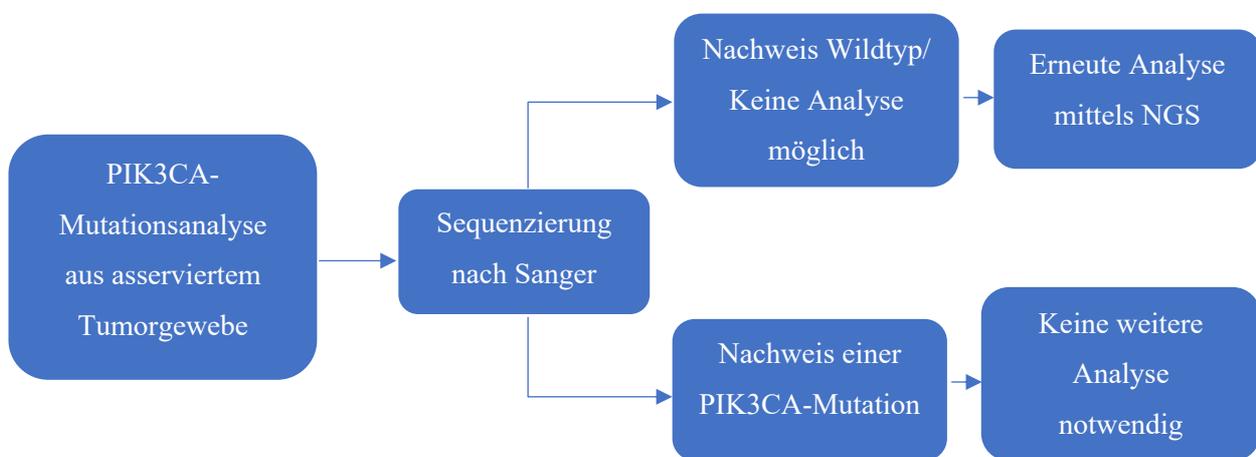


Tabelle 41: Vorgehensempfehlung zur PIK3CA-Mutationsanalyse aus Langzeit-asserviertem Tumorgewebe

5.5.3 Langzeitarchivierung

Die in dieser Arbeit untersuchten Proben sind in Formalin-fixierte und paraffin-eingebettete Gewebeproben, welche im Zeitraum von 2006 bis 2011 angefallen sind. Somit weisen die Proben Archivlagerungszeiten von 9 Jahren bis 14 Jahren auf. Die Langzeitarchivierung von FFPE-Blöcken bei Raumtemperatur ist aufgrund der Wartungs-, Platz- und Arbeitskosten kostengünstiger als beispielsweise die Lagerung von gefrorenem Gewebe bei extrem niedrigen Temperaturen und wird somit häufig zur Archivierung von Gewebeproben verwendet [62]. Es ist jedoch bekannt, dass formalinfixierte Archivproben molekularbiologische Anwendungen erschweren, da die Makromoleküle durch die Formalinfixierung irreversibel verändert werden können [76] (siehe 5.5). Zusätzlich zu der FFPE-Konservierung besteht die Möglichkeit einer potenziellen Variabilität in der Proteinzusammensetzung und -gewinnung aufgrund der Länge der Lagerungszeiträume [9]. Kokkat et al. konnten allerdings in ihrer Arbeit von 2013 zeigen, dass bei FFPE-Gewebe welches bis zu 12 Jahren langzeitarchiviert wurde, die DNA quantitativ und qualitativ mit der DNA vergleichbar ist, die aus FFPE-Blöcken mit einer Lagerdauer von weniger als einem Jahr extrahiert wurde [62]. Auch in dieser

Arbeit konnten mittels NGS alle, und mittels RT-PCR nahezu alle langzeitarchivierten Proben ausgewertet werden. Die Schwierigkeiten bei der Auswertung der Proben mittels Sanger-Sequenzierung sind daher am ehesten nicht hauptsächlich auf die Langzeitarchivierung an sich zurückzuführen (vgl. 5.5 und 5.2.2) und eine PIK3CA-Testung ist aus langzeitarchiviertem Tumorgewebe grundsätzlich praktikabel. Nichtsdestotrotz sollte bei einer Testung auf eine PIK3CA-Mutation auf eine möglichst aktuelle Biopsie zurückgegriffen werden, da es zu einer metachronen PIK3CA Mutation, und als Konsequenz zu einer ausbleibenden Therapie mit Alpelisib kommen kann (vgl. 5.7.1).

5.6 PIK3CA

5.6.1 Die prognostische Aussagekraft von PIK3CA

Durch Arbeiten wie Kang et al. [60] und Samuels et al. [106] aus den Jahren 2005 und 2004 kann es als bewiesen gelten, dass eine Mutation in den Hotspots als Onkogen fungiert. Darüber hinaus postulieren Samuels et al. 2010, dass PIK3CA eines der am häufigsten mutierten Onkogene bei menschlichen Krebserkrankungen ist [107]. Als Folge der Mutation steigt die Aktivität der Lipidkinase und des PI3K-Signalwegs. In der Konsequenz begünstigt eine Mutation das Zellwachstum. Interessanterweise wurden aber in der Arbeit von Reinhardt et al. [97] die höchsten Häufigkeiten von PIK3CA-Genmutationen in Tumoren mit günstigeren Prognosemerkmalen festgestellt. Dazu zählen niedrigere Gradings nach Elston & Ellis (G1 und G2), Östrogen- und Progesteronrezeptor-Positivität, Wachstumsfaktor (HER2/neu)-Negativität und eine intrinsische Zuordnung in die luminalen Gruppen. Bei Tumoren mit hoher Risikobiologie (HER2-positive und Triple-negative Karzinome) ermittelten sowohl Reinhardt et al., als auch Martínez-Sáez et al. [74] die niedrigsten Raten an PIK3CA-Mutationen. Campbell et al. [17] erklären diesen Zusammenhang dadurch, dass die von der PIK3CA-Mutation abhängige Aktivierung von AKT den Östrogenrezeptor östrogen-unabhängig phosphoryliert und aktiviert, was zu einer Estradiol-unabhängigen Transkriptionsaktivität des Östrogenrezeptors und in der Folge zu einem bevorzugten Wachstum von ER-positivem Krebs führt. Daher fördern mutierte PI3K wahrscheinlich das ER-positive Krebswachstum und könnten die Überrepräsentation von PIK3CA-mutierten Tumoren bei luminalem und gut differenziertem Brustkrebs erklären [97]. Nach Ellis et. al [34] sind ungefähr 70 % der Brustkrebsfälle Hormonrezeptor-positiv. Das lässt sich in dieser Arbeit nicht überprüfen, da das Patientenkollektiv gleiche Anteile der intrinsischen Subtypen aufwies.

Bezüglich der prognostischen Aussagekraft von Mutationen im PIK3CA-Gen unterscheiden sich die Erkenntnisse verschiedener Arbeitsgruppen. Die Arbeitsgruppe um Dumont et al. [32] fand in ihrer Studie aus 2012, nach Auswertung von 2587 Brustkrebsfällen, dass Patientinnen mit PIK3C-mutierten Tumoren ein besseres klinisches Ergebnis haben als solche mit einem PIK3CA-Wildtyp. Sobhani et al. dagegen ermittelten 2018 in einer Meta-Analyse von klinischen Studien mit 1929 Patientinnen einen negativen Einfluss einer PIK3CA-Mutation auf die Prognose [112]. Reinhardt et al. konnten in ihrer Arbeit aus 2022 gar keinen Zusammenhang zwischen einer Mutation und dem rezidivfreien Intervall

oder dem Gesamtüberleben ermitteln, erklären sich aber diese Divergenz durch die Heterogenität der untersuchten Populationen in Bezug auf Stichprobengröße, Untergruppen und Art der Behandlung. Daher können Selektionsverzerrungen in diesen Analysen nicht ausgeschlossen werden [97].

5.6.2 Die prädiktive Aussagekraft von PIK3CA

Die prädiktive Aussagekraft von PIK3CA ist ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt. Es werden noch weitere Studien benötigt, um eindeutige Aussagen über beispielsweise PIK3CA-mutierten Hormonrezeptor-positiven Brustkrebs und die Wirkung von Aromatasehemmern und Tamoxifen zu treffen [97]. Stemke-Hale et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen einer PIK3CA-Mutation und der Wirkung von adjuvantem Tamoxifen [115]. Beelen et al. beschreiben in ihrer Arbeit von 2014 dafür sogar eine Tamoxifen-Resistenz [12]. Im Kontrast dazu kommen Kalinski et al. zu dem Ergebnis, dass eine Mutation im PIK3CA Gen sogar die endokrine Sensitivität erhöht, was in der Folge die kompetitive Hemmung durch Tamoxifen begünstigen würde. Grundsätzlich sind diese molekularphysiologischen Mechanismen noch nicht vollständig und ausreichend geklärt. Reinhardt et al. führen die Estradiol-unabhängigen Transkriptionsaktivität des Östrogenrezeptors als möglich relevanten Mechanismus für die Wirkung von Aromatase-Inhibitoren und Tamoxifen auf die luminalen Karzinome an. Sie verweisen aber auch darauf, dass noch zahlreiche andere Mechanismen für diese Wechselwirkungen in Betracht gezogen werden müssen [97]. So gibt es beispielsweise Hinweise darauf, dass Veränderungen im PI3K-Signalweg auf die Zusammensetzung des Tumormikroumfelds bei luminalem Brustkrebs, einschließlich der Anziehung von CD8-positiven T-Zellen, wirken [113].

Bei Patienten mit HER2-positivem Brustkrebs ist der Effekt von einer PIK3CA-Mutation ebenso unklar. Reinhardt et al. beschreiben ihn als klein und nicht signifikant [97]. Bei Patientinnen mit triple-negativem metastasiertem Brustkrebs wirkt sich eine PIK3CA-Mutation positiv auf das Gesamtüberleben aus. Zu diesem Ergebnis kamen Mosele et al. in 2020 [85].

5.6.3 Prognostische Aussagekraft von Exon 9 und 20

Es existieren Studien, die entgegen der ursprünglichen Meinung, die Exon 9- und Exon 20-Hotspot-PIK3CA-Mutationen seien gleichermaßen „gain-of-function“ und transformierende Mutationen [134], Unterschiede bei den für die PI3K-Aktivierung erforderlichen Proteinpartnern und ein unterschiedliches tumorigenes Potenzial in Tiermodellen zwischen Exon 9- und Exon 20-Mutationen festgestellt haben [87,135]. Nach Mukohara et al. hat eine Exon 20 Mutation eine insgesamt bessere Prognose als eine Exon 9 Mutation [87]. Barbareschi et al. fanden 2007 heraus, dass im Vergleich zu Exon 20, eine Mutation auf Exon 9 mit frühen Rezidiven und Tod assoziiert ist [10]. Auch Terán et al. unterstützen diese Beobachtung [119]. Darüber hinaus ergab eine weitere Studie, dass sich die Patientenmerkmale (Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, Menopausenstatus, histologisches Grading und

Lymphknotenstatus) aufgrund der Lage der Mutation nicht unterscheiden. Die Studie kam aber auch zu dem Ergebnis, dass auf Exon 9 mutierte Mammakarzinome eher zu Rezidiven neigen [2]. Loi et al. beschreiben diese Tendenz ebenfalls, ermitteln dafür aber keine statistische Signifikanz [70].

5.7 Alpelisib

5.7.1 SOLAR-1-Studie

Die SOLAR-1-Studie bildete die Grundlage für die Zulassung von Alpelisib. In der praktischen Mutationsanalyse ergaben sich vereinzelte Fragestellungen, welche nicht vollumfassend von der Studie adressiert werden. Grundsätzlich blieb offen, wann der richtige Zeitpunkt für eine Testung ist und aus welchem Material eine Testung auf eine PIK3CA-Mutation stattfinden soll. In der SOLAR-1-Studie wurden bei 92% der Patientinnen und Patienten, analog zu dieser Arbeit, der Mutationsstatus aus Paraffin-eingebettetem Tumorgewebe bestimmt. Bei 8% wurden frische Biopsien entnommen [101]. Da es sich bei der PIK3CA-Mutation um eine somatische Mutation handelt, besteht die theoretische Möglichkeit einer Mutation nach Biopsieentnahme. Verlängert sich die Zeitspanne zwischen Biopsieentnahme und Evaluation einer Alpelisib-Therapie steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer metachronen PIK3CA-Mutation. Somit steigt auch das Risiko einer unerkannten PIK3CA-Mutation und als Konsequenz einer ausbleibenden Therapie mit Alpelisib. Dies ist vor allem der Fall bei Langzeit-asserviertem Tumorgewebe. Die Zulassung von Alpelisib beinhaltet die "liquid biopsy" als Analyse-Möglichkeit. In der SOLAR-1-Studie konnte nachgewiesen werden, dass verglichen mit solidem Tumorgewebe der Nachweis einer PIK3CA-Mutation im Blutplasma als ein besserer Prädiktor für das progressionsfreie Überleben gilt [136]. Nach Strohkamp et al. sollte aber die Untersuchung des Tumorgewebes nach Möglichkeit einer "liquid biopsy" vorgezogen werden, da sich durch die mikroskopische Quantifizierung des prozentualen Anteils der Tumorzellen im Gewebe ein falsch-negatives Ergebnis, wie es als "Restrisiko" bei der "liquid biopsy" besteht, nahezu ausschließen lässt [116]. Es bleibt also unklar, wie mit den "liquid biopsies" zukünftig umzugehen ist. Es benötigt klare Richtlinien und Handlungsempfehlungen, um die Vergleichbarkeit zu erhöhen und Grauzonen zu minimieren. Darüber hinaus benötigt es voraussichtlich noch eingehendere Studien, um dieses grundsätzlich elegante "liquid biopsy" Verfahren in der Zukunft fest im klinischen Alltag zu etablieren [118], auch vor dem Hintergrund der stetigen Weiterentwicklung dieses Verfahrens. Martínez-Rodríguez et al. beschreiben beispielsweise extrazelluläre Vesikel-DNA (EV-DNA) als wertvollen Biomarker neben ctDNA (circulating Tumor DNA), der das Verständnis verschiedener Analyte in der „liquid biopsy“ bereichert und Strategien in der Präzisionsonkologie für das Hormonrezeptor-positive Her2/neu-negative fortgeschrittene oder metastasierte Mammakarzinom unterstützt [73].

5.7.2 Marktrücknahme Alpelisib

In Kombination mit Fulvestrant erhielt Alpelisib im Juli 2020 von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) die Zulassung zur Behandlung von postmenopausalen Patientinnen und von männlichen Patienten mit Hormonrezeptor (HR)-positivem, HER2-negativem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom mit Nachweis einer PIK3CA-Mutation und nach Versagen der antihormonellen Therapie. Die Firma NOVARTIS hat im April 2021 angekündigt Alpelisib vom deutschen Markt zu nehmen. Grund seien gescheiterte Preisverhandlungen mit den Krankenkassen. 2020 habe das Medikament über 70.000 Euro jährlich gekostet. Alpelisib ist weiterhin in der EU zugelassen, muss aber aus dem Ausland importiert werden [144]. Dies bedeutet für die Patientinnen in Deutschland einen erheblichen Mehraufwand und erhöhten Leidensdruck, dadurch, dass trotz der Zulassung ein Kostenübernahmeantrag bei der Krankenkasse vor Therapiebeginn gestellt werden muss.

5.7.3 BYLieve-Studie

Die seit dem Jahre 2017 etablierte BYLieve-Studie baut auf die SOLAR-1-Studie auf. SOLAR-1 konzentrierte sich auf Patientinnen, deren Krankheit nach Abschluss oder während einer adjuvanten endokrinen Therapie wieder auftrat. Die Studie wurde abgeschlossen, bevor die Behandlung mit CDK4/6-Inhibitoren als Standardtherapie in der Erstlinienbehandlung eingeführt wurde. Die Phase-2-Studie BYLieve untersucht die Sicherheit und Wirksamkeit von Alpelisib in Kombination mit Letrozol oder Fulvestrant bei Patientinnen mit PIK3CA-mutiertem, Hormonrezeptor-positivem, HER2-negativem fortgeschrittenem Brustkrebs, die unter oder nach einer früheren Therapie, einschließlich eines CDK4/6-Hemmers, eine Progression erlitten haben. BYLieve zeigt, dass Alpelisib plus Fulvestrant eine adäquate Behandlungsoption mit überschaubarer Verträglichkeit für Patientinnen mit Hormonrezeptor-positivem, HER2-negativem, PIK3CA-mutiertem fortgeschrittenem Brustkrebs in der Post-CDK4/6-Inhibitor-plus-Aromatase-Inhibitor-Situation ist. Die in BYLieve beobachteten verbesserten Sicherheitsergebnisse belegen, dass eine frühere CDK4/6-Inhibitor-Exposition das Sicherheitsprofil von Alpelisib plus Fulvestrant wahrscheinlich nicht beeinträchtigt und dass unerwünschte Ereignisse mit den derzeitigen Leitlinien im Allgemeinen beherrschbar sind [102].

5.7.4 PIK3CA als “target of therapy” – PI3K-Inhibitoren

Mehrere PI3K-Inhibitoren sind aktuell schon von der amerikanischen „Food and Drug Administration“ (FDA) für verschieden Krebsarten zugelassen worden. Darunter Alpelisib, Idelalisib und Copanlisib [55]. Idelalisib wird bei der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt. Copanlisib kommt bei der Therapie des follikulären Lymphoms zum Einsatz. Je nach den anvisierten Isoformen von PI3Ks der Klasse IA lassen sich PI3K-Inhibitoren in *Pan-PI3K-Inhibitoren* wie Buparlisib (BKM120) und Pictilisib (GDC-0941), *Isoformspezifische* PI3K-Inhibitoren wie Taselisib (GDC-0032) und Alpelisib

(BYL719) und *Duale PI3K/mTOR-Inhibitoren* wie BEZ235 einteilen. Nach den bisherigen Ergebnissen klinischer Studien weisen diese isoformspezifischen PI3K-Inhibitoren im Vergleich zu den Pan-PI3K-Inhibitoren eine bessere Verträglichkeit und eine höhere Wirksamkeit gegen Krebs auf. (Krop et al., 2016; Baselga et al., 2017; André et al., 2019). Aus diesem Grund werden in Zukunft weitere spezifische PI3K-Inhibitoren erwartet [30].

Wirkungsklasse	Substanz
Pan-PI3K Inhibitoren	Buparlisib
	XL-147
	PX-866
	PKI-587
	Pictilisib (GDC-0941)
p110-Isoformspezifische Inhibitoren	Wortmannin
	LY294002
	Alpelisib
	Taselisib (GDC-0032)
	INK-1117
Duale PI3K/mTOR-Inhibitoren	Idelalisib (CAL-101)
	BEZ235
	BGT226
	PF-4691502
	GDC-0980
	XL-765

Tabelle 42: Übersicht der Inhibitoren des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges modifiziert nach Lux et al. [71]

6 Literaturverzeichnis

1. AACR Project GENIE Consortium (2017) AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov* 7:818-831 PMID: 28572459 DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0151
2. Abramson VG, Lloyd MC, 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 PMID: 24722917 DOI: 10.1007/s10549-014-2945-3
3. Altman DG (1990) *Practical Statistics for Medical Research* <https://doi.org/10.1201/9780429258589>. Chapman & Hall/CRC
4. Amoy Diagnostics Co., Ltd. (2020) AmoyDx PIK3CA Mutation Detection Kit; Instruction for Use.
5. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, Iwata H, Conte P, Mayer IA, Kaufman B, Yamashita T, Lu Y-S, Inoue K, Takahashi M, Pápai Z, Longin A-S, Mills D, Wilke C, Hirawat S, Juric D (2019) Alpelisib for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 380:1929-1940 PMID: 31091374 DOI: 10.1056/NEJMoa1813904
6. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, Rubovszky G, Yamashita T, Kaufman B, Lu Y-S, Inoue K, Pápai Z, Takahashi M, Ghaznawi F, Mills D, Kaper M, Miller M, Conte PF, Iwata H, Rugo HS (2021) Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 32:208-217 PMID: 33246021 DOI: 10.1016/j.annonc.2020.11.011
7. Arthur LM, Turnbull AK, Renshaw L, Keys J, Thomas JS, Wilson TR, Lackner MR, Sims AH, Dixon JM (2014) Changes in PIK3CA mutation status are not associated with recurrence, metastatic disease or progression in endocrine-treated breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 147:211-219 DOI: 10.1007/s10549-014-3080-x
8. Baker CL, Vaughn CP, Samowitz WS (2012) A PIK3CA Pyrosequencing-Based Assay that excludes Pseudogene Interference. *The Journal of Molecular Diagnostics* Vol. 14, No. 1:
9. Balgley BM, Guo T, Zhao K, Fang X, Tavassoli FA, Lee CS (2009) Evaluation of Archival Time on Shotgun Proteomics of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *J Proteome Res* 8:917-925 DOI: 10.1021/pr800503u
10. 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. *Clin Cancer Res* 13:6064-6069 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0266
11. Baumgartner-Parzer S (2022) NGS (next generation sequencing) oder die gute alte Sanger-Sequenzierung? – Was ist zu beachten? *J Für Klin Endokrinol Stoffwechs* 15:145-151 DOI: 10.1007/s41969-022-00180-1
12. Beelen K, Opdam M, Severson TM, Koornstra RHT, Vincent AD, Wesseling J, Muris JJ, Berns EMJJ, Vermorcken JB, van Diest PJ, Linn SC (2014) Phosphorylated p-70S6K predicts tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients randomized between adjuvant

tamoxifen versus no systemic treatment. *Breast Cancer Res BCR* 16:R6 PMID: 24447434 DOI: 10.1186/bcr3598

13. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68:394-424 DOI: 10.3322/caac.21492
14. Brierley J, Gospodarowicz M, Wittekind CH *TNM classification of malignant tumours*. Eight edition. ed. 2017, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
15. Brown TA (2002) *Sequencing Genomes*. Oxford: Wiley-Liss URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21117/>
16. 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 DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80595-4
17. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 276:9817-9824 PMID: 11139588 DOI: 10.1074/jbc.M010840200
18. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F (2001) PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 20:6050-6059 PMID: 11689445 DOI: 10.1093/emboj/20.21.6050
19. Cauley JA, Lucas FL, Kuller LH, Stone K, Browner W, Cummings SR (1999) Elevated serum estradiol and testosterone concentrations are associated with a high risk for breast cancer. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Ann Intern Med* 130:270-277 PMID: 10068384 DOI: 10.7326/0003-4819-130-4_part_1-199902160-00004
20. Ch. Wittekind, H.-J. Meyer, Herausgeber (2010) *TNM-Klassifikation maligner Tumore*.
21. Chalhoub N, Baker SJ (2009) PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. *Annu Rev Pathol* 4:127-150 PMID: 18767981 DOI: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311
22. Chuang L-Y, Cheng Y-H, Yang C-H (2013) Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett* 35:1541-1549 PMID: 23794048 DOI: 10.1007/s10529-013-1249-8
23. Cizkova M, Dujaric M-E, Lehmann-Che J, Scott V, Tembo O, Asselain B, Pierga J-Y, Marty M, de Cremoux P, Spyrtos F, Bieche I (2013) Outcome impact of PIK3CA mutations in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab. *Br J Cancer* 108:1807-1809 DOI: 10.1038/bjc.2013.164
24. Clarke M, Collins R, Darby S, Davies C, Elphinstone P, Evans V, Godwin J, Gray R, Hicks C, James S, MacKinnon E, McGale P, McHugh T, Peto R, Taylor C, Wang Y, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005) Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet Lond Engl* 366:2087-2106 PMID: 16360786 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67887-7
25. Cosimo SD, Baselga J (2009) Phosphoinositide 3-Kinase Mutations in Breast Cancer: A "Good" Activating Mutation? *Clin Cancer Res* 15:5017-5019 PMID: 19671849 DOI: 10.1158/1078-

0432.CCR-09–1173

26. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA (2010) The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *J Clin Oncol* 28:1075-1083 PMID: 20085938 DOI: 10.1200/JCO.2009.25.3641
27. 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 PMID: 8524413 10.1038/378785a0
28. Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J (1999) Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem J* 337:575-583 PMID: 9895304
29. Dirican E, Akkiprik M, Özer A (2016) Mutation distributions and clinical correlations of PIK3CA gene mutations in breast cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 37:7033-7045 PMID: 26921096 DOI: 10.1007/s13277-016-4924–2
30. Dong C, Wu J, Chen Y, Nie J, Chen C (2021) Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. *Front Pharmacol* 12:628690 PMID: 33790792 DOI: 10.3389/fphar.2021.628690
31. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF (2011) Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI J Natl Cancer Inst* 103:1656-1664 DOI: 10.1093/jnci/djr393
32. 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 PMID: 22640628 DOI: 10.5732/cjc.012.10032
33. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005) Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet Lond Engl* 365:1687-1717 PMID: 15894097 DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66544–0
34. Ellis H, Ma CX (2019) PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Curr Oncol Rep* 21:110 DOI: 10.1007/s11912-019-0846–7
35. Elston C w., Ellis I o. (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 DOI: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
36. 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 10.1038/nrg1879
37. Fritsch R, Downward J RAS and RHO Families of GTPases Directly Regulate Distinct Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0092867413005060?token=693A86C167FE28EBFE72473C8A0FB1ADF2424DF6F45C18ED57B570C34974FAED1DC451C0DF4779032C3A00AD29497223&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220210144000> DOI: 10.1016/j.cell.2013.04.031
38. Fruman DA, Rommel C (2014) PI3K and Cancer: Lessons, Challenges and Opportunities. *Nat*

Rev Drug Discov 13:140-156 PMID: 24481312 DOI: 10.1038/nrd4204

39. Gallegos Ruiz MI, Floor K, Rijmen F, Grünberg K, Rodriguez JA, Giaccone G (2007) EGFR and K-ras mutation analysis in non-small cell lung cancer: comparison of paraffin embedded versus frozen specimens. *Cell Oncol Off J Int Soc Cell Oncol* 29:257-264 PMID: 17452778 DOI: 10.1155/2007/568205
40. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20 DOI: E10.1002/ijc.2910310104
41. Graff JR, Konicek BW, McNulty AM, Wang Z, Houck K, Allen S, Paul JD, Hbairu A, Goode RG, Sandusky GE, Vessella RL, Neubauer BL (2000) Increased AKT Activity Contributes to Prostate Cancer Progression by Dramatically Accelerating Prostate Tumor Growth and Diminishing p27Kip1 Expression*. *J Biol Chem* 275:24500-24505 DOI: 10.1074/jbc.M003145200
42. Group) E (Early BCTC (2014) Effect of radiotherapy after mastectomy and axillary surgery on 10-year recurrence and 20-year breast cancer mortality: meta-analysis of individual patient data for 8135 women in 22 randomised trials. *The Lancet* 383:2127-2135 PMID: 24656685 DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60488-8
43. Guo H, German P, Bai S, Barnes S, Guo W, Qi X, Lou H, Liang J, Jonasch E, Mills GB, Ding Z (2015) The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *J Genet Genomics* 42:343-353 DOI: 10.1016/j.jgg.2015.03.003
44. Haley L, Tseng L-H, Zheng G, Dudley J, Anderson DA, Azad NS, Gocke CD, Eshleman JR, Lin M-T (2015) Performance characteristics of next-generation sequencing in clinical mutation detection of colorectal cancers. *Mod Pathol* 28:1390-1399 DOI: 10.1038/modpathol.2015.86
45. Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FCG, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC (2010) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 28:2784-2795 PMID: 20404251 DOI: 10.1200/JCO.2009.25.6529
46. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC (1999) Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 17:1474-1481 PMID: 10334533 DOI: 10.1200/JCO.1999.17.5.1474
47. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 4:988-1004 PMID: 16341064 DOI: 10.1038/nrd1902
48. 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
49. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* 11:1026-1030 DOI: 10.1038/nbt0993-1026
50. Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, Tietze L, Schildhaus

- H-U, Büttner R, Merkelbach-Bruse S (2014) Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* 14:13 PMID: 24410877 DOI: 10.1186/1471-2407-14-13
51. Illumina, Inc. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology.
52. Incurvati JA, Shah S, Mu Y, Lu J (2013) Targeted therapy for HER2 positive breast cancer. *J Hematol Oncol* 6:38 DOI: 10.1186/1756-8722-6-38
53. Jabbour E, Ottmann OG, Deininger M, Hochhaus A (2014) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in hematologic malignancies. *Haematologica* 99:7-18 PMID: 24425689 DOI: 10.3324/haematol.2013.087171
54. Janku F, Wheler JJ, Westin SN, Moulder SL, Naing A, Tsimberidou AM, Fu S, Falchook GS, Hong DS, Garrido-Laguna I, Luthra R, Lee JJ, Lu KH, Kurzrock R (2012) PI3K/AKT/mTOR Inhibitors in Patients With Breast and Gynecologic Malignancies Harboring PIK3CA Mutations. *J Clin Oncol* 30:777-782 PMID: 22271473 DOI: 10.1200/JCO.2011.36.1196
55. Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F (2018) Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol* 15:273-291 PMID: 29508857 DOI: 10.1038/nrclinonc.2018.28
56. Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, Zhang J, Signoretti S, Loda M, Roberts TM, Zhao JJ (2008) Essential roles of PI(3)K-p110 β in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* 454:776-779 DOI:10.1038/nature07091
57. Joensuu H, Isola J, Lundin M, Salminen T, Holli K, Kataja V, Pylkkänen L, Turpeenniemi-Hujanen T, von Smitten K, 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
58. 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. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 15:5049-5059 PMID: 19671852 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0632
59. 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. *Clin Cancer Res* 15:5049-5059 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0632
60. Kang S, Bader AG, Vogt PK (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci* 102:802-807 DOI: 10.1073/pnas.0408864102
61. Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B (2009) Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* 34:115-127 DOI: 10.1016/j.tibs.2009.01.003
62. Kokkat TJ, Patel MS, McGarvey D, LiVolsi VA, Baloch ZW (2013) Archived Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Blocks: A Valuable Underexploited Resource for Extraction of DNA, RNA, and Protein. *Biopreservation Biobanking* 11:101-106 DOI: 10.1089/bio.2012.0052
63. Krasilnikov MA (2000) Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochem Biokhimiia* 65:59-67 PMID: 10702641

64. Landis JR, Koch GG (1977) The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33:159-174 DOI: 10.2307/2529310
65. 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
66. Lehmann U, Stenzinger A (2022) Das molekularpathologische Brevier: Allelfrequenzen in der NGS-Analytik. *Pathol* 43:154-156 DOI: 10.1007/s00292-021-01003-x
67. Lehmann U, Stenzinger A (2023) [The biomarker PIK3CA in tumor pathology]. *Pathol Heidelberg Ger* 44:259-260 PMID: 36932239 DOI: 10.1007/s00292-023-01190-9
68. Li SY, Rong M, Grieu F, Iacopetta B (2006) PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome. *Breast Cancer Res Treat* 96:91-95 PMID: 16317585 DOI: 10.1007/s10549-005-9048-0
69. Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ (2009) Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8:627-644 DOI: 10.1038/nrd2926
70. Loi S, Michiels S, Lambrechts D, Fumagalli D, Claes B, Kellokumpu-Lehtinen P-L, Bono P, Kataja V, Piccart MJ, Joensuu H, Sotiriou C (2013) Somatic Mutation Profiling and Associations With Prognosis and Trastuzumab Benefit in Early Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst* 105:960-967 PMID: 23739063 DOI: 10.1093/jnci/djt121
71. Lux MP, Fasching PA, Schrauder MG, Hein A, Jud SM, Rauh C, Beckmann MW (2016) The PI3K Pathway: Background and Treatment Approaches. *Breast Care* 11:398-404 PMID: 28228706 DOI: 10.1159/000453133
72. Mandelker D, Gabelli SB, Schmidt-Kittler O, Zhu J, Cheong I, Huang C-H, 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* 106:16996-17001 DOI: 10.1073/pnas.0908444106
73. Martínez-Rodríguez A, Fuentes-Antrás J, Lorca V, López de Sá A, Pérez-Segura P, Moreno F, García-Sáenz JA, García-Barberán V (2024) Molecular Profiling of Endocrine Resistance in HR+/HER2-Metastatic Breast Cancer: Insights from Extracellular Vesicles-Derived DNA and ctDNA in Liquid Biopsies. *Int J Mol Sci* 25:13045 PMID: 39684756 DOI: 10.3390/ijms252313045
74. Martínez-Sáez O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, Sanfeliu E, Schettini F, Conte B, Brasó-Maristany F, Rodríguez A, Martínez D, Galván P, Rodríguez AB, Martínez A, Muñoz M, Prat A (2020) Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 22:45 PMID: 32404150 DOI: 10.1186/s13058-020-01284-9
75. Martini M, De Santis MC, Braccini L, Gulluni F, Hirsch E (2014) PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Ann Med* 46:372-383 PMID: 24897931 DOI: 10.3109/07853890.2014.912836
76. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K (1999) Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res* 27:4436-4443
77. Matlac DM, Krawczyk N, Hanker L, Rody A, Banys-Paluchowski M (2021) Alpelisib in der Therapie des metastasierten PIK3CA-mutierten Mammakarzinoms: finale Auswertung des Gesamtüberlebens in der SOLAR-1-Studie. *Onkol* 27:936-940 DOI: 10.1007/s00761-021-00999-4

78. Mayo LD, Donner DB (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11598-11603 PMID: 11504915 DOI: 10.1073/pnas.181181198
79. Metzker ML (2010) Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* 11:31-46 DOI: 10.1038/nrg2626
80. Miled N, Yan Y, Hon W-C, 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
81. Miller TW, Balko JM, Arteaga CL (2011) Phosphatidylinositol 3-Kinase and Antiestrogen Resistance in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 29:4452-4461 PMID: 22010023 DOI: 10.1200/JCO.2010.34.4879
82. Ming Z, Jiang D, Hu Q, Li X, Huang J, Xu Y, Liu Y, Xu C, Hua X, Hou Y (2014) Diagnostic application of PIK3CA mutation analysis in Chinese esophageal cancer patients. *Diagn Pathol* 9:153 PMID: 25106743 DOI:10.1186/s13000-014-0153-4
83. Moran MS, Schnitt SJ, Giuliano AE, Harris JR, Khan SA, Horton J, Klimberg S, Chavez-MacGregor M, Freedman G, Houssami N, Johnson PL, Morrow M (2014) SSO-ASTRO Consensus Guideline on Margins for Breast-Conserving Surgery with Whole Breast Irradiation in Stage I and II Invasive Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 88:553-564 PMID: 24521674 DOI: 10.1016/j.ijrobp.2013.11.012
84. Mørch Lina S., Skovlund Charlotte W., Hannaford Philip C., Iversen Lisa, Fielding Shona, Lidegaard Øjvind (2017) Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer. *N Engl J Med* 377:2228-2239 DOI: 10.1056/NEJMoa1700732
85. Mosele F, Stefanovska B, Lusque A, Tran Dien A, Garberis I, Droin N, Le Tourneau C, Sablin M-P, Lacroix L, Enrico D, Miran I, Jovelet C, Bièche I, Soria J-C, Bertucci F, Bonnefoi H, Campone M, Dalenc F, Bachelot T, Jacquet A, Jimenez M, André F (2020) Outcome and molecular landscape of patients with PIK3CA-mutated metastatic breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 31:377-386 PMID: 32067679 DOI: 10.1016/j.annonc.2019.11.006
86. Moskowitz CS, Chou JF, Wolden SL, Bernstein JL, Malhotra J, Friedman DN, Mubdi NZ, Leisenring WM, Stovall M, Hammond S, Smith SA, Henderson TO, Boice JD, Hudson MM, Diller LR, Bhatia S, Kenney LB, Neglia JP, Begg CB, Robison LL, Oeffinger KC (2014) Breast Cancer After Chest Radiation Therapy for Childhood Cancer. *J Clin Oncol* 32:2217-2223 PMID: 24752044 DOI: 10.1200/JCO.2013.54.4601
87. Mukohara T (2015) PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer Targets Ther* 7:111-123 PMID: 26028978 DOI: 10.2147/BCTT.S60696
88. Mülhardt C (2013) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg DOI: 10.1007/978-3-642-34636-1
89. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17:2503-2516 PMID: 2785681
90. Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S, Hanna WM (2012) Cancer Care Ontario Guideline Recommendations for Hormone Receptor Testing in Breast Cancer. *Clin Oncol* 24:684-696 DOI: 10.1016/j.clon.2012.04.005

91. Phillips J, Domingo E (2018) PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology URL: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_PIK3CA.html
92. Pogue-Geile KL, Song N, Jeong J-H, Gavin PG, Kim S-R, Blackmon NL, Finnigan M, Rastogi P, Fehrenbacher L, Mamounas EP, Swain SM, Wickerham DL, Geyer CE, Costantino JP, Wolmark N, Paik S (2015) Intrinsic subtypes, PIK3CA mutation, and the degree of benefit from adjuvant trastuzumab in the NSABP B-31 trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 33:1340-1347 PMID: 25559813 DOI: 10.1200/JCO.2014.56.2439
93. Prat A, Cheang MCU, Martín M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, Tyldesley S, Gelmon K, Bernard PS, Nielsen TO, Perou CM (2013) Prognostic Significance of Progesterone Receptor-Positive Tumor Cells Within Immunohistochemically Defined Luminal A Breast Cancer. *J Clin Oncol* 31:203-209 PMID: 23233704 DOI: 10.1200/JCO.2012.43.4134
94. QIAGEN (2019) theascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit Instructions for Use (Handbook).
95. Qiu W, Schönleben F, Li X, Ho DJ, Close LG, Manolidis S, Bennett BP, Su GH (2006) PIK3CA Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 12:1441-1446 PMID: 16533766 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2173
96. Reese DM, Slamon DJ (1997) HER-2/neu Signal Transduction in Human Breast and Ovarian Cancer. *Stem Cells* 15:1-8 DOI: 10.1002/stem.150001
97. Reinhardt K, Stückrath K, Hartung C, Kaufhold S, Uleer C, Hanf V, Lantzsch T, Peschel S, John J, Pöhler M, Bauer M, Bürrig FK, Weigert E, Buchmann J, Kantelhardt EJ, Thomssen C, Vetter M (2022) PIK3CA-mutations in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 196:483-493 DOI: 10.1007/s10549-022-06637-w
98. 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]. *Pathol* 8:138-140 PMID: 3303008
99. Research C for DE and (2019) FDA approves alpelisib for metastatic breast cancer. FDA <https://www.fda.gov/drugs/resources-inf/approval/2019/01/2019-0011-orig1s1-alpelisib-metastatic-breast-cancer>
100. Ross JS, Cronin M (2011) Whole Cancer Genome Sequencing by Next-Generation Methods. *Am J Clin Pathol* 136:527-539 DOI: 10.1309/AJCPR1SVT1VHUGXW
101. Rugo HS, Mayer I, Conte P, Loibl S, Campone M, Juric D, Andre F, Fritzsche M, He W, Babbar N, Ciruelos E (2019) Abstract CT142: Prevalence of PIK3CA mutations in patients with hormone receptor-positive, human epidermal growth factor-2-negative advanced breast cancer from the SOLAR-1 trial. *Cancer Res* 79:CT142 DOI: 10.1158/1538-7445.AM2019-CT142
102. Rugo HS, Lerebours F, Ciruelos E, Drullinsky P, Ruiz-Borrego M, Neven P, Park YH, Prat A, Bachelot T, Juric D, Turner N, Sophos N, Zarate JP, Arce C, Shen Y-M, Turner S, Kanakamedala H, Hsu W-C, Chia S (2021) Alpelisib plus fulvestrant in PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer after a CDK4/6 inhibitor (BYLieve): one cohort of a phase 2, multicentre, open-label, non-comparative study. *Lancet Oncol* 22:489-498 DOI: 10.1016/S1470-2045(21)00034-6
103. Rugo HS, Raskina K, Schrock AB, Madison RW, Graf RP, Sokol ES, Sivakumar S, Lee JK, Fisher V, Oxnard GR, Tukachinsky H (2023) Biology and Targetability of the Extended Spectrum of PIK3CA Mutations Detected in Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 29:1056-1067 PMID: 36321996 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-22-2115

104. Ryland GL, Doyle MA, Goode D, Boyle SE, Choong DYH, Rowley SM, Li J, Bowtell DD, Tothill RW, Campbell IG, Gorringer KL, Australian Ovarian Cancer Study Group (2015) Loss of heterozygosity: what is it good for? *BMC Med Genomics* 8:45 DOI: 10.1186/s12920-015-0123-z
105. Saiki, Scharf, Faloona (1985) Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. URL: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2999980> DOI: DOI: 10.1126/science.2999980
106. Samuels Y, Velculescu VE (2004) Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle Georget Tex* 3:1221-1224 PMID: 15467468 DOI: 10.4161/cc.3.10.1164
107. Samuels Y, Waldman T (2010) Oncogenic Mutations of PIK3CA in Human Cancers. *Curr Top Microbiol Immunol* 347:21-41 PMID: 20535651 DOI: 10.1007/82_2010_68
108. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM (2006) Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22:159-168 DOI: 10.1016/j.molcel.2006.03.029
109. 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. *Arch Pathol Lab Med* 138:1048-1052 DOI: 10.5858/arpa.2013-0435-OA
110. Sharma P, Abramson VG, O'Dea A, Nye L, Mayer I, Pathak HB, Hoffmann M, Stecklein SR, Elia M, Lewis S, Scott J, De Jong JA, Wang YY, Yoder R, Schwensen K, Finke K, Heldstab J, LaFaver S, Williamson SK, Phadnis MA, Reed GA, Kimler BF, Khan QJ, Godwin AK (2021) Clinical and Biomarker Results from Phase I/II Study of PI3K Inhibitor Alpelisib plus Nab-paclitaxel in HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 27:3896-3904 PMID: 33602685 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4879
111. Shen X, Song S, Li C, Zhang J (2022) Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral. *Nature* 606:725-731 DOI: 10.1038/s41586-022-04823-w
112. Sobhani N, Roviello G, Corona SP, Scaltriti M, Ianza A, Bortul M, Zanconati F, Generali D (2018) The prognostic value of PI3K mutational status in breast cancer: A meta-analysis. *J Cell Biochem* 119:4287-4292 PMID: 29345357 DOI: 10.1002/jcb.26687
113. Sobral-Leite M, Salomon I, Opdam M, Kruger DT, Beelen KJ, van der Noort V, van Vlierberghe RLP, Blok EJ, Giardiello D, Sanders J, Van de Vijver K, Horlings HM, Kuppen PJK, Linn SC, Schmidt MK, Kok M (2019) Cancer-immune interactions in ER-positive breast cancers: PI3K pathway alterations and tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast Cancer Res* 21:90 DOI: 10.1186/s13058-019-1176-2
114. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale A-L (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10869-10874 PMID: 11553815 DOI: 10.1073/pnas.191367098
115. Stemke-Hale K, Gonzalez-Angulo AM, Lluch A, Neve RM, Kuo W-L, Davies M, Carey M, Hu Z, Guan Y, Sahin A, Symmans WF, Pusztai L, Nolden LK, Horlings H, Berns K, Hung M-C, van de Vijver MJ, Valero V, Gray JW, Bernardis R, Mills GB, Hennessy BT (2008) An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 68:6084-6091 PMID: 18676830 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6854

116. Strohkamp S, Tiemann K (2021) Neue Indikation PIK3CA-mutiertes Mammakarzinom: Erste Erfahrungen aus dem molekularpathologischen Routinelabor. 4/2021 Journal Onkologie:
117. Sudhakar N, George Priya Doss C, Thirumal Kumar D, Chakraborty C, Anand K, Suresh M (2016) Deciphering the impact of somatic mutations in exon 20 and exon 9 of PIK3CA gene in breast tumors among Indian women through molecular dynamics approach. *J Biomol Struct Dyn* 34:29-41 PMID: 25679319 DOI: 10.1080/07391102.2015.1007483
118. Tegeler CM, Hartkopf AD, Banys-Paluchowski M, Krawczyk N, Fehm T, Jaeger BAS (2024) Circulating Tumor DNA in Early and Metastatic Breast Cancer-Current Role and What Is Coming Next. *Cancers* 16:3919 PMID: 39682108 DOI: 10.3390/cancers16233919
119. Terán E, Lozano R, Rodríguez CA, Abad M, Figuero L, Muñoz JA, Cigarral B, Rodrigues A, Sancho M, Gómez MA, Morchón D, Montero JC, Sayagués JM, Ludeña MD, Fonseca E (2024) PIK3CA mutational status in tissue and plasma as a prognostic biomarker in HR+/HER2- breast cancer. *Cancer Med* 13:e70101 PMID: 39235099 DOI: 10.1002/cam4.70101
120. Tripathy D, Slamon DJ, Cobleigh M, Arnold A, Saleh M, Mortimer JE, Murphy M, Stewart SJ (2004) Safety of treatment of metastatic breast cancer with trastuzumab beyond disease progression. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 22:1063-1070 PMID: 15020607 DOI: 10.1200/JCO.2004.06.557
121. van Gemert WA, Lanting CI, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Grooters HG, Kampman E, Kiemeny LALM, van Leeuwen FE, Monninkhof EM, de Vries E, Peeters PH, Elias SG (2015) The proportion of postmenopausal breast cancer cases in the Netherlands attributable to lifestyle-related risk factors. *Breast Cancer Res Treat* 152:155-162 DOI: 10.1007/s10549-015-3447-7
122. Vanhaesebroeck, Waterfield (2001) SYNTHESIS AND FUNCTION OF 3-PHOSPHORYLATED INOSITOL LIPIDS.
123. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Panayotou G, Waterfield MD (1997) Phosphoinositide 3-kinases: A conserved family of signal transducers. *Trends Biochem Sci* 22:267-272 DOI: 10.1016/S0968-0004(97)01061-X
124. Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70:535-602 PMID: 11395417 DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.535
125. Vanhaesebroeck B, Ali K, Bilancio A, Geering B, Foukas LC (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem Sci* 30:194-204 DOI: 10.1016/j.tibs.2005.02.008
126. 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
127. Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P (2012) PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:195-203 DOI: 10.1038/nrm3290
128. Viera AJ, Garrett JM (2005) Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 37:360-363 PMID: 15883903
129. Vivanco I, Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501 DOI: 10.1038/nrc839

130. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JMS, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF (2013) 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. *J Clin Oncol* DOI: 10.1200/JCO.2013.50.9984
131. Wörmann B Krebsfrüherkennung in Deutschland 2014 Evidenz – aktueller Stand – Perspektiven. *Dtsch Ges Für Hämatol Med Onkol EV* 4:41-55
<https://www.dgho.de/publikationen/schriftenreihen/krebsfrueherkennung>
132. 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 DOI: 10.1186/bcr1262
133. Yi M, Huo L, Koenig KB, Mittendorf EA, Meric-Bernstam F, Kuerer HM, Bedrosian I, Buzdar AU, Symmans WF, Crow JR, Bender M, Shah RR, Hortobagyi GN, Hunt KK (2014) Which threshold for ER positivity? a retrospective study based on 9639 patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 25:1004-1011 PMID: 24562447 DOI: 10.1093/annonc/mdu053
134. Zhao JJ, Liu Z, Wang L, Shin E, Loda MF, Roberts TM (2005) The oncogenic properties of mutant p110 α and p110 β phosphatidylinositol 3-kinases in human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 102:18443-18448 DOI: 10.1073/pnas.0508988102
135. Zhao L, Vogt PK (2008) Helical domain and kinase domain mutations in p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2652-2657 PMID: 18268322 DOI: 10.1073/pnas.0712169105
136. (2019) Liquid Biopsies Predict Alpelisib Benefit in Breast Cancer. *Oncol Times* 41:25 DOI: 10.1097/01.COT.0000552840.30153.8a
137. (2020) Piqray | European Medicines Agency (EMA). URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/piqray>
138. S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/032-045OL.html>
139. Leitlinienprogramm Onkologie: Mammakarzinom. URL: <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>
140. Mammakarzinom der Frau. URL: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau>
141. PharmaWiki - Aminosäuren. URL: <https://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Aminos%C3%A4uren>
142. Einführung in die PCR - Chemgapedia. URL: http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/einfuehrung.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/magnesium.vscml.html
143. Labor Dr. Gärtner: Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR). URL: [https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/echtzeit-pcr-\(real-time-pcr\)/](https://www.labor-gaertner.de/labor/abteilungen/molekularbiologie/informationen-zu-molekularbiologischen-methoden/echtzeit-pcr-(real-time-pcr)/)

144. Marktrücknahme von Alpelisib zulasten von Brustkrebspatient*innen. URL:
<https://www.dgho.de/aktuelles/presse/pressemitteilungen/marktruecknahme-von-alpelisib-zulasten-von-brustkrebspatient-innen>

7 Dank

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich während der intensiven Zeit meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. R. M. Bohle, ehemaliger Direktor des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Überlassung des Dissertationsthemas, die umfassende Betreuung und Unterstützung sowohl in Theorie als auch in Praxis.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Elke Elbert, für den regelmäßigen und produktiven Austausch, für Ihr Verständnis und Ihre Geduld sowie für die viele Zeit, die Sie in diese Arbeit investiert hat.

Ich bedanke mich auch bei dem gesamten Team des Instituts für Allgemeine und Spezielle Pathologie am Universitätsklinikum des Saarlandes für die freundliche und stets kollegiale Aufnahme und großartige Unterstützung. Stellvertretend für das gesamte Team danke ich ausdrücklich Meike.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern für die liebevolle, vielfältige und bedingungslose Unterstützung. Vielen Dank für das Ermöglichen dieses Studiums, einschließlich dieser Dissertation. Darüber hinaus danke ich Familie Cronauer und Familie Velten, die mir während meiner Zeit des Studiums ein familiäres Umfeld geschenkt haben.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 18.08.2025
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig
Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer Maria Bohle
Prof. Dr. Erich Solomayer