

Diplomarbeit

**Evaluierung der RNA Gewinnung nach Stanzbiopsie für
Genexpressionsanalysen beim Mammakarzinom**

eingereicht von

Elisa Sieghartsleitner

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathologie, Medizinische Universität Graz

unter der Anleitung von

Univ.-Prof. Univ.-Doz. Dr.med.univ. Peintinger Florentia

Graz, am 12.03.2019

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 12.03. 2019

Elisa Sieghartsleitner eh

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an **Univ.-Prof. Univ.-Doz. Dr.med.univ. Florentia Peintinger**. Ich möchte mich bei ihr nicht nur für die Bereitstellung dieses Themas bedanken, sondern für die außerordentlich gute Betreuung und ihr Engagement und die Geduld, mir bei jeglichen Fragen und Problemen zur Seite zu stehen. Dank ihrer Motivation und Kompetenz hat sie es geschafft, mich für wissenschaftliches Arbeiten zu begeistern. Sie war mir durch ihre wissenschaftlichen Leistungen und ihre herzliche Art stets ein großes Vorbild. Ich freue mich darauf, noch viele weitere Projekte mit ihr gemeinsam erfolgreich meistern zu können.

Weiters möchte ich mich bei meiner Familie und vor allem meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglicht und stets an mich geglaubt haben. Ich danke euch von ganzem Herzen für eure Liebe, euren Rückhalt und eure Unterstützung.

Der größte Dank aber gebührt meinem Partner Daniel. Er hat mich durch alle Phasen des Studiums hindurch begleitet. Gemeinsam haben wir eine wundervolle Studienzeit in Graz verbracht. Danke für unzählige Lernstunden mit dir und dein Talent, mir immer ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern. Ohne deinen starken Rückhalt und deine Liebe wäre ich wahrscheinlich nicht da, wo ich heute bin.

Zusammenfassung

Ziel: Eine gute Qualität und ein ausreichender Gewinn von RNA aus Brustkrebsgewebe sind wichtige Voraussetzungen für die qualitätsgesicherte Durchführung von genomischen Tests in klinischen Studien. Das Ziel der Auswertung dieser Studie besteht darin die Menge und Qualität der extrahierten RNA unter Verwendung zweier verschiedener Biopsienadeln zu bestimmen und die Ergebnisse statistisch zu vergleichen.

Material und Methoden: Das Protokoll AGO-35 der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie befasst sich mit der prospektiven Validierung von genomischen Signaturen zur Erfassung der Chemosensitivität der axillären Lymphknoten nach neoadjuvanter Chemotherapie beim HER2 negativen Mammakarzinom. Zur histologischen Sicherung der Diagnose wurde eine Stanzbiopsie durchgeführt. Zwei Mammabiopsien wurden in RNAlater konserviert, bei -80°C zwischengelagert und anschließend in das M.D. Anderson Cancer Center (Houston, TX, USA) zur genomischen Analyse mittels Affymetrix Human Gene U133A versendet. Für die Biopsien wurde entweder die Bard® oder Climed® 14-Gauge Biopsienadel verwendet. Bei 55 Patientinnen wurde die RNA Integrity Number (RIN), der RNA Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$, die RNA Konzentration und die RNA Menge bestimmt. Die statistische Auswertung wurde mittels deskriptiver statistischer Methoden und dem Mann-Whitney-U Test zum Vergleich der RNA Ergebnisse durchgeführt.

Ergebnisse: 39 Mammabiopsien wurden mittels der Bard® Nadel und 16 Mammabiopsien mittels der Climed® Nadel durchgeführt.

Unterschiede in der RNA Menge zwischen den beiden Nadeln: 11.8 versus 13.0 μg
(Unterschied = 1.2 μg , 95% Konfidenzintervall, $P = 0.9335$)

Unterschiede der RIN zwischen den beiden Nadeln: 8.9 versus 9.0 (Unterschied = 0.1, 95% Konfidenzintervall, $P = 0.3984$)

Unterschiede des RNA Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ zwischen den beiden Nadeln: 2.1 versus 2.1 (Unterschied = 0, 95% Konfidenzintervall, $P = 0.8160$)

Unterschiede in der Konzentration zwischen den beiden Nadeln: 199 versus 326 $\text{ng}/\mu\text{L}$
(Unterschied = 127 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 95% Konfidenzintervall, $P = 0.0323$)

Conclusio: Die Menge und die Qualität der extrahierten RNA sind wichtige Faktoren für Genexpressionsanalysen in Mammakarzinomgewebe. Alle 55 Mammabiopsien wiesen eine ausreichende Menge und Qualität der extrahierten RNA auf. Der Vergleich beider Nadeln

hinsichtlich der RNA Konzentration zeigte einen signifikanten Unterschied zugunsten der Climed® Nadel.

Abstract

Purpose: Microarray-based genomic results are widely used in clinical trials. Measurement of RNA expression may be influenced by sample collection. The aim of this project is to evaluate yield and quality of total RNA from breast cancer biopsy samples using two different biopsy needles.

Patients and Methods: The prospective AGO-35 trial Prospective Validation of Genomic Signatures to Predict Treatment Response in the Axillary Nodes after Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with HER2-negative Breast Cancer examines the validation of a genomic test to predict tumor response in the axilla after neoadjuvant chemotherapy. Needle biopsy of the breast tumor was performed as the standard procedure for diagnosis of breast cancer. In a total of 55 patients tumor biopsy was performed either with a Bard® or with a Climed® 14-gauge biopsy needle. Tissue cores of primary invasive carcinoma were collected and placed into RNAlater. Samples were stored at -80° C until gene expression profiling with Affymetrix Human Gene U133A microarrays. RNA yield, purity, concentration and Bioanalyzer-based RNA integrity number (RIN) were evaluated in a total of 55 patients with locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. The statistical significance of the effects was assessed using linear mixed effects regression models. All statistical tests were two-sided. Differences between the RNA results from the two biopsy needles were determined.

Results: 39 tissue cores were collected with a Bard® and 16 cores with a Climed® needle. Difference in RNA yield between the two needles: 11.8 to 13.0 µg (difference = 1.2 µg, 95% confidence interval, P = 0,9335)
Difference in RIN between the two needles: 8.9 to 9.0 (difference = 0.1, 95% confidence interval, P = 0.3984)
Difference in Ratio OD₂₆₀/OD₂₈₀ between the two needles: 2.1 to 2.1 (difference = 0, 95% confidence interval, P = 0.8160)
Difference in Concentration between the two needles: 199 to 326 ng/µL (difference = 127 ng/µL, 95% confidence interval, P = 0.0323)

Conclusion: The yield and the stability of the extracted tissue RNA is an important factor for gene expression profiling in breast cancer samples. All of the 55 breast cancer samples had sufficient RNA yield and purity for gene expression analysis. Comparing the concentration of

RNA between the two needles showed a significant increase of RNA concentration using the Climed needle.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom - Grundlagen	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Histologischer Ursprung	2
1.1.3	Molekulare Subtypen	2
1.1.4	Diagnostik	4
1.1.5	TNM-Stadien	5
1.2	Neoadjuvante Chemotherapie	7
1.2.1	Neoadjuvante Chemotherapieregime	7
1.2.1	RECIST-Kriterien	7
1.2.2	Prognostische Bedeutung der pathologisch kompletten Remission (pCR) nach NAC	8
1.2.3	HER2-positive Mammakarzinome	9
1.2.4	Triple-negative Mammakarzinome (TNBC)	10
1.2.5	Konvertierung der Biomarker	10
1.3	Genomics	11
1.3.1	Verwendung	11
1.3.2	RNA Isolation	11
1.3.3	Qualitätsbeurteilung	11
1.3.4	Genexpressionsanalysen	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Ziele und Bedeutung	19
2.2	Studiendesign und Datendokumentation	19
2.3	Patientinnenkollektiv	21
2.4	Datenverarbeitung und statistische Methoden	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Deskriptive Statistiken	24
3.1.1	Patientinnen/Tumor Charakteristika	24
3.1.2	Verwendete Biopsienadeln	26
3.1.3	RNA Charakteristika	26
3.1.4	Deskriptive Statistiken nach Biopsienadel und Vergleiche	27
3.2	RNA Integrity Number (RIN)	28
3.3	RNA Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀	29
3.4	RNA Konzentration	30
3.5	RNA Menge	31

4 Diskussion	32
Literaturverzeichnis	I

Abkürzungen und Erklärungen

ALND: axilläre Dissektion

BRCA: BReast CAncer Gene

ER-Rezeptor: Östrogenrezeptor

HER2-Rezeptor: Humaner epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor 2

miRNA: microRNA

NAC: Neoadjuvante Chemotherapie

pCR: pathologisch komplette Remission

PR-Rezeptor: Progesteronrezeptor

RECIST-Kriterien: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

RIN: RNA Integrity Number

RNA: Ribonukleinsäure

rRNA: ribosomale RNA

RT-PCR: Real Time PCR

TNBC: Triple negatives Mammakarzinom

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Statistik Austria – Inzidenz und Mortalität bösartiger Neubildungen der weiblichen Brust

Abbildung 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms

Abbildung 3: RNA Degradierung zu verschiedenen Zeitpunkten

Abbildung 4: RNA Integrität Kategorien

Abbildung 5: Wichtige Peaks und Regionen im Elektropherogramm

Abbildung 6: Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm

Abbildung 7: Analyse der Genexpression mittels Mikroarray

Abbildung 8: Boxplot RNA Integrity Number

Abbildung 9: Boxplot RNA Quotient OD_{260}/OD_{280}

Abbildung 10: Boxplot RNA Konzentration in $ng/\mu L$

Abbildung 11: Boxplot RNA Menge in μg

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung der molekularen Subtypen und der prozentuellen Häufigkeit

Tabelle 2: TNM-Stadien des Mammakarzinoms

Tabelle 3: RECIST-Kriterien

Tabelle 4: Patientinnen/Tumor Charakteristika

Tabelle 5: Verwendete Biopsienadeln

Tabelle 6: RNA Charakteristika

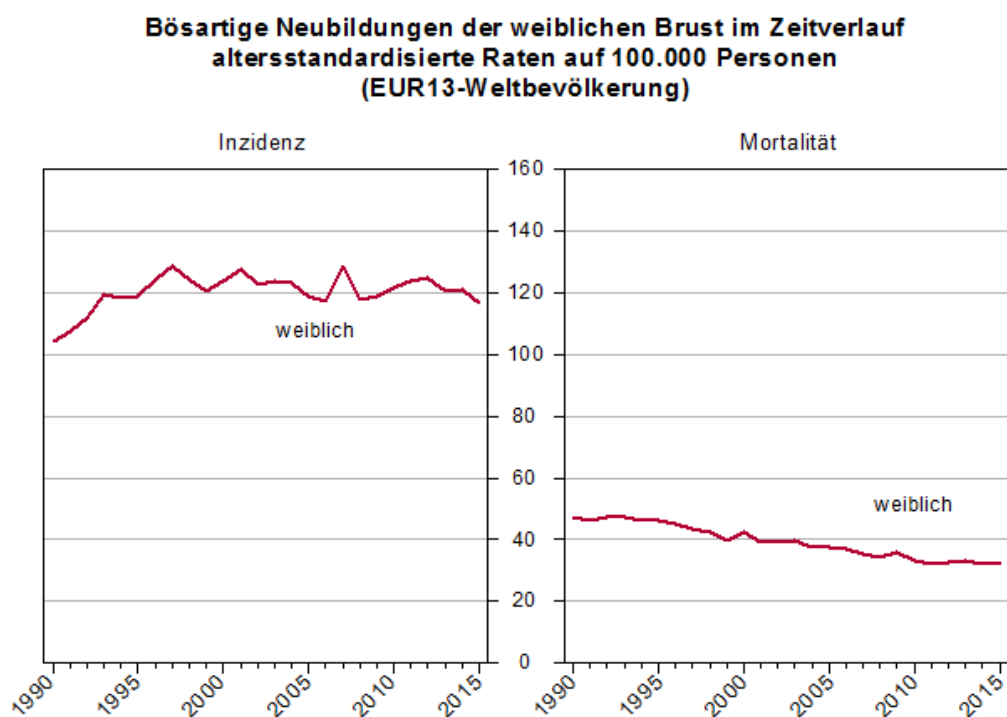
Tabelle 7: Deskriptive Statistiken nach Biopsienadel und Vergleiche

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom - Grundlagen

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor und sogleich die häufigste Krebstodesursache bei Frauen. Er macht 30% der Krebserkrankungen aus. 2015 traten in Österreich 5.480 Neuerkrankungen auf. (1) Damit erkrankt etwa jede 9. Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Diese Zahl kommt einerseits durch Erkrankungen aufgrund des normalen Lebenszeitriskos, andererseits durch Erkrankungen aufgrund eines individuellen Hochrisikoprofils wie zum Beispiel durch BRCA-Mutationen zustande. (2) Das normale Lebenszeitrisko wird mit 12% angegeben, während es bei Hochrisikopatientinnen bis zu 80% beträgt. (3) Trotz einer steigenden Inzidenz sinkt die Mortalität seit einigen Jahren und lag 2015 bei 32/100 000 Frauen/Jahr. (1)



Q: STATISTIK AUSTRIA, Österreichisches Krebsregister (Stand 06.12.2017) und Todesursachenstatistik.
Erstellt am 18.12.2017.

Abbildung 1: Statistik Austria – Inzidenz und Mortalität bösartiger Neubildungen der weiblichen Brust (1)

1.1.2 Histologischer Ursprung

Ausgangspunkt von bösartigen Tumoren der Brust ist meistens die terminale duktilolobuläre Einheit, von welcher die Entwicklung unterschiedlich differenzierter Karzinome ausgeht. (2) Generell unterscheidet man bei den bösartigen Tumoren Vorläuferläsionen und invasive Tumore. Den Vorläuferläsionen gemeinsam ist eine intakte Basalmembran, die die Tumorzellen vom gefäßreichen Binde- und Fettgewebe trennt. Diese Basalmembran wurde beim invasiven Tumor bereits durchbrochen, was eine Metastasierung ermöglicht.

1.1.3 Molekulare Subtypen

Rezeptoren stellen Bindungsstellen an der Zelle dar, an welchen Signale in die Zelle gelangen. Mammakarzinomzellen besitzen in vielen Fällen Rezeptoren. Zu diesen Rezeptoren zählen: Östrogen-Rezeptor (ER-Rezeptor), Progesteron-Rezeptor (PR-Rezeptor) und der Humane Epidermale Wachstumsfaktor (HER2-Rezeptor). Östrogen und Progesteron sind Geschlechtshormone und üben bei hormonrezeptorpositiven Tumoren eine wachstumssteigernde Wirkung auf den Tumor aus. Circa 70% der Tumore zeigen eine Hormonrezeptorpositivität. (4) Die Rezeptoren für HER2 stellen Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren dar, die die Zelle zur Teilung und somit Tumorvergrößerung anregen. Das HER2-Rezeptorgen ist in etwa 20% der Mammakarzinome überexprimiert. (5) Durch eine gezielte pharmakologische Blockade dieser Rezeptoren kann daher eine wachstumshemmende Wirkung erzielt werden. Ein triple-negativer Tumor (TNBC) zeichnet sich durch fehlende Expressierung dieser drei Rezeptoren aus. Da keine therapierelevante Expression und somit Rezeptorblockade möglich ist resultiert ein aggressiveres Wachstumsverhalten.

Bereits 2000 konnten Perou et. al. nachweisen, dass Tumore Unterschiede auf molekularer Ebene in der Genexpression aufweisen. (6) Dadurch entstand eine neue Tumorklassifikation basierend auf molekularen Subtypen, welche mit einer klinischen Relevanz assoziiert sind. (7)

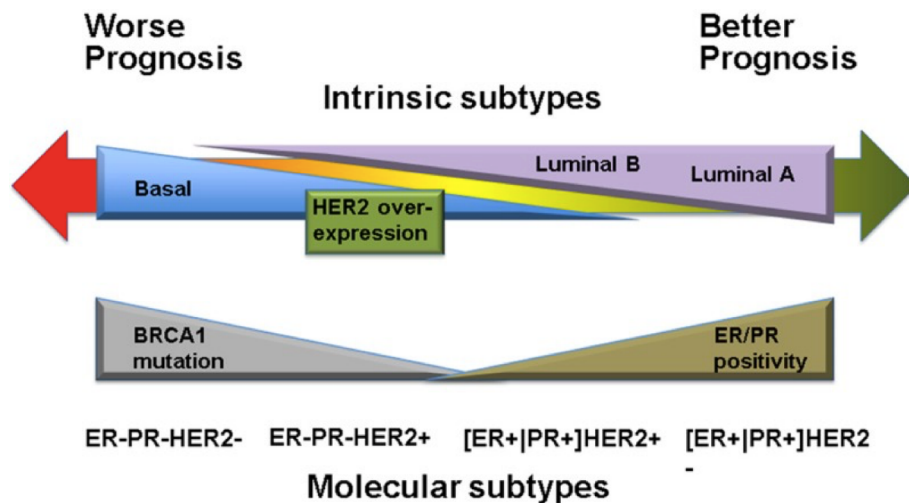


Abbildung 2: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms (8)

Je nach Genexpression und Intensität der Genexpression werden 5 molekulare Subtypen unterschieden. Die hormonrezeptorpositiven Tumore werden dem Luminalen Subtyp zugeordnet. Luminal A oder Luminal B wird durch die Höhe des Proliferationsmarkers Ki-67 unterschieden. Der basal-like Subtyp umfasst die triple-negativen Tumore und der HER2-Subtyp umfasst Tumore, die HER2-positiv sind. Als normal-like werden Tumore bezeichnet, die einen ähnlichen Rezeptorstatus wie der Luminal A Subtyp sowie das Genexpressionsprofil von normalem Mammagewebe aufweisen. (8)

Mammakarzinome mit einer Mutation im BRCA1-Gen haben eine erhöhte Wahrscheinlichkeit eines triple-negativen Subtypes. (9)

Molekularer Subtyp	Rezeptorstatus	Grading	Prognose	Häufigkeit
Luminal A	ER+ PR+ HER2-ki67-	1, 2	Gut	44%
Luminal B	ER+ PR+ HER2- ki67+ ER+ PR+ HER2+ ki67+	2 3	Mittel Schlecht	24 %
HER2-Überexpression	ER- PR- HER2+	2, 3	Schlecht	11%
Basal	ER- PR- HER2- basale Marker +	3	Schlecht	19%
Normal-like	ER+ PR+ HER2- ki67-	1, 2, 3	Mittel	2%

Tabelle 1: Zusammenfassung der molekularen Subtypen (8) und der prozentuellen Häufigkeit (10)

1.1.4 Diagnostik

Als bildgebende Verfahren kommen die Mammografie, die Mammasonografie und in speziellen Situationen die Magnetresonanztomografie (MRT) zum Einsatz. (3) Die endgültige Diagnostik kann nur in der Histologie gestellt werden. Dabei wird mittels Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie oder offener Biopsie ein kleiner Gewebeanteil entnommen, der histologisch aufgearbeitet wird, um Aussagen über Dignität, Tumordifferenzierung, Proliferation und Rezeptorstatus machen zu können.

1.1.5 TNM-Stadien

Das Brustkrebsstaging erfolgt durch die pTNM-Klassifikation. Durch diese Klassifikation soll der Ausbreitungsgrad des Mammakarzinoms festgestellt werden, um anschließende Therapien planen zu können.

T-Kategorie	
pTX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pT0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor < 20 mm
pT1mic	Tumor < 1mm
pT1a	1,1-5 mm
pT1b	5,1-10 mm
pT1c	10,1-20 mm
pT2	Tumor 20,1-50 mm
pT3	Tumor > 50 mm
pT4	Brustkrebs jeder Größe mit Einbeziehung der Haut oder der Brustwand (z.B. Muskeln zwischen den Rippen – Intercostalmuskeln, Rippenknochen, nicht aber der Pektoralismuskulatur)
pT4a	Ausdehnung auf die Brustwand
pT4b	Hautödem, Ulzeration, ipsilaterale mammäre Satellitenmetastasen
pT4c	Kriterien 4a und 4b gemeinsam
pT4d	Inflammatorisches Karzinom
N-Kategorie	
pNX	Lokoregionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
pN0	Keine Metastasen
pN1	Metastasen in 1-3 ipsilateralen axillären Lymphknoten und/oder in Mammaria-interna-Lymphknoten
pN1mic	Mikrometastase 0,2-2 mm
pN1a	Metastase in 1-3 axillären Lymphknoten, davon eine < 2 mm
pN1b	Mikroskopischer Tumorbefall eines Mammaria-interna-Lymphknotens
pN1c	Kombination der Kriterien für pN1a und pN1b
pN2	Metastasen in 4-9 axillären Lymphknoten oder klinisch auffälliger Mammaria-interna-Lymphknoten
pN2a	Metastase in 4-9 axillären Lymphknoten, davon eine > 2 mm

pN2b	Klinisch auffälliger Mammaria-interna-Lymphknoten (ohne axilläre Lymphknotenmetastase)
pN3	Metastasen in > 10 axillären, oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3a	Metastasen in < 10 axillären, oder in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten
pN3b	Metastasen in Mammaria interna- und axillären Lymphknoten
pN3c	Metastasen in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten
M-Kategorie	
pMX	Nicht beurteilbar
pM0	Keine Fernmetastasen
pM1	Fernmetastasen

Tabelle 2: TNM-Stadien des Mammakarzinoms

1.2 Neoadjuvante Chemotherapie

Die neoadjuvante (primäre oder präoperative) Chemotherapie (NAC), auch neoadjuvante Systemtherapie genannt, stellt eine valide Behandlungsoption für Patientinnen mit Mammakarzinom dar. In der Neoadjuvanz wird die Chemotherapie vor der geplanten Operation durchgeführt. Die neoadjuvante Therapie wurde für Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenem, inoperablem und/oder inflammatorischem Karzinom entwickelt. (11) Sie ist jedoch auch beim operablen Karzinom wie zum Beispiel dem triple negativen Mammakarzinom einsetzbar. Die prospektiv randomisierte Studie B-18 des National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NASBP), die über neun Jahre eine neoadjuvante mit einer adjuvanten systemischen Therapie verglich, fand keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen in Bezug auf rezidivfreies Überleben und Gesamtüberleben. Weiters konnte bestätigt werden, dass die neoadjuvante systemische Therapie die meisten Mammakarzinome verkleinert und das Vorkommen positiver Lymphknoten in der Axilla verringert. (12,13) Daher ist es möglich statt einer Mastektomie eine Brustreihaltung durchzuführen. (11)

1.2.1 Neoadjuvante Chemotherapieregime

Empfohlene neoadjuvante Chemotherapieregime sollten für mindestens 18 Wochen, d.h. 6 Zyklen (alle 3 Wochen) geplant werden und bestehen aus anthrazyklin- und taxanhaltigen Kombinationen. In der GeparTrio-Studie profitieren Patientinnen mit einem hormonrezeptorpositiven Tumor, der ein frühes Ansprechen nach zwei Zyklen TAC (Docetaxel, Doxorubicin, Cyclophosphamid) aufweist, sogar von 8 Zyklen der Therapie. (14) Der Therapieeffekt der NAC wird regelmäßig mittels Bildgebung kontrolliert. (2)

1.2.1 RECIST-Kriterien

Für die Beurteilung des Ansprechens der neoadjuvanten Chemotherapie werden die RECIST-Leitlinien herangezogen (RECIST: Response Evaluation in Solid Tumors). (15) RECIST berücksichtigt messbare Läsionen, die in einer Ebene korrekt vermessen werden. Die Mindestgröße für die längste Achse beträgt 20 mm bei konventionellem CT-Scan

(Computertomografie) und 10 mm bei Spiral-CT. Bei mehreren messbaren Läsionen wird die Summe der längsten Durchmesser der einzelnen Ziel-Läsionen gebildet und im Verlauf kontrolliert. Tabelle 3 beschreibt die Kriterien des Therapieansprechens. (16)

		Ziel-Läsion
Komplette Remission	CR	Vollständige Rückbildung aller Läsionen
Partielle Remission	PR	Rückgang der Summe der Target-Läsionsdurchmesser um mindestens 30%
Wachstumsstillstand	SD	Abnahme um weniger als 30% oder eine Zunahme um weniger als 20%
Progression	PD	Stärkere Zunahme als 20% oder Nachweis neuer Läsionen

Tabelle 3: RECIST-Kriterien

1.2.2 Prognostische Bedeutung der pathologisch kompletten Remission (pCR) nach NAC

Bei triple-negativen, HER2-positiven und Luminal B/HER2-negativen Tumoren ist das Erreichen der pathologisch kompletten Remission (pCR) nach neoadjuvanter Chemotherapie mit einer guten Prognose verbunden im Vergleich zu den Tumoren, die keine pCR erzielten. Bei Subtypen mit langsam wachsenden Tumoren ist eine pCR seltener im Vergleich zu schnell wachsenden Tumoren. Die Prognose von HER2-positiven und triple-negativen Tumoren bei Erreichen einer pCR ist in etwa gleich mit der Prognose der Luminal A Tumore. Von Minckwitz et al. konnten in einer Metaanalyse mit 6377 Patientinnen zeigen, dass Patientinnen mit keinerlei nachweisbarem Tumor (invasiv oder in-situ) in Brust und Lymphknoten nach einer neoadjuvanten Chemotherapie (= pCR) die beste Prognose haben. (17)

Daher hat sich das Erreichen einer pCR neben der Verbesserung der Operabilität und der Möglichkeit der Beurteilung des in-vivo Ansprechens zum Hauptziel der neoadjuvanten Chemotherapie etabliert. (11)

Die pCR-Raten in Brust und Axilla unterscheiden sich aufgrund der verschiedenen molekularen Subtypen des Mammakarzinoms. Die ACOSOG Z1071 untersuchte bei 694 zum Diagnosezeitpunkt nodal positiven Patientinnen die Ansprechraten nach neoadjuvanter Chemotherapie. Über alle Subtypen hinweg hatten 34% eine pCR, 46% ein Teilansprechen, 14% eine Stabilität und 6% ein progredientes Tumorwachstum. Bei den triple-negativen Tumoren war die pCR-Rate in der Mamma 48%, bei den HER2-positiven 50% und bei den Hormonrezeptor-positiven Tumoren lediglich 16%. Bei der pCR-Rate in der Axilla war es ähnlich: insgesamt konvertieren 41% von nodal positiv zu nodal negativ. Bei den triple-negativen Tumoren waren es 48%, bei den HER2-positiven 65% und bei den Hormonrezeptor-positiven 21%. 28% der Patientinnen hatten sowohl in der Brust als auch der Axilla eine pCR. Dabei waren bei der triple-negativen und der HER2-negativen Gruppen die höchsten Prozentwerte feststellbar, nämlich 38% und 45%. Bei den Hormonrezeptor-negativen Tumoren war es 11%. Es lässt sich also feststellen, dass die pCR-Raten sowohl in Mamma und Axilla bei triple-negativen als auch HER2-positiven Tumoren am höchsten sind. (18)

1.2.3 HER2-positive Mammakarzinome

HER2-positive Mammakarzinome stellen eine aggressive Erkrankung dar und werden mittels zielgerichteter Therapie, welche die HER2-Rezeptoren als Zielmolekül an der Tumorzelle nutzt, behandelt. (19) Der Einsatz vom Antikörper Trastuzumab in der Kombination mit einer Chemotherapie stellt den Therapiestandard dar. (11) Antikörper blockieren an diesen Rezeptoren der Zelloberfläche die Signalübertragung (extrazellulär) und hemmen somit die Zellteilung. (19) Lapatinib, ein weiterer jedoch intrazellulär wirkender Antikörper, hat ebenso eine beachtliche Effektivität in der Therapie der HER2-positiven Mammakarzinome gezeigt. Die Kombination von Trastuzumab mit Lapatinib kann die Rate der pCR signifikant steigern. Guaereri et. al. berichten von einer Steigerung von 25% auf 46,7% wenn zusätzlich zur Chemotherapie Trastuzumab nicht alleine, sondern in Kombination mit Lapatinib gegeben wird. (20) Gianni et. al zeigten, dass sich die pCR-Rate bei gemeinsamer Gabe von Pertuzumab, Trastuzumab und Docetaxel auf 45,8% erhöht. (21)

1.2.4 Triple-negative Mammakarzinome (TNBC)

TNBC stellen eine besondere Herausforderung dar, da eine zielgerichtete, endokrine oder HER2-Therapie bei diesen Tumoren keine Effektivität zeigt. Nach einer neoadjuvanten Chemotherapie weisen triple-negative Tumore erhöhte pCR-Raten im Gegensatz zu nicht-triple-negativen Tumoren auf. Diejenigen Patientinnen mit einem triple-negativen Tumor und einer pCR nach einer neoadjuvanten Chemotherapie haben ein exzellentes Überleben. Wenn jedoch keine pCR erreicht werden konnte ist die Prognose dieser Patientinnen signifikant schlechter als die der Patientinnen ohne triple-negativen Tumor. Dies wirkt sich besonders in den ersten 3 Jahren aus. Liedtke et. al erklären dies einerseits durch die allgemein schlechteren prognostischen Merkmale der TNBC wie zum Beispiel eine erhöhte Inzidenz von Viszeralmetastasen und andererseits daran, dass die Chemotherapie die einzige systemische Behandlung für das TNBC darstellt. (22)

Eine sekundäre Analyse der Geparsixto-Studie untersuchte ob BRCA-Patientinnen mit TNBC ein verändertes Ansprechen auf neoadjuvant additiv gegebenes Platin haben. Während sich die pCR-Raten bei BRCA-Mutation zwischen der Nicht-Carboplatin-Gruppe (66,7%) und der Carboplatin-Gruppe (65,4%) kaum unterschieden, wiesen Patientinnen ohne Mutation und familiärer Vorgeschichte im Carboplatin-Arm höhere pCR Raten (55%) auf als Patientinnen im Nicht-Carboplatin-Arm (36,4%). (23)

1.2.5 Konvertierung der Biomarker

Biomarker sind objektiv messbare biologische Parameter, die eine therapeutische Konsequenz bewirken. Dazu gehören beim Mammakarzinom unter anderen die Expressierung von Hormon- und HER2-Rezeptoren. Tumore können nach der neoadjuvanten Chemotherapie Änderungen in den Biomarkern aufweisen, die eine adjuvante Therapieänderung mit sich bringen. Eine Konversion von positiven zu negativen Biomarkern wird bei Östrogen in 33% und bei Progesteron in 60% beobachtet. Über eine Änderung des HER2-Status von positiv zu negativ wird in 9% und eine Änderung von negativ zu positiv in 18% berichtet. (24)

Die Re-Evaluation der Biomarker nach der NAC scheint also wichtig für das therapeutische Management zu sein.

1.3 Genomics

1.3.1 Verwendung

Genexpressionsprofile haben die Identifikation von molekularen Subgruppen von Mammakarzinomen ermöglicht, die sich in der Prognose und dem unterschiedlichen Ansprechen auf Therapien unterscheiden. (7,25) RNA-Expressionsprofile erweitern das Wissen über den physiologischen Zustand von Zellen und Geweben zu einem bestimmten Zeitpunkt und können die Optimierung der personalisierten Tumorthherapie unterstützen. (26,27)

1.3.2 RNA Isolation

Als grundlegendes Verfahren zur Analyse genomischer Daten wird die RNA isoliert. Dies erfolgt durch Lyse der Erythrozyten und Abzentrifugation der Leukozyten und kann mit einem RNeasy kit (Qiagen®, Valencia, CA) durchgeführt werden. (28) Dadurch erhält man extrahierte Gesamt-RNA. Im Wesentlichen handelt es sich dabei um ribosomale RNA (rRNA). Sie stellt die größte RNA-Fraktion von 85-90% dar und unterteilt sich in die 18S, 5.8S und 28S rRNA. (26)

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, regulatorische RNA-Moleküle von ungefähr 22 Nukleotiden Länge. Sie verhindern über die Bindung an mRNAs deren Expression. (5,28) Expressionsprofile von miRNAs können als Biomarker für die Früherkennung bestimmter Krebsarten dienen, da spezifische miRNAs in die Kanzerogenese involviert sind. (29)

1.3.3 Qualitätsbeurteilung

Die Konservierung der Tumorbiopsie in RNAlater zeigt bessere Ergebnisse im Hinblick auf die RNA Menge und die Qualität als die Snapfreezing Methode, mit welcher Proben sofort tiefgefroren werden. (30)

Die Überprüfung der RNA Qualität vor einer Genexpressionsanalyse ist wichtig, um verlässliche Expressionsergebnisse zu erhalten. Bei der RNA handelt es sich um sehr empfindliches Material, das durch die Anwesenheit von RNA abbauenden Enzymen (RNAsen) der ständigen Gefahr der Degradierung ausgesetzt ist. (26) Die fortschreitende Degradierung ist in Abbildung 3 ersichtlich. Die MIQE-Guidelines (Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments) beinhalten Empfehlungen für die Arbeitsvorgänge und notwendige Qualitätskontrollen. (31)

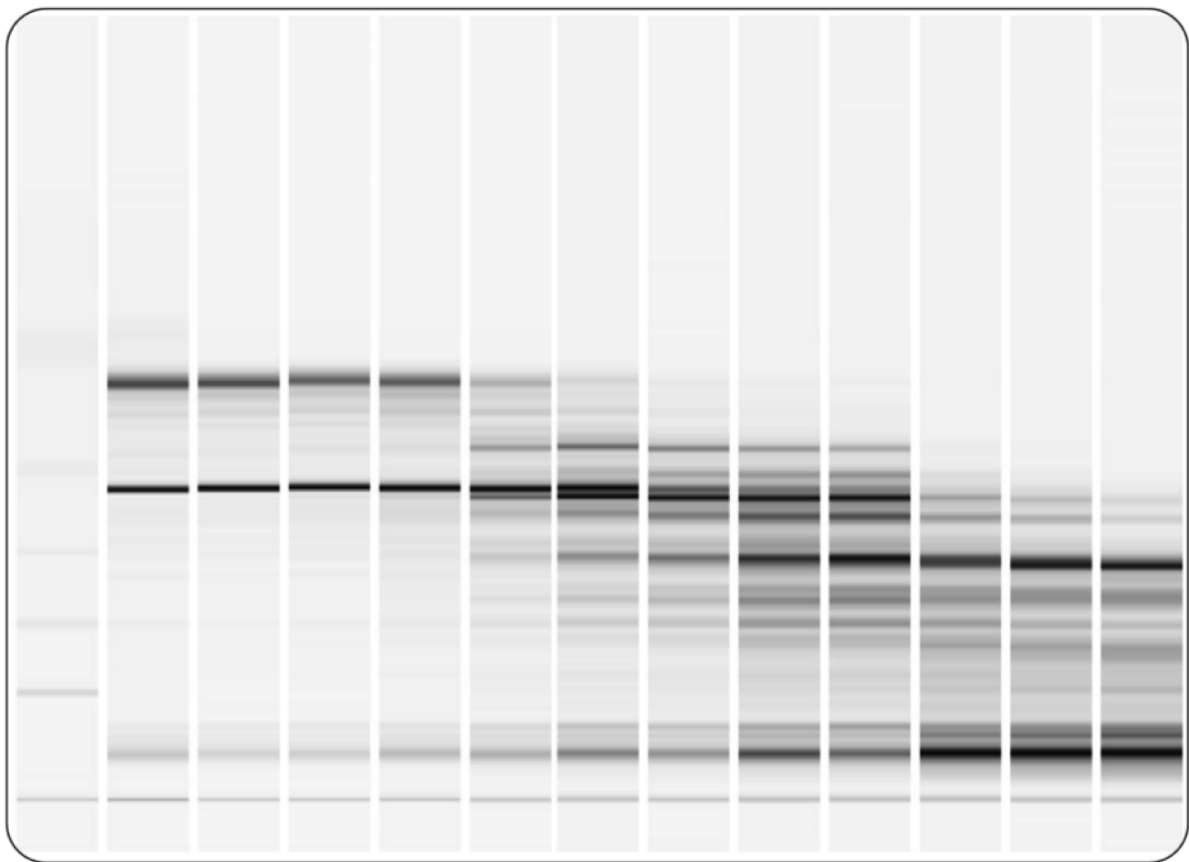


Abbildung 3: RNA Degradierung zu verschiedenen Zeitpunkten: die resultierenden Proben wurden vom Agilent 2100 Bioanalyzer System analysiert. Die fortschreitende Degradierung der RNA zeigt sich in einer Erhöhung der kleinen fragmentierten Größen. (32)

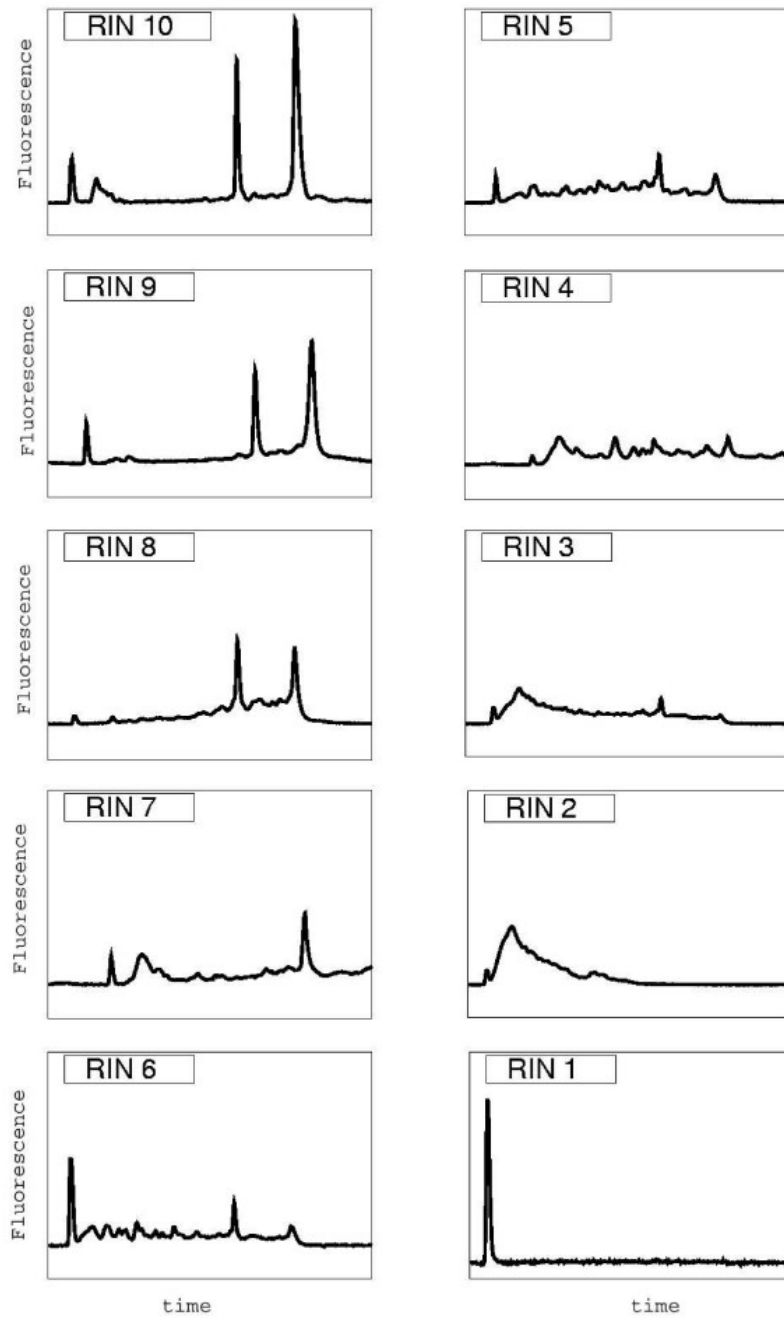
Integrität der Gesamt-RNA

Bei einer RNA-Probe von guter Qualität geht man von einem 28S/18S-rRNA Verhältnis von 2,0 aus. (26) Dieses Verhältnis ist jedoch subjektiv, von Labor zu Labor nur schwer reproduzierbar und die resultierenden Daten können nicht digital verarbeitet werden. (33) Aufgrund dieser Nachteile zeigt das 28S/18S-Verhältnis nur geringe Übereinstimmungen mit der RNA Integrität. (34)

Daher wurde die RNA Integrity Number (RIN) als benutzerunabhängiges, automatisches und verlässliches Tool entwickelt. Die RIN-Skala ist eine Qualitätsskala für die RNA, die von 10 (für eine vollständig intakte RNA) bis 1 (für vollständig zerfallene RNA) reicht. In einer Studie von Schroeder et. al. konnte die Korrelation zwischen hoher Genexpression (intakte RNA) mit hohen RIN-Werten sowie niedrige Genexpression (zerfallene RNA) mit niedrigen RIN-Werten gezeigt werden. Die ribosomale Ratio zeigte nur eine schwache Korrelation zwischen den beobachteten Genexpressionslevels und der Ratio. (33) Eine RIN von > 6 scheint für Genexpressionsanalysen akzeptabel zu sein. (30) Bei Proben mit einem RIN < 5 besteht die Möglichkeit von ungenauen Ergebnissen. (26)

Mithilfe einer Kapillar-Elektrophorese werden die einzelnen Fraktionen der rRNA (5S, 18S, 28S), die mRNA sowie fragmentierte RNAs der Größe nach aufgetrennt und in einem Elektropherogramm wie in Abbildung 4 und 5 dargestellt. Zusätzlich zum 28S/18S-rRNA-Verhältnis berechnen Systeme wie der Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) den RIN. (26)

Die Messung der miRNA-Konzentration von Proben unterschiedlicher Qualität konnte eine deutlich signifikante, negative Korrelation zwischen der miRNA-Konzentration und dem RIN-Wert zeigen. Die fortschreitende Degradierung führt zur Bildung kleiner RNA-Fragmente, die ebenfalls gemessen werden und dadurch zu einer Überschätzung des wirklichen miRNA-Gehalts führen. (35)



typische Beispiele der 10 RIN Kategorien. Die RIN-Skala reicht von 10 (intakte RNA) bis 1 (vollständig zerfallene RNA). Die Degradierung der rRNA zeigt sich durch eine Erhöhung der kleinen fragmentierten Größen. (33)

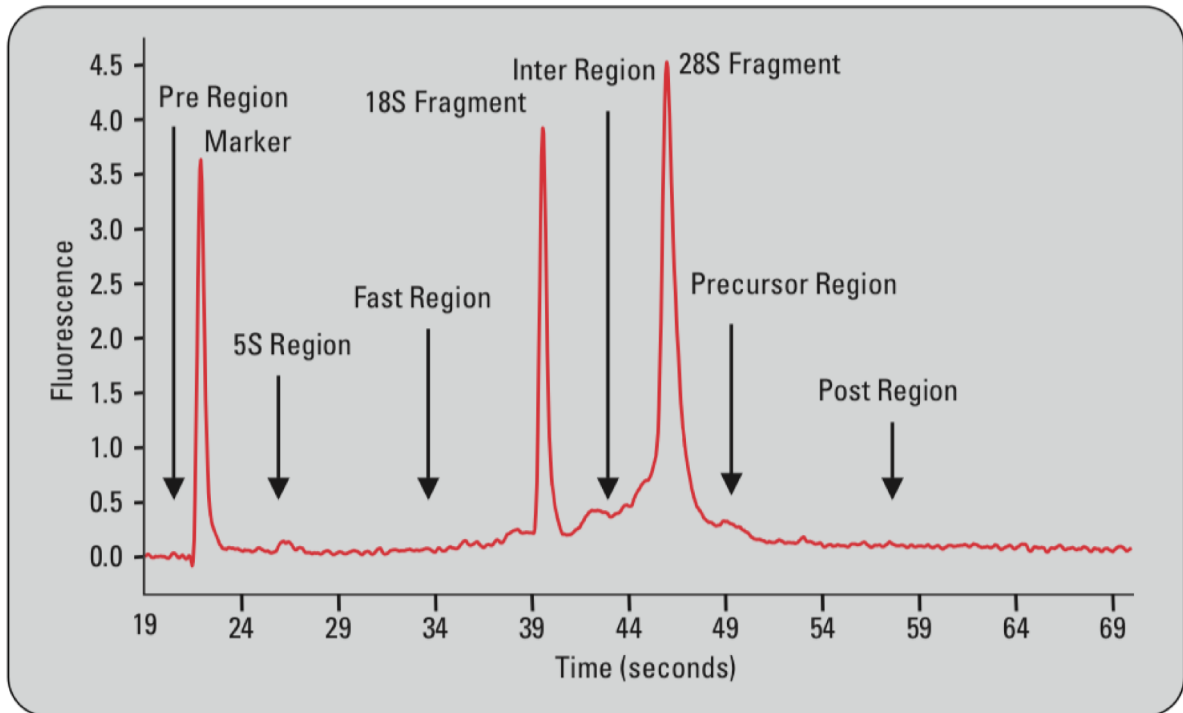


Abbildung 5: Wichtige Peaks (Marker, 18S, 28S) und Regionen (Pre-, 5S-, fast-, inter-, precursor-, post-region) im Elektropherogramm (32)

Photometrische Bestimmung der RNA

Nukleinsäurebestimmungen werden in der Regel über die Messung der Lichtabsorption in Spektrometern durchgeführt. Die photometrische Bestimmung ist leider nicht sehr empfindlich. Wird eine gewisse Menge unterschritten, ist es schwierig die Menge an Nukleinsäure von Artefakten zu unterscheiden. Bei hohen sowie auch bei niedrigen Konzentrationen ist die Bestimmung problematisch, wenn die Proben durch andere Nukleinsäuren verunreinigt sind. Alle Nukleinsäuren weisen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm Wellenlänge auf und können photometrisch kaum voneinander unterschieden werden. Die Konzentrationsbestimmung von einer bestimmten Nukleinsäure wird also durch die Anwesenheit anderer Nukleinsäuren verfälscht. (36)

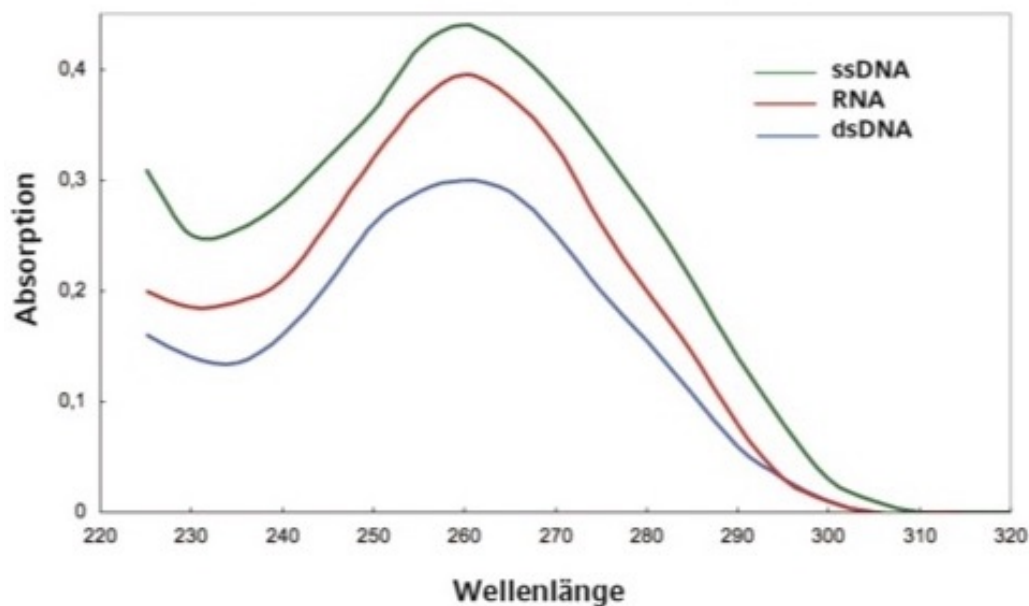


Abbildung 6: Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm: einzelsträngige Nukleinsäuren haben eine höhere Absorption als doppelsträngige, dies ermöglicht aber keine Unterscheidung voneinander. (36)

RNA-Menge

Die optische Dichte der Gesamt-RNA bei 260 nm Wellenlänge ist ein Maß für die Nukleotidenkonzentration und lässt somit die Berechnung der gesamten RNA-Menge zu. Proben mit zumindest 1 µg Menge an RNA eignen sich für weiterführende Genexpressionsanalysen. (30)

RNA Quotient 260/280

Die Verunreinigung der RNA wird durch die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen und durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} dargestellt. Das Absorptionsmaximum der RNA liegt bei 260 nm, das von Proteinen bei 280 nm. Dadurch kann festgestellt werden ob Verunreinigungen vorhanden sind. Proben mit einem Quotienten OD_{260}/OD_{280} von $> 1,8$ eignen sich für weiterführende Genexpressionsanalysen. (30)

RNA-Konzentration

Konzentrationen von Nukleinsäuren werden über die Absorption bei 260 nm gemessen. Anschließend wird die Konzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet.

Nach folgender Formel wird die Konzentration c (in ng/µl) berechnet:

$c = \text{gemessener Wert (bei einer Wellenlänge von 260 nm)} \times 100 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 40$

1.3.4 Genexpressionsanalysen

Die RNA-Sequenzierung liefert eine genaue Information über die Abfolge der Basen in einem bestimmten RNA-Abschnitt. Die Sequenzierung kann unter anderem mittels Mikroarrays durchgeführt werden. Unter einem Mikroarray versteht man eine Matrix von wenigen Quadratzentimetern Größe, die mehrere tausend gleichzeitig ablaufende Einzelanalysen ermöglicht. Grundprinzip ist der Nachweis der Bindung von fluoreszenzmarkierten RNA-Fragmenten mit immobilisierten komplementären Oligonukleotiden auf dem Array. Die Signalstärke zeigt die relative Bindung der gebundenen Moleküle und damit das Ausmaß der Genexpression an. (5)

Die Gesamt-RNA wird mittels einer reversen Transkriptase in Einzelstrang cDNA überschrieben. In Gegenwart von DNA Polymerase I, DNA Ligase und RNase H resultiert eine Doppelstrang cDNA, die gereinigt und deren Enden durch die DNA Polymerase geglättet werden. Die Doppelstrang cDNA wird anschließend in cRNA überschrieben, mittels RNAeasy columns (Qiagen®) gereinigt, die Menge spectrophotometrisch gemessen und bei 94°C für 35 Minuten in Anwesenheit von Enzymen fragmentiert. Die fragmentierte cRNA (10 µg) wird mit einem Mikroarray bei 42°C für 16 Stunden hybridisiert. Nach der Hybridisierung wird die cRNA von der Matrix entfernt und bei -80°C aufbewahrt. (30)

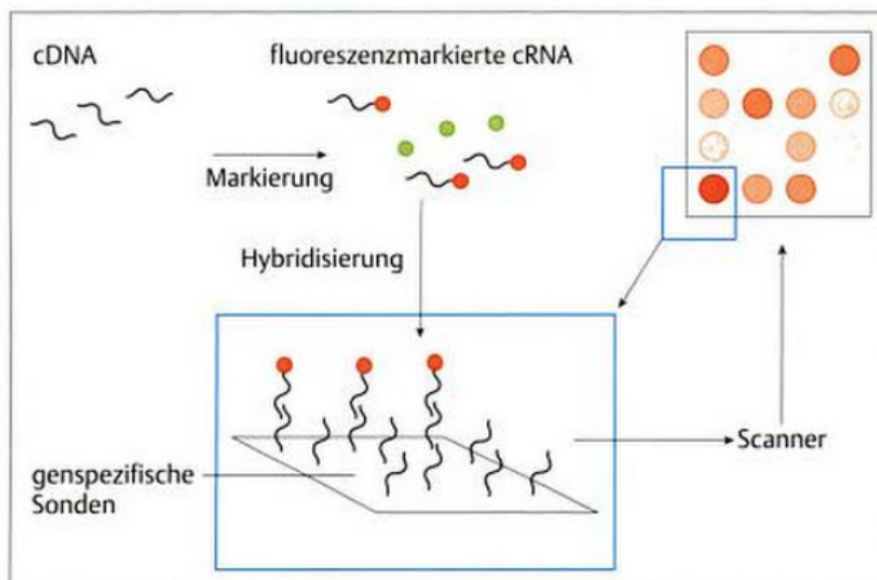


Abbildung 7: Analyse der Genexpression mittels Mikroarray: die RNA wird mit einem Farbstoff fluoreszenzmarkiert und bindet am Array an immobilisierte komplementäre Oligonukleotide (5)

2 Material und Methoden

2.1 Ziele und Bedeutung

Das Ziel dieser Arbeit ist es die RNA-Menge und Qualität zweier verschiedener Brustbiopsie-Nadeln zu vergleichen. In einer Untersuchung wurde die gewonnene Menge und die Qualität der extrahierten RNA nach sonographisch gezielter Stanzbiopsie festgestellt.

Eine ausreichende Menge sowie eine gute Qualität der RNA sind Grundvoraussetzungen für Genexpressionsanalysen zur Optimierung der personalisierten Tumorthherapie durch beispielsweise prädiktive genomische Tests.

2.2 Studiendesign und Datendokumentation

Die Grundlage dieser Arbeit stellt die prospektive, multizentrische Studie AGO-35¹ dar. Die AGO-35 behandelt das Thema der prospektiven Validierung der genomischen Signaturen zur Erfassung der Chemosensitivität der axillären Lymphknoten nach neoadjuvanter Chemotherapie beim HER2 negativem Mammakarzinom.

Ein sekundärer Endpunkt der AGO-35 Studie ist der Vergleich der operativen Möglichkeiten in der Axilla (Sentinel-Node-Biopsie versus axilläre Dissektion) vor und nach neoadjuvanter Chemotherapie. Klinisch/radiologische Untersuchungen zeigen eine sehr geringe Genauigkeit zur Vorhersage des Sentinel-Lymph-Node Status nach der neoadjuvanten Chemotherapie und können somit zu unnötigen Operationen führen. (37)

Ziel des primären Endpunktes ist es daher eine Vorhersage über das Ausmaß des Tumorsprechens in den axillären Lymphknoten treffen zu können, um radikale axilläre Operationen im Sinne einer axillären Dissektion trotz pathologischer Komplettremission zu vermeiden. (38)

Vor Studieneinschluss wurde ein Ethikvotum eingeholt und von allen Patientinnen wurde eine Einverständniserklärung unterschrieben.

Die AGO-35 Studie schließt mehrere rekrutierende Zentren in Österreich, Deutschland und Slowenien ein. Für diese Arbeit wurden Proben von 55 Patientinnen eingeschlossen. Bei

¹ Die AGO-35 wird vom Wissenschaftsfonds (WFW) gefördert (NCT02032745).

diesen Patientinnen wurde zur Sicherung eines Mammakarzinoms eine Stanzbiopsie durchgeführt. Für die AGO-35 Studie wurden zwei zusätzliche Proben für Genexpressionsanalysen entnommen. Ein Teil der Proben wurde in RNA later konserviert.

Im Institut für Pathologie der Medizinischen Universität Graz wurden die Proben bei -80°C eingefroren und aufbewahrt bis zum Versand in das M.D. Anderson Cancer Center, TX, USA.

Die diagnostische Stanzbiopsie wurde im jeweiligen pathologischen Institut histologisch aufgearbeitet. Konnte ein HER2-negatives Mammakarzinom unter Berücksichtigung der Einschlusskriterien verifiziert werden, wurde die Patientin in die Studie eingeschlossen. Nach genauer Dokumentation von Tumor und Lymphknoten mittels Bildgebung und klinischer Untersuchung wurde eine sequentielle anthrazyklin- und taxanhältige neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt. Nach Abschluss der Chemotherapie wurde das Ansprechen des Tumors wiederum mittels Bildgebung untersucht um über die Art der endgültigen chirurgische Therapie zu entscheiden (Mastektomie oder brusterhaltende Therapie). Das Operationspräparat (Tumor und Lymphknoten) wurde danach am jeweiligen Institut für Pathologie histopathologisch untersucht.

Im M.D. Anderson Cancer Center wurden die Untersuchung der Menge und Qualität der extrahierten RNA, Genexpressionsanalysen mit Microarrays (Affymetrix U133) sowie die Kalkulation der Chemosensitivität an Gefrierproben durchgeführt.

Die Datendokumentation erfolgte in einer für die AGO-35 erstellten elektronischen Datenbank.

Dazu wurden folgende klinische, radiologische und histopathologische Daten eingegeben:

- Menopausenstatus
- Größter Durchmesser des Tumors in der Bildgebung (Mammografie, Sonografie, Magnetresonanz)
- Histologie der Tumorbiopsie (Hormonrezeptorstatus, histopathologischer Tumortyp, Differenzierungsgrad)
- Klinischer Lymphknotenstatus
- Wahl und Durchführung der neoadjuvanten Chemotherapie

- Ansprechen des Tumors und Lymphknoten mittels Bildgebung und Untersuchung auf die Chemotherapie
- Art des Operationsverfahrens (Brusterhaltung vs. Mastektomie und Sentinel Node Biopsie vs. Axillendissektion)
- Histologische Aufarbeitung des Operationspräparates
- Nachbehandlungen
- Medikamentöse Therapien
- Nachbeobachtung: Rezidiv, Metastasierung, Tod durch das Mammakarzinom

2.3 Patientinnenkollektiv

Einschlusskriterien der Studie:

- Einverständniserklärung der Patientin über zusätzliche Tumorbiopsien zur weiteren Untersuchung im M.D. Anderson Cancer Center sowie der Tumordokumentation in der Datenbank
- Verfügbarkeit des klinischen sowie sonografischen Lymphknotenstatus vor der Therapie
- Frauen mit Mammakarzinom > 18 Jahre
- Histopathologischer Befund eines HER2 negativen, invasiven Mammakarzinoms, T1-4, M0 (nicht-inflammatorisches T4c)
- Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie aufgrund Tumormasse > 20 mm, ungünstiger Tumor-Brust-Korrelation, High-grade-Tumor, klinisch positiver Lymphknoten in der Axilla
- 3-wöchentliche anthrazyklinhaltige neoadjuvante Chemotherapie (3-4 Zyklen) gefolgt von Taxanen (3-4 Zyklen)

Ausschlusskriterien der Studie:

- Sentinel-Lymphknoten-Biopsie vor der neoadjuvanten Chemotherapie
- HER2 positives Mammakarzinom (Amplifikation oder 3+ Score)
- Vorangegangene Diagnose eines invasiven oder metastatischen Mammakarzinoms
- Vorangegangene Teilexzision des Mammakarzinoms
- Vorangegangene kontralaterale Lymphknotenbiopsien aufgrund eines Mammakarzinoms
- Unmöglichkeit der Durchführung einer Stanzbiopsie
- Metastasiertes Mammakarzinom
- Inflammatorisches Mammakarzinom (T4d)

2.4 Datenverarbeitung und statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurde die Statistiksoftware SAS verwendet. Demographische und klinische Daten wurden mittels deskriptiver statistischer Methoden berechnet.

Zur Berechnung der medianen Tumorgöße wurden die größten Durchmesser des Tumors jeder Patientin erhoben und mittels deskriptiver Statistik der Median berechnet.

Um die RNA-Menge und Qualität zweier verschiedener Biopsie-Nadeln zu vergleichen wurde der Mann-Whitney-U Test durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein nonparametrisches Verfahren, bei dem zur deskriptiven Darstellung der Median und die interquartilen Ränge P25 und P75 verwendet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistiken

3.1.1 Patientinnen/Tumor Charakteristika

Diese Teilstudie der AGO-35 beinhaltet nicht die gesamte Stichprobe. Insgesamt wurden 55 Patientinnen in die Studie eingeschlossen. Dabei handelt es sich ausschließlich um weibliche Patientinnen mit einem Mammakarzinom. Bei einer Patientin konnten die histopathologischen Parameter des Tumors sowie die Tumorgöße nicht erhoben werden.

26 Patientinnen weisen einen Östrogenrezeptor-positiven (47%) und 16 Patientinnen einen Progesteronrezeptor-positiven Tumor (35%) auf. 9 Patientinnen sind HER2-positiv (16%).

Bei allen Patientinnen wurde nach der Biopsie eine histopathologische Untersuchung durchgeführt, um den histologischen Subtyp und den Differenzierungsgrad zu bestimmen. Bei 53 Patientinnen handelt es sich um ein invasiv duktales Karzinom (96%) und bei einer Patientin um einen muzinösen Tumor (2%).

2 Patientinnen weisen einen G1-Tumor auf (4%), 16 Patientinnen einen G2-Tumor (29%) und 26 Patientinnen einen G3-Tumor (65%).

Zur Berechnung der medianen Tumorgöße wurde der größte Durchmesser in Millimeter des Primärtumors in der radiologischen Bildgebung verwendet. Bei N=54 zeigte sich ein maximaler Tumordurchmesser von 100mm und ein minimaler Durchmesser von 10mm. Die mediane Tumorgöße beträgt 31mm.

	Häufigkeit	Prozent	Kumulierte Häufigkeit	Kumulierte Prozente		
Östrogen Rezeptoren						
negativ	28	51	29	53		
positiv	26	47	55	100		
Progesteron Rezeptoren						
negativ	35	64	36	65		
positiv	19	35	55	100		
HER2neu Rezeptoren						
negativ	45	82	46	84		
positiv	9	16	55	100		
Histologischer Subtyp						
Invasiv duktal	53	96	54	98		
Anders	1	2	55	100		
Differenzierungsgrad						
G1	2	4	3	5		
G2	16	29	19	35		
G3	36	65	55	100		
Tumorgröße						
	N	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum
	54	40.8	22.6	31.0	10.0	100.0

Tabelle 4: Patientinnen/Tumor Charakteristika

3.1.2 Verwendete Biopsienadeln

Bei diesen Patientinnen mit Verdacht auf Mammakarzinom wurde zur histologischen Sicherung eine Stanzbiopsie durchgeführt. Dabei wurde entweder die Bard® oder die Climed® 14-Gauge Nadel verwendet.

Die Bard® Nadel wurde bei 39 Patientinnen verwendet (71%), die Climed® Nadel bei 16 Patientinnen (29%).

Nadel	Häufigkeit (%)
Bard® Nadel	39 (71)
Climed® Nadel	16 (29)

Tabelle 5: Verwendete Nadeln

3.1.3 RNA Charakteristika

Die RNA Charakteristika wurden unabhängig von der verwendeten Biopsienadel über alle Gewebeproben hinweg untersucht.

Der mediane Wert der RNA Integrity Number misst 8.9. Der minimale RIN Wert liegt bei 5.1 und der maximale RIN Wert bei 9.6.

Der mediane Wert des RNA Quotienten 260/280 beträgt 2.1, wobei das Minimum 2.0 und das Maximum 1012.1 misst.

Der mediane Wert der RNA Konzentration misst 238.1 ng/μL. Die minimale Konzentration beträgt 2.0 und die maximale Konzentration 1248.3 ng/μL.

Der mediane Wert der RNA Menge beträgt 12.3 μg. Die minimale Menge liegt bei 1.2 und die maximale Menge bei 49.9 μg.

	N	Mittelwert	Std	Median	25. Pctl	75. Pctl	Min	Max
RIN	39	8.6	1.0	8.9	8.4	9.2	5.1	9.6
RNA 260/280	55	104.1	246.0	2.1	2.0	2.1	2.0	1012.1
RNA Konzentration ng/μL	55	251.8	237.1	238.1	68.2	352.1	2.0	1248.3
RNA Menge in μg	55	14.2	10.2	12.3	6.7	17.5	1.2	49.9

Tabelle 6: RNA Charakteristika: N = Gesamtzahl, Std. = Standardabweichung, 25./75. Pctl = 25./75. Percentile, Min = Minimum, Max = Maximum

3.1.4 Deskriptive Statistiken nach Biopsienadel und Vergleiche

Die Vergleiche der Bard®- und Climed® Nadel mit der RIN, des RNA Quotienten OD260/OD280, der RNA Konzentration und der RNA Menge zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Nadeln in der RNA Konzentration (P = 0.0323).

		N	NMiss	Mean	Std	Median	P25	P75	Min	Max	p
RIN	Nadel										
	Bard®	23	16	8.4	1.1	8.9	7.8	9.2	5.1	9.5	0.3984
	Climed®	16	0	8.8	0.7	9.0	8.4	9.3	7.1	9.6	
RNA 260:280	Nadel										
	Bard®	39	0	146	283	2.1	2	270	2.0	1012	0.8160
	Climed®	16	0	2.1	0.0	2.1	2.1	2.1	2.0	2.1	
RNA Konz. in ng/μL	Nadel										
	Bard®	39	0	221	245	199	2.1	349	2.0	1248	0.0323
	Climed®	16	0	326	206	326	137	448	44.3	728	
RNA Menge in μg	Nadel				10.						
	Bard®	39	0	14.6	9	11.8	7.9	17.5	1.2	49.9	0.9335
	Climed®	16	0	13.1	8.3	13.0	5.5	17.9	1.8	29.1	

Tabelle 7: Deskriptive Statistiken nach Nadel und Vergleiche: N = Gesamtzahl, NMiss = fehlende Daten, Mean = Durchschnitt, Std = Standardabweichung, P25/P75 = interquartile Ränge, Min = Minimum, Max = Maximum

3.2 RNA Integrity Number (RIN)

Der Median der RNA Integrity Number der Bard Nadel liegt bei 8.9 mit einem Minimum bei 5.1 und einem Maximum bei 9.5.

Der Median der RNA Integrity Number der Climed Nadel liegt bei 9.0 mit einem Minimum bei 7.1 und einem Maximum bei 9.6.

Der Vergleich beider Nadeln mit der RIN zeigte kein signifikantes Ergebnis ($P = 0.3984$).

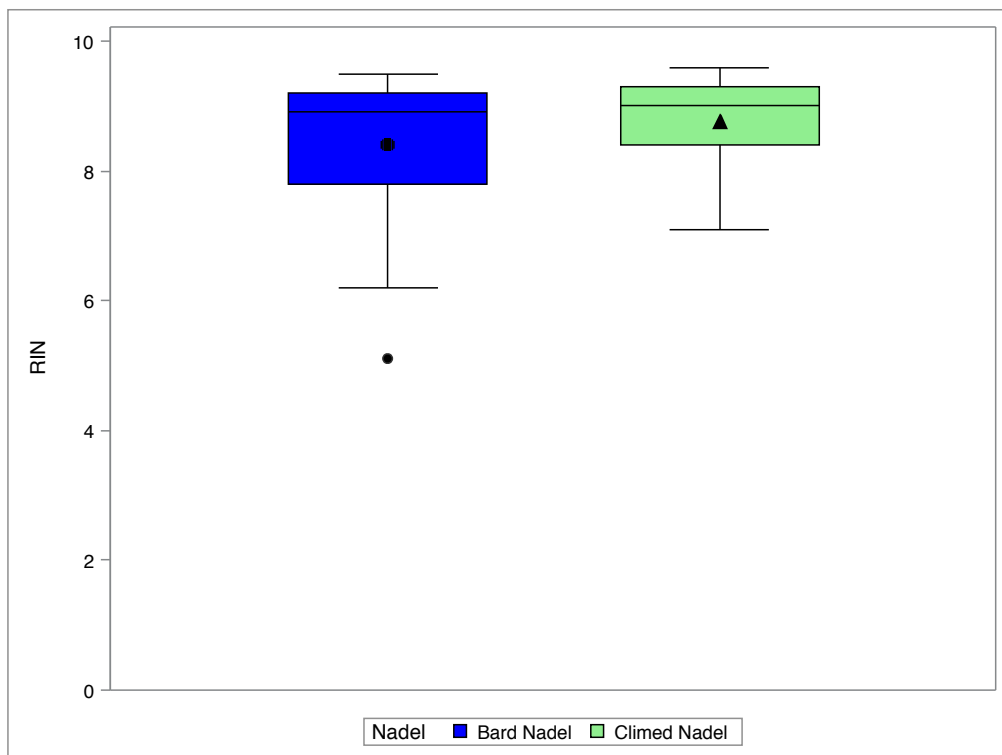


Abbildung 8: Boxplot RNA Integrity Number: Die horizontale Linie repräsentiert den Median, die Box die 25. – 75. Perzentile. Die horizontalen Kappen zeigen 10% und 90% an.

3.3 RNA Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀

Der Median des RNA Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ der Bard Nadel liegt bei 2.1 mit einem Minimum bei 2.0 und einem Maximum bei 1012.

Der Median des RNA Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ der Climed Nadel liegt bei 2.1 mit einem Minimum bei 2.0 und einem Maximum bei 9.5.

Der Vergleich beider Nadeln mit dem RNA Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ zeigte kein signifikantes Ergebnis (P = 0.8160).

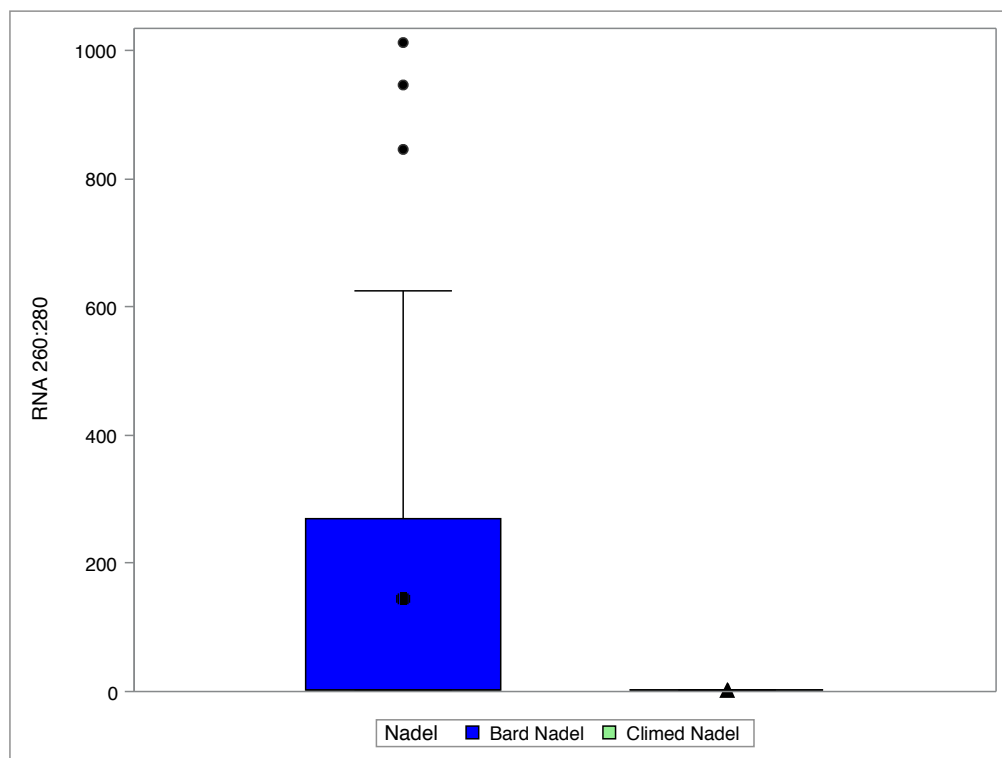


Abbildung 9: Boxplot RNA Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀: Die horizontale Linie repräsentiert den Median, die Box die 25. – 75. Perzentile. Die horizontalen Kappen zeigen 10% und 90% an.

3.4 RNA Konzentration

Der Median der RNA Konzentration der Bard Nadel liegt bei 199 ng/μL mit einem Minimum bei 2 und einem Maximum bei 1248 ng/μL.

Der Median der RNA Konzentration der Climed Nadel liegt bei 326 ng/μL mit einem Minimum bei 44.3 und einem Maximum bei 728 ng/μL.

Der Vergleich beider Nadeln mit der RNA Konzentration zeigte ein signifikantes Ergebnis ($P = 0.0323$).

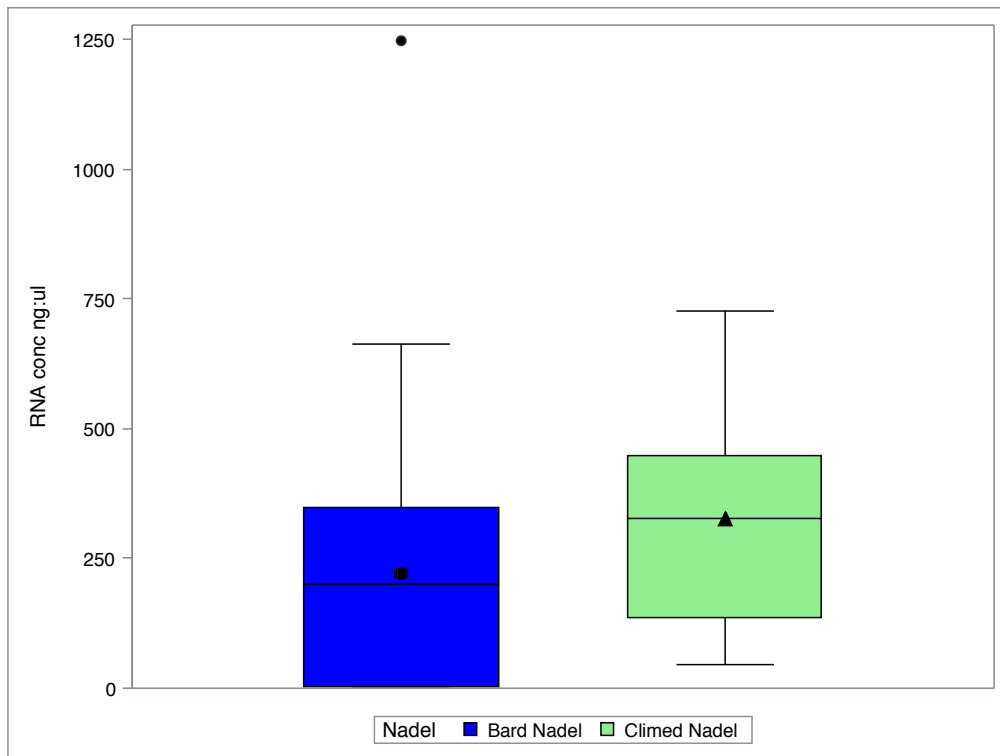


Abbildung 10: Boxplot RNA Konzentration in ng/μL: Die horizontale Linie repräsentiert den Median, die Box die 25. – 75. Perzentile. Die horizontalen Kappen zeigen 10% und 90% an.

3.5 RNA Menge

Der Median der RNA Menge in der Bard Nadel liegt bei 11.8 mit einem Minimum bei 1.8 und einem Maximum bei 49.9 μg .

Der Median der RNA Menge in der Climed Nadel liegt bei 13.0 mit einem Minimum bei 1.8 und einem Maximum bei 29.1 μg .

Der Vergleich beider Nadeln mit der RNA Menge zeigte kein signifikantes Ergebnis ($P = 0.9335$).

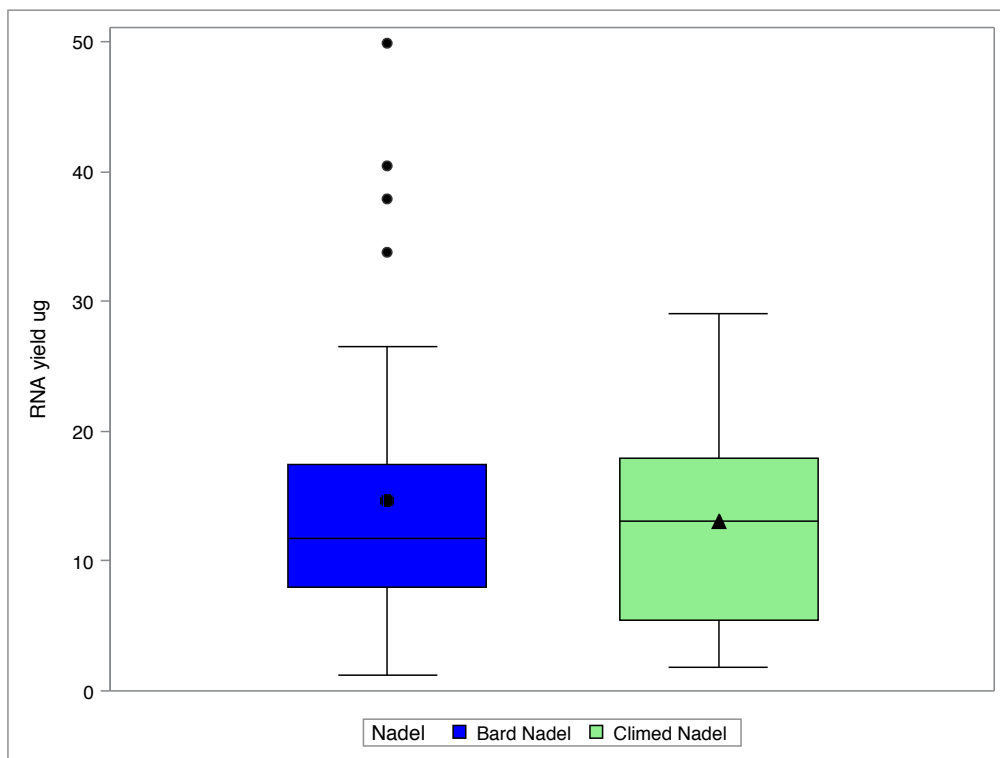


Abbildung 11: Boxplot RNA Menge in μg : Die horizontale Linie repräsentiert den Median, die Box die 25. – 75. Perzentile. Die horizontalen Kappen zeigen 10% und 90% an.

4 Diskussion

Die Gewinnung der RNA aus Gewebeproben ist seit Jahren ein gängiges Verfahren für molekularbiologische Untersuchungen. Durch die Analyse von Genexpressionsprofilen verschiedener Mammakarzinome konnten molekulare Subtypen identifiziert werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Prognose und ihrem Ansprechen nach neoadjuvanter systemischer Therapie. (6,7) Die Gewinnung der RNA aus Mammabiopsien zielt darauf ab, Genexpressionstests zu entwickeln, welche eine genauere prognostisch/prädiktive Information als die klinisch-pathologischen Faktoren wie Tumorgröße oder Hormonrezeptor- und HER2-Status und axillärer Lymphknotenstatus darstellen.

Genexpressionssignaturen arbeiten mit RT-PCR (Real-time PCR) oder Microarraytechnik und liefern besser reproduzierbare Ergebnisse als die konventionelle Immunhistochemie. (11) Die derzeit kommerziell erhältlichen Produkte sind beispielsweise EndoPredict®, MammaPrint®, Oncotyp DX® oder Prosigna® (PAM 50).

Der MammaPrint® Test unterscheidet im Ergebnis zwischen niedrigem und hohem Risiko und kann durch die Risikoeinschätzung zur Reduktion von Chemotherapien bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom mit niedrigem Risiko führen. Der Nachteil ist, dass die Proben zentral ausgewertet werden und nach Amsterdam oder die USA geschickt werden müssen und dadurch keine Überprüfbarkeit gegeben ist. Der Oncotyp DX® Test unterscheidet zwischen niedrigem, intermediärem und hohem Risiko. Der Vorteil des Prosigna® und Endopredict® Test ist die Möglichkeit der Aufarbeitung an Paraffinschnitten in molekularpathologischen Laboren vor Ort. Weiters sind die Testergebnisse schneller verfügbar und überprüfbar. Außerdem ermöglicht die Hinzunahme von Tumorgröße und Nodalstatus die Abgrenzung einer Niedrigrisikogruppe auch unabhängig von anderen klinisch-pathologischen Risikoklassifikationen. (11,39)

Größter Nachteil aller verfügbaren Genexpressionstest ist die schlechte Spezifität.

Die S3-Leitlinien empfehlen den Einsatz dieser Genexpressionstests aus derzeitiger Sicht in Einzelfällen zur Identifikation von Patientinnen mit sehr guter Prognose, die ein ungünstiges Nutzen-Risiko-Verhältnis aufweisen. Weiters bei „Borderline“ Patientinnen, wie beispielsweise die Kombination der histopathologischen Parameter G1 N1. In der Praxis scheint ein Genexpressionstest dann sinnvoll zu sein, wenn die Frage ob eine Chemotherapie durchgeführt werden sollte unschlüssig diskutiert wird. (40)

Im Gegensatz zu den prognostischen Tests wird in der AGO-35 ein prädiktiver genomischer Test validiert. Durch die Kalkulation der Chemosensitivität kann eine Vorhersage über das Ausmaß des Tumoransprechens in den axillären Lymphknoten getroffen werden. Bei Patientinnen mit Tumoren, die anhand des genomischen Tests eine Chemosensitivität aufweisen, könnte auf eine axilläre Dissektion (ALND) verzichtet werden. Umgekehrt könnte bei Patientinnen mit Tumoren, die als nicht-chemosensitiv klassifiziert werden und daher ein schlechtes Tumoransprechen zeigen, eine zusätzliche adjuvante systemische Therapie notwendig sein. Die Gewinnung der RNA in ausreichender Qualität und Quantität stellt die Grundlage für die Kalkulation der Chemosensitivität dar.

Ziel dieser Arbeit war es bei 55 Patientinnen mit einem HER2-negativen Mammakarzinom, die vor der neoadjuvanten Chemotherapie eine Tumorbiopsie erhalten haben, die vorliegende RNA auf Qualität und Quantität zu testen. Die Biopsie wurde mit zwei verschiedenen Nadeln, der Bard® und Climed® 14-Gauge Nadel, durchgeführt. Die Ergebnisse der extrahierten RNA zeigen inwiefern sich beide Nadeln unterscheiden.

Die RNA, die aus der Probe isoliert werden konnte, dient als Ausgangsmaterial für weitere molekularbiologische Analysen. Die Analyse der isolierten RNA bietet dann den großen Vorteil, dass sie eine Aussage zum „Status quo“ der Genexpression jener Zellen liefern kann. Das ist aber nur möglich, wenn die gewonnene RNA auch den Qualitätskriterien für weitere Analysen genügt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA Integritätszahl als Faktor für den Grad der Degradierung der RNA bestimmt. Weiters wurde die Reinheit der RNA, die Menge der RNA in μg und die Konzentration in $\text{ng}/\mu\text{L}$ bestimmt.

Die RNA Charakteristika zeigen, dass sowohl die Bard® als auch die Climed® Nadel ähnliche Mengen an Gesamt RNA liefern. Die mittlere RNA Menge der Bard® Nadel liegt bei $11.8 \mu\text{g}$ und die der Climed® Nadel bei $13.0 \mu\text{g}$. Der mittlere Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ als Faktor für die Reinheit der isolierten RNA war mit 2.1 bei beiden Nadeln ident. Der mittlere RIN-Wert der Bard® Nadel ist mit 8.9 zu dem der Climed® Nadel mit 9.0 sehr ähnlich. Der RIN-Wert konnte jedoch nur in 59 % der Tumorbiopsien beurteilt werden. Die mittlere Konzentration der RNA pro μL lag bei der Bard® Nadel bei $199 \text{ ng}/\mu\text{L}$ und bei der Climed® Nadel bei $326 \text{ ng}/\mu\text{L}$, was einen signifikanten Unterschied bringt.

Zusammenfassend demonstriert diese Studie, dass sich die Menge, Reinheit und Qualität von isolierter RNA bei den beiden verwendeten Nadeln nicht unterscheiden. Bezüglich der Konzentration lässt sich aber ein signifikant höherer mittlerer Wert mit der Climed® Nadel erreichen.

Hatzis et. al. berichteten 2011 von einer Mindestmenge von 1 µg und einem Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ von > 1,8 für die Eignung von Proben für Genexpressionsanalysen. (30) Diese Kriterien wurden bei 100% der Proben in dieser Studie erfüllt. Inwiefern die Konzentration einen Qualitätsunterschied in nachfolgenden Analysen der extrahierten RNA bringt, müssten weitere Tests und Studien zeigen.

Eine Möglichkeit die RNA Bestimmungen zu optimieren wäre die Verwendung eines Fluoreszenz Farbstoffes statt der photometrischen Methode. Mittels Fluoreszenz lassen sich Nukleinsäuren indirekt nachweisen. Der Vorteil ist, dass die Farbstoffe spezifisch an die jeweilige Nukleinsäure binden und RNA in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden kann. Als Farbstoff für die RNA als Zielmolekül dient zum Beispiel RiboGreen®, welches einen Messbereich von 1-1000 ng/mL besitzt. Diese Methode besitzt eine höhere Spezifität und ist um den Faktor 1000-100000 sensitiver als die herkömmliche Methode mittels photometrischer Messung. (36)

Literaturverzeichnis

1. Statistik Austria.
https://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/krebskrankungen/brust/index.html; Aufgerufen am 20/01/18.
2. Fischer U, Baum F. Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. Göttingen: Thieme Verlag; 2014, p. 20, 34.
3. Petru E, Jonat W, Fink D, Köchli O. Praxisbuch Gynäkologische Onkologie. 4. Auflage Heidelberg: Springer Medizin; 2014, p. 4, 6.
4. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Pathologie. 4. Auflage. München, Jena: Urban & Fischer Verlag; 2008.
5. Wagener Ch, Müller O. Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte. Thieme Verlag, 2010. p. 40, 51, 52, 87, 165-172.
6. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, u. a. Molecular portraits of human breast tumours. Nature [Internet]. 17. August 2000;406:747. Verfügbar unter: <http://dx.doi.org/10.1038/35021093>
7. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, u. a. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci U S A. September 2001;98(19):10869–74.
8. Dai X, Li T, Bai Z, Yang Y, Liu X, Zhan J, u. a. Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends. Am J Cancer Res [Internet]. 15. September 2015;5(10):2929–43. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26693050>
9. Chen H, Wu J, Zhang Z, Tang Y, Li X, Liu S, u. a. Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A Meta-Analysis. Front Pharmacol. 2018;9:909.
10. Network TCGA, Koboldt DC, Fulton RS, McLellan MD, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, u. a. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature [Internet]. 23. September 2012;490:61. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nature11412>
11. Scharl A. AGO - Aktuelle Empfehlungen zur Prävention, Diagnostik und Therapie primärer und fortgeschrittener Mammakarzinom. 6. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag; 2013, p. 55, 152-162.
12. Fisher B, Brown A, Mamounas E, Wieand S, Robidoux A, Margolese RG, u. a. Effect of preoperative chemotherapy on local-regional disease in women with operable breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. J Clin Oncol. Juli 1997;15(7):2483–93.

13. Wolmark N, Wang J, Mamounas E, Bryant J, Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2001;(30):96–102.
14. von Minckwitz G, Untch M, Nuesch E, Loibl S, Kaufmann M, Kummel S, u. a. Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res Treat.* Jänner 2011;125(1):145–56.
15. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, u. a. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst.* Februar 2000;92(3):205–16.
16. Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. *Kompendium Internistische Onkologie.* Springer Verlag; 2005, p. 2521.
17. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer J-U, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, u. a. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol.* Mai 2012;30(15):1796–804.
18. Boughey JC, McCall LM, Ballman K V, Mittendorf EA, Ahrendt GM, Wilke LG, u. a. Tumor biology correlates with rates of breast-conserving surgery and pathologic complete response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: findings from the ACOSOG Z1071 (Alliance) Prospective Multicenter Clinical Trial. *Ann Surg.* Oktober 2014;260(4):606–8.
19. Harbeck N. *Zielgerichtete Therapien beim Mammakarzinom.* Schattauer Verlag; 2014, p. 51.
20. Guarneri V, Frassoldati A, Bottini A, Cagossi K, Bisagni G, Sarti S, u. a. Preoperative chemotherapy plus trastuzumab, lapatinib, or both in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer: results of the randomized phase II CHER-LOB study. *J Clin Oncol.* Juni 2012;30(16):1989–95.
21. Gianni L, Pienkowski T, Im Y-H, Roman L, Tseng L-M, Liu M-C, u. a. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* Jänner 2012;13(1):25–32.
22. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, u. a. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast

- cancer. *J Clin Oncol.* März 2008;26(8):1275–81.
23. Hahnen E, Lederer B, Hauke J, Loibl S, Krober S, Schneeweiss A, u. a. Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer: Secondary Analysis of the GeparSixto Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* Oktober 2017;3(10):1378–85.
 24. Stueber TN, Weiss CR, Woeckel A, Haeusler S. Influences of adjuvant treatments in hormone receptor positive breast cancer on receptor conversion in recurrent breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* Februar 2019;299(2):533–41.
 25. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, u. a. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* August 2005;11(16):5678–85.
 26. Becker C, Riedmaier I, Pfaffl M. RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BioSpektrum.* 2009;15(5):512–515.
 27. Dobbe E, Gurney K, Kiekow S, Lafferty JS, Kolesar JM. Gene-expression assays: new tools to individualize treatment of early-stage breast cancer. *Am J Health Syst Pharm.* Jänner 2008;65(1):23–8.
 28. Murken J, Grimm T, Holinski-Feder E, Zerres K. Taschenlehrbuch Humangenetik. Thieme Verlag, 2011, p. 29, 104.
 29. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, u. a. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Juli 2008;105(30):10513–8.
 30. Hatzis C, Sun H, Yao H, Hubbard RE, Meric-Bernstam F, Babiera G V, u. a. Effects of tissue handling on RNA integrity and microarray measurements from resected breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* Dezember 2011;103(24):1871–1883.
 31. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, u. a. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* April 2009;55(4):611–22.
 32. Mueller O; Lightfoot S; Schroder A. RNA Integrity Number (RIN) - Standardization of RN Quality Control. Agilent Technologies. 2016;
 33. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, u. a. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* Jänner 2006;7:3.
 34. Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, u. a. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Res.* März 2005;33(6):e56.

35. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. April 2010;50(4):237–43.
36. Armbrecht M; Gloe J; Goemann W. Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentrationen mittels Fluoreszenz-Farbstoffen im Eppendorf BioSpectrometer ® fluorescence. Eppendorf Application Note No271. 2013;
37. Manurishi N, Peintinger F, Sieghartsleitner E, Klaassen F, Reitsamer R, Kolberg HC, u. a. Accuracy of surgical opinion case report forms to predict type of axillary surgery after neoadjuvant chemotherapy in the AGO-35 trial. *Senologie - Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 2018; 15(02): e34-e35 DOI: 10.1055/s-0038-1651768.
38. Peintiger F, Kühn T, Schermann C, Regitnig P, Moinfar F, Sauseng S, u. a. AGO Austria-35: Prospektive Validierung der genomischen Signaturen zur Erfassung der Chemosensitivität der axillären Lymphknoten nach neoadjuvanter Chemotherapie beim HER2 negativem Mammakarzinom. Mai 2015 *Senol Zeitschrift für Mammadiagnostik und -therapie* 12(02) DOI 101055/s-0035-1550554.
39. Dubsy P, Filipits M, Jakesz R, Rudas M, Singer CF, Greil R, u. a. EndoPredict improves the prognostic classification derived from common clinical guidelines in ER-positive, HER2-negative early breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. März 2013;24(3):640–7.
40. S3 Leitlinien Mammakarzinom. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mammakarzinom_4_0/Version_4.1/LL_Mammakarzinom_Kurzversion_4.1.pdf; Aufgerufen am 01/02/19.