Aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Prof. Dr. med. G. Sauter

Prävalenz der Amplifikation des Östrogen Rezeptor-Gens (ESR1) bei primären Mammakarzinomen und deren Lymphknotenmetastasen

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Ann-Kathrin Nottbohm aus Hamburg Hamburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 16.10.2013 Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Guido Sauter Prüfungsausschuss, 2. Gutachter(in): PD Dr. Ronald Simon Prüfungsausschuss, 3. Gutachter(in): PD Dr. Isabell Witzel

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	3
THERAPIE DES MAMMAKARZINOMS	3
OPERATIVE THERAPIE	3
Systemische Therapie	4
ENDOKRINE THERAPIE	4
GENSPEZIFISCHE THERAPIE	6
GENETIK DES MAMMAKARZINOMS	7
KANZEROGENESE	8
AMPLIFIKATION	9
METHODEN ZUM NACHWEIS VON AMPLIFIKATIONEN	10
HER2	11
ER UND ESR1	11
HETEROGENITÄT UND METASTASIERUNG	12
ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG	17
MATERIAL UND METHODEN	18
MAMMAKARZINOM NODAL METASTASEN ARRAY	18
FISH ANALYSE	20
PBAC-E COLI-KLON KULTIVIERUNG	21
DNA EXTRAKTION	21
DIG-NICK TRANSLATION	21
ENTPARAFEINIERUNG UND PROTEOLYTISCHE VORBEHANDLUNG	23
HYBRIDISIERUNG	23
WASCHEN	23
DETEKTION	24
AUSWERTING	25
IMMUNHISTOCHEMIE	26
ERGEBNISSE	27
ASSOZIATION ZWISCHEN FISH UND IHC	27
	27
ESPI STATUS IN DDIMÄDEN UND METASTASIEDTEN MAMMAKADZINOMEN	29
	22
	52
	34
LIMPHRNOIENMEIASIASEN	34
DISKUSSION	37
ZUSAMMENFASSUNG	42
LITERATURVERZEICHNIS	44
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	<u>53</u>
DANKSAGUNG	54
LEBENSLAUF	55
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	56

Einleitung

Mit 1,38 Millionen neu diagnostizierten Fällen im Jahr 2008 ist das Mammakarzinom die häufigste maligne Erkrankung der Frau weltweit (Ferlay et al. 2008). Unterschiede bezüglich der Inzidenzrate bestehen im Hinblick auf den Entwicklungstand einzelner Regionen. So ist die Inzidenzrate in hoch entwickelten Regionen der Welt (außer Japan) mit mehr als 80/100000 Fällen höher als in niedrig entwickelten Regionen mit weniger als 40/100000 Fällen (Ferlay et al. 2008). Fortschritte in der Therapie und eine frühere Diagnosestellung durch Früherkennungsuntersuchungen führten zur Senkung der Mortalitätsrate des Mammakarzinoms (Youlden et al. 2012) Nach wie vor ist es aber die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen (Ferlay et al. 2008).

Zu den wichtigsten Risikofaktoren des sporadischen Mammakarzinoms zählen reproduktive und hormonelle Faktoren. Eine frühe Menarche, eine späte Menopause, ein hohes Alter bei der ersten ausgetragenen Schwangerschaft, sowie Nulliparität gehören zu den Risikofaktoren (Kelsey et al. 1993). Auch die externe Hormonzufuhr, zum Beispiel im Rahmen einer langjährigen Hormonersatztherapie, wie sie zur Reduzierung von klimakterischen Beschwerden eingesetzt wird, ist assoziiert mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko, wobei das Risiko bei Kombinationspräparaten (Östrogen und Progesteron) höher ist als bei Östrogenmonopräparaten (Ross et al. 2000). Als protektive Faktoren werden die bilaterale Ovarektomie vor der Menopause und eine langjährige Laktaktion gewertet (Kelsey et al. 1993).

Reproduktive und hormonelle Risikofaktoren sind assoziiert mit Östrogen- und Progesteronrezeptor positiven Mammakarzinomen (Yang et. al. 2010), wodurch die Bedeutung von Östrogenen in der Kanzerogenese des Mammakarzinoms unterstrichen wird.

Therapie des Mammakarzinoms Operative Therapie

In der Therapie des Mammakarzinoms nimmt die operative Entfernung des Tumors eine wichtige Rolle ein. Ziel ist die komplette operative Entfernung des Tumorgewebes. Hinsichtlich der Überlebensrate besteht dabei kein Unterschied zwischen einer brusterhaltenen Therapie (BET) mit anschließender obligater Radiatio und der modifizierten radikalen Mastektomie unter Einhaltung bestimmter klinischer und histologischer Parameter (van Dongen et al. 2000). Die Bestimmung des histologischen Nodalstatus ist Bestandteil der operativen Therapie. Hierfür eignet sich die Sentinellymphnodektomie, deren Ziel es ist, die nodal negativen Patientinnen zu identifizieren. Diese ist als gleichwertig mit der Axilladissektion anzusehen (Palesty et al. 2006), weist aber eine signifikant niedrigere Morbidität auf (Fleissig et al. 2006).

Systemische Therapie

Mit dem Wandel der operativen Therapie von radikalen Operationstechniken hin zu brusterhaltenen Verfahren haben systemische Therapien mehr an Bedeutung gewonnen. Eine systemische Therapie in Form von Chemotherapie, endokriner Therapie oder Antikörperbehandlung kann sowohl adjuvant als auch neoadjuvant erfolgen. Auch in der Therapie des Lokalrezidives und des metastasierten Mammakarzinoms spielt sie eine wichtige Rolle. Durch systemische Therapien kann das Rezidivrisiko und die Mortalität reduziert werden (EDCTCG 2005).

Endokrine Therapie

Der Östrogenrezeptor (ER) ist in 75 % der Mammakarzinome überexprimiert (Hopp & Fuqua 1998). Aufgrund der Häufigkeit der ER Überexpression, wird dieser zu einem verbreiteten therapeutischen Ziel beim Mammakarzinom. Bekannte antihormonale Behandlungsstrategien bei ER positiven Mammakarzinomen beinhalten Arzneimittelstrategien, die ER Signalwege blockieren, indem sie an die katalytische Seite des Rezeptors binden (Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren(SERMs)), Pharmaka, die ER destabilisieren und abbauen (*selective ER-downregulators*, (SERDs) und Pharmaka, die die Östrogensynthese unterbrechen (Aromatasehemmer) (Buijs et al. 2008).

Zu den bekanntesten SERMs gehören Tamoxifen, Toremifen und Raloxifen.

SERMs haben gewebespezifische agonistische und antagonistische Östrogenwirkungen. Tamoxifen übt seine agonistische Wirkung über die transkriptonelle Aktivierungsfunktion 1 (AF-1) aus und seine antagonistische Wirkung über die Aktivierungsfunktion 2 (AF-2) (Parker et al. 1993). Estradiol, SERMs und SERDs stabilisieren unterschiedliche AF-2 Konformationen, die von rein agonistischer bis hin zu rein antagonistischer Wirkung reichen (Aktories et al. 2009).

Tamoxifen ist das am längsten eingesetzte Medikament in der endokrinen Therapie des Mammakarzinoms. Es hat eine östrogenantagonistische Wirkung am Brustgewebe und eine agonistische Wirkung am Endometrium, welche das erhöhte Risiko zur Entwicklung von Endometriumhyperplasien und – Karzinomen erklärt (Polin & Ascher 2008). Häufige Nebenwirkungen wie Hitzewallungen und Stimmungsschwankungen begründen sich durch den Entzug der östrogenen Wirkung (Perez 2007).

Unter Tamoxifen- oder Aromatasehemmer- Therapie lässt sich teilweise eine Resistenzentwicklung beobachten. So erleiden ein Drittel der Frauen, die mit Tamoxifen für 5 Jahre behandelt wurden, innerhalb von 15 Jahren ein Rezidiv (EBCTCG 2005). Bekannte Mechanismen der endokrinen Resistenzentwicklung sind der Verlust der ER α Expression und Expression von ERα eingeschränkten Isoformen von und ERβ, posttranslationale Modifizierungen von ER α , eine gesteigerter Aktivität des Aktivator Protein 1 (AP 1) und die Deregulation von ER Co - Aktivatoren (Musgrove & Sutherland 2009). Daneben gibt es noch weitere Substanzgruppen, die in der endokrinen Therapie bei postmenopausalen Mammakarzinomen eingesetzt werden. Das Wirkprinzip von Aromatasehemmern besteht in der Blockierung der Östrogensynthese. Zu den Aromatasehemmern der 3. Generation gehören Anastrozol, Letrozol und Exemestan, welche in der Potenz und in der Selektivität wirksamer sind als Aromatasehemmer der 1. und 2. Generation (Aktories et al. 2009). Die meisten Nebenwirkungen wie Hitzewallungen werden ähnlich wie bei Tamoxifen durch den Entzug von Östrogen verursacht. Zusätzlich treten aufgrund der fehlenden partiellen östrogenen Wirkung häufiger eine Abnahme der Knochendichte und Athralgien auf (Cella & Fallowfield 2008). Diese teilweise erheblich die Lebensqualität beeinflussenden Nebenwirkungen sind einer der Hauptgründe für eine verminderte Compliance in der endokrinen Therapie (Hadji 2010).

Weitere Therapeutika sind Gonadotropin Releasing-Hormon (GnRH) Analoga, die bei prämenopausalen Mammakarzinomen, auch in Kombination mit Tamoxifen, angewandt werden. Zu den neueren Therapeutika der endokrinen Therapie gehört der Östrogenrezeptorantagonist Fulvestant (Faslodex). Dessen Affinität zum Östrogenrezeptor ist höher als die von Tamoxifen. Fulvestant führt zur Herunterregulation der Expression des ER, vermindert die Aktivität des

5

Progesteron Rezeptors (PgR), reduziert die Proliferation und den Zellumsatz. Fulvestrant wird beim tamoxifenresistenten metastasierten Mammakarzinom eingesetzt (Robertson et al. 2005). Die endokrine Therapie mit Tamoxifen über zeigt bei hormonrezeptorpositiven Mammakarzinomen 5 Jahre aute Behandlungserfolge. Die Rezidivrate sinkt um 40 %, die Sterblichkeit um 31% (EDCTCG 2005). Neuere Studien zeiaen die Überlegenheit von Aromatasehemmern bei postmenopausalen Frauen, so dass entweder eine Behandlung primär oder anschließend erfolgen kann (Cuzick et al. 2010).

Genspezifische Therapie

Ein weiterer Ansatz in der Therapie des Mammakarzinoms ist die genspezifische Therapie. Trastuzumab (Herzeptin) ist ein monoklonaler Antikörper, der in der Therapie von HER2 (*human epidermal growth factor receptor-2*; erbB2) überexprimierenden Tumoren eingesetzt wird. HER2 ist ein transmembraner Tyrosinkinaserezeptor, der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren gehört und in Signaltransduktionskaskaden des Zellwachstums und der Differenzierung involviert ist (Piccart-Gebhart et al. 2005).

Die Überexpression führt zu einem aggressiven Tumorverhalten und ist mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (Piccart-Gebhart et al. 2005). HER2 Überexpression liegt in 15-20 % der Mammakarzinome vor (Piccart-Gebhart et al. 2005).

Trastuzumab wurde ab 1998 zuerst bei metastasierten Mammakarzinomen eingesetzt, wo die Mortalitätsrate um 20 % gesenkt werden konnte (Slamon et al. 2001). Seit 2005 wird Trastuzumab in der adjuvanten Therapie eingesetzt und hat im Vergleich zur Standardtherapie zu einer fast 50% igen Reduktion der Rezidivrate geführt (Romond et al. 2005).

Ein weiteres Medikament ist Lapatinib, ein Tyrosinkinase- Inhibitor von HER2 und EGFR (*epidermal growth factor receptor*), welcher in der Behandlung von fortgeschrittenen Tumoren mit HER2 Überexpression eingesetzt wird (Geyer et al. 2006).

Genetik des Mammakarzinoms

Die meisten Mammakarzinome entstehen sporadisch, heriditäre Karzinome kommen nur in 5-10% vor (Goldberg & Borgen 2006). Ursächlich sind Keimbahnmutationen, welche meist DNA (Desoxyribonukleinsäure) Reparaturwege betreffen. Zu den bekanntesten gehören BRCA1 (*familial breast and ovarian cancer*) und BRCA 2 (*familial breast and ovarian cancer syndrom*)(van der Groep et al. 2011).

Mammakarzinome sind eine heterogene Gruppe von Tumoren, die sich bezüglich der Prognose und des Therapieansprechen sehr unterschiedlich verhalten. Herkömmliche Klassifikationen und Prognosekriterien basieren auf der Histopathologie (Tavassoli et al. 2003), der Tumordifferenzierung (Grading) (Elston & Ellis 1991), dem TNM Stadium mit Erfassung der Tumorgröße, dem Lymphknoten-Status, und der Fernmetastasierung (Wittekind et al. 2010), sowie dem Hormonrezeptorstatus (Osborne 1998) und dem HER2-Status (Piccart-Gebhart et al. 2009).

Neue Gruppierungen und Prognosesysteme entstanden durch molekularpathologische Klassifikationen. Perou et al. entwickelten auf der Basis von Genexpressionsmustern eine neue Klassifikation. Diese besteht aus 4 Subtypen: *luminal-like*, *basal-like*, HER2+ und *normal breast-like* (Perou et al. 2000). In weiteren Studien konnte der *luminal-like* Subtyp noch weiter untergliedert werden in einen Luminal A- und Luminal B-Subtyp (Sorlie et al. 2001). Luminale Subtypen exprimieren Hormonrezeptoren und haben ein Expressionsmuster entsprechend den luminalen Zellen der Brustdrüse inklusive Cytokeratin (CK) 8/18. Der Luminal A- Subtyp zeigt hohe Expressionswerte von ER aktivierenden Genen und niedrige Level von für die Zellproliferation relevanten Genen im Gegensatz zum Luminal B- Subtyp. Der Luminal A-Subtyp ist mit einem hohen Differenzierungsgrad und einer guten Prognose, der Luminal B- Subtyp mit einer schlechteren Prognose und einem niedrigen Differenzierungsgrad vergesellschaftet (Zepeda-Castilla et al. 2008; Weigelt et al. 2010).

Der HER2+- Subtyp zeichnet sich durch eine Überexpression von HER2 und oder Genen aus, welche mit dem HER2 Signalweg oder der HER2 Amplifikation

assoziiert sind. Der Östrogenrezeptorstatus ist negativ (Zepeda-Castilla et al. 2008).

Ein weiterer ER negativer Subtyp ist der *basal-like*- Subtyp. Das Expressionsmuster entspricht den von basalen oder myoepithelialen Zellen der Brust. Das immunhistochemisch triple negative Karzinom, das weder ER, PgR noch HER2 exprimiert, kann dieser Gruppe zugeordnet werden (Zepeda-Castilla et al. 2008). Diese zeigen häufig einen niedrigen Differenzierungsgrad und gelten als sehr aggressiv. Die BRCA1 Mutation ist mit diesem Suptyp assoziiert (Nielsen et al. 2004). Der vierte Subtyp, *normal breast- like* Typ genannt, ist durch ein Genexpressionsmuster ähnlich dem von Fettgewebe charakterisiert (Weigelt et al. 2010). Die Relevanz dieses Subtyps ist aber stark umstritten (Geyer et al. 2009). Ein weiterer Subtyp, der *molecular apocrine* Subtyp ist gekennzeichnet durch die Expression des Androgen Rezeptors und die fehlende Expression des Östrogen Rezeptors (Farmer et al. 2005).

Kanzerogenese

Die Entstehung von Tumoren ist verknüpft mit dem Zugewinn oder Verlust von genetischen und epigenetischen Informationen und den korrespondierenden Veränderungen der Genexpression, welche die Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung modifizieren. Zusätzliche Eigenschaften von Tumorzellen sind die Fähigkeit zur Invasion, Metastasierung und Angiogenese. Ein bedeutsames Modell zur Kanzerogenese bildet die Mehrschritt Theorie der Tumorentstehung. Diese besagt, dass sich ein maligner Tumor aus einer Reihe von Veränderungen in verschiedenen Genen entwickelt (Barrett 1993). Diese Entstehung vollzieht sich meist über Jahre bis Jahrzehnte. Ein bekanntes und gut untersuchtes Beispiel ist die Adenom Karzinom Sequenz beim kolorektalem Karzinom (Vogelstein et al. 1988). Bei der Tumorentstehung spielen 5 Gengruppen eine bedeutende Rolle: Onkogene, Tumorsuppresorgene, Apoptosegene, Telomerasegene sowie DNA- Reparaturgene. Mittlerweile sind viele dieser Gene identifiziert und weitere Gene sind Objekte von aktuellen Forschungen.

Onkogene bzw. Protoonkogene gehören zu den normalen zellulären Genen, deren Expressionsprodukte Proliferation, Teilung und Differenzierung von Zellen regulieren. Onkogene kann man anhand der durch sie kodierten Onkoproteine in mehrere Gruppen einteilen. Wachstumsfaktoren,

8

Wachstumsfaktoren-Rezeptoren, Elemente der intrazellulären Signaltransduktionskette und nukleäre Transkriptionsfaktoren.

Zu den Mechanismen der Onkogenaktivierung gehört die chromosomale Translokation. Ein bekanntes Beispiel ist das sogenannte Philadelphia Chromosom bei der chronisch myeloischen Leukämie (Kurzrock et al. 2003). Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist neben der Punktmutation die Amplifikation von Onkogenen, worunter die Vermehrung der Kopienzahl eines Gens verstanden wird (Myllykangas & Knuutila 2006). Die Genamplifikation liegt z.B. der Überexpression des Wachstumsrezeptors HER2 beim Mammakarzinom zugrunde (Slamon et al. 1987).

Amplifikation

Genamplifikationen sind ein häufiger und wichtiger Mechanismus der Onkogenaktivierung und sind prognostisch und therapeutisch bedeutsam (Myllykangas & Knuutila 2006). Desweiteren spielen Amplifikationen auch eine große Rolle in der Entstehung von Resistenzen gegenüber Medikamenten und sie lassen sich nicht in normalen menschlichen Zellen nachweisen (Albertson 2006). Amplifikationen kommen in unterschiedlichen Formen vor: In Form von kleinen Fragmenten extrachromosomaler DNA, sogenannten double minutes (DM) und als zytologisch sichtbare intrachromosomale homogen anfärbbare Bereiche, sogenannte homogeneously staining regions (HRS) vor (Narayanan et al. 2006: Albertson 2006). Der Entstehungsmechanismus von Amplifikationen ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt verschiedene Modelle zur Entstehung von Amplifikationen, darunter das Onionskin Modell (Stark & Wahl 1984), welches einen Erklärungsansatz für extrachromosomale und intrachromosomale Amplifikationen liefert, sowie das Hairpin Modell (Narayanan et al. 2006) und das von Mc Clintock aufgestellte Breakage fusionbrigde Model (Myllykangas & Knuutila 2006) als Erklärungsmodelle für intrachromosomalen Amplifikationen. Nach dem Breakage- fusion- bridge Model kommt es initial zur Freilegung von DNA Sequenzen (*uncapping*) durch Doppelstrangbrüche oder Telomer- Verluste (breakage). Nach der DNA Replikation fusionieren die zwei Schwesterchromatiden aufgrund von DNA Reparaturmechanismen (fusion). In der Anaphase der Mitose bildet das dizentrisch fusionierte Chromosom eine Brücke aus, während es von der Mitosespindel an den Centromeren in die entgegen gesetzten Richtungen

9

gezogen wird (*brigde*). Ein zweiter DNA Doppelstrangbruch centromerisch zu der initialen Bruchstelle führt zur umgekehrten Wiederholung der DNA Sequenz zwischen den beiden Bruchstellen. Die Schwesterchomatide weist einen DNA Verlust distal der Bruchstelle auf. Mit jeder Zellteilung setzt sich der Breakage-fusion- brigde Zyklus fort und die duplizierte DNA Region wächst an (Myllkangas & Knuutila 2006).

Methoden zum Nachweis von Amplifikationen

Um Amplifikationen nachzuweisen, gibt es verschiedene Verfahren. Zwei wichtige Verfahren sind die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) und die komperative genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, (CGH)). Die komperative genomische Hybridisierung ist ein Verfahren, mit dem Veränderungen der Kopiezahl von DNA Sequenzen im gesamten Genom detektiert und kartiert werden. Die extrahierte DNA wird mit Fluorochromen markiert und kompetitiv mit Referenz-DNA auf Metaphasenchromosomen hybridisiert. Ein amplifizierter Bereich erscheint intensiver markiert durch die Fluoreszenz (Albertson 2006; Pinkel & Albertson 2005). Eine Unterform ist die Array-CGH verschiedene (aCGH), bei der DNA Fragmente oder Oligonukleotide mit bekannter Basenseguenz auf einem Träger repräsentiert sind. Radioaktiv markierte Probe-cDNA wird auf diesem Träger hybridisiert (Albertson 2006).

Die Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen (RNA oder DNA) in Geweben, Zellen oder Metasphasechromosomen. Eine fluoreszenzmarkierte spezifische Sonde hybridisiert über Basenpaarung an die nachzuweisende Sequenz und durch die Markierung mit fluoreszierenden Farbstoffen wird die Bindung visualisiert (Albertson 2006).

Während bei der FISH nur ein oder wenige Genorte zeitgleich untersucht werden können, können mit der CGH alle Genorte gleichzeitig untersucht werden. Ein Unterschied besteht darin, dass die FISH an Gewebe oder an ganzen Zellen durchgeführt wird, während bei der CGH die DNA extrahiert werden muss (Albertson 2006). Dementsprechend eignen sich die Verfahren für unterschiedliche Fragestellungen.

HER2

HER2 (*human epidermal growth factor receptor-2*) ist ein transmembraner Tyrosinkinaserezeptor, der zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren gehört. Diese sind in Signaltransduktionskaskaden an der Regulierung von Zellwachstum und Zelldifferenzierung beteiligt (Piccart-Gebhart et al. 2005). Die Ursache der HER2 Überexpression ist die Amplifikation des HER2 Gens auf Chromosom 17q21(Slamon et al.1987).

HER2 ist das Zielprotein für die Antikörper-basierte Therapie des Mammakarzinoms durch Trastuzumab. Die Therapie erzielt gute Erfolge bei HER2 positiven Karzinomen (Joensuu et al. 2006), welche mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet sind (Slamon et al. 1987).

Zur Bestimmung des HER2 Status werden zwei Methoden verwendet. Zurzeit ist es üblich die Überexpression immunhistochemisch zu bestimmen und bei nicht eindeutigen Ergebnissen als zweites Diagnostikverfahren die FISH einzusetzen. Welches Diagnostikverfahren zur Bestimmung des HER2 Status besser geeignet ist, wird diskutiert. So wird die bessere Reproduzierbarkeit und Testgenauigkeit der FISH angeführt, während die IHC stark von Fixierungsmethoden abhängig ist und sich weniger gut reproduzieren lässt. Auch die höhere Rate an falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen der IHC und die Korrelation zwischen FISH Ergebnissen und Behandlungserfolgen sprechen für eine primäre FISH Untersuchung (Sauter et al. 2009).

ER und ESR1

75% der Mammakarzinome weisen eine Überexpression des ER auf (Hopp & Fuqua 1998). Der ER ist ein nukleärer Hormonrezeptor. Er reguliert die Genexpression und beeinflusst die zelluläre Prolieferation und Differenzierung im Zielgewebe. Zwei Isoformen wurden beschrieben: ER α und ER β (Nillsson und Gustafsson 2011). Beide Rezeptoren haben ein unterschiedliches Verteilungsmuster im Körper. So findet sich der ER α vor allem an Uterus, Ovar, Knochen, Leber, Niere, Fettgewebe, ZNS und im Brustgewebe. ER β findet sich vor allem in Knochenmark, Colon, Ovar, Lunge, Blase, Gefäßsystem und ZNS (Nilsson & Gustafsson 2011). Vermittelt über den ER sind Östrogene zentral in die Regulation von Zellwachstum und –differenzierung im normalen weiblichen Brustdrüsenepithel eingebunden (Nilsson & Gustafsson 2011).

Der ER α besteht aus einem N-terminalen hormonunabhängigen Transkriptionsbereich AF-1, einem zentralen DNA Bindungsbereich mit 2 Zink Fingern und einem C-terminalen hormonabhängigen Transriptionsbereich AF-2 (Rayala et al. 2006).

Die zugrunde liegenden Ursachen der ER Überexpression in Mammakarzinomen ist heute noch nicht vollständig verstanden. Bekannte Mechanismen der ER Hochregulierung sind neben der ESR1 (*estrogen receptor 1*) Amplifikation (Holst et al. 2007) eine erhöhte Promotor Aktivität des ER α Gens auf transkriptionaler Ebene oder ein verminderter Abbau von ER α Proteinen durch Ubiquitination und proteasomale Prozesse (Miyoshi et al. 2010).

Erstmalig wurde die ERS1 Amplifikation vor über 20 Jahren mittels Southern Blot in ER expremierenden Mammakarzinomzellen entdeckt. Allerdings korrelierte das Level der Amplifikation nicht mit der Höhe der ER Expression (Nembrot et al. 1990).

2007 konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation des ESR1 Gens einen verbreiteten Mechanismus bei erhöhter ER Expression von Mammakarzinomen darstellt (Holst et al. 2007).

Über 20% der Mammakarzinome wiesen eine ESR1 Gen Amplifikation und weitere 15% der Fälle eine geringe Zunahme der ESR1 Kopienzahl (*gain*) auf (Holst et al. 2007). Retrospektive Analysen deuten auf eine erhöhte Responsivität von ESR1 amplifizierten Mammakarzinomen zu Tamoxifen hin (Holst et al. 2007).

Heterogenität und Metastasierung

Die Tumorentstehung geht von einer Zelle aus, welche multiple Mutationen akkumuliert hat, die es ihr erlauben, normale Wachstumskontrollmechanismen zu ignorieren (Campbell & Polyak 2007). Welche Art von Zelle den Ursprung bildet, wird kontrovers diskutiert. Das klonale Evolutions- Modell geht davon aus, dass jede epitheliale Zelle von zufälligen Mutationen betroffen werden sein kann. Die Zellen mit den fortgeschrittensten genetischen und epigenetischen Veränderungen werden über die Zeit selektiert und bewirken die Tumorprogression (Cambpell & Polyak 2007).

Das Tumorstammzell-Modell besagt dagegen, dass nur eine spezielle Gruppe von Tumorzellen mit stammzellartigen Eigenschaften Tumorinitiation und

Progression auslösen können. Eigenschaften wie Selbsterneuerung, Unsterblichkeit und die Möglichkeit zur Differenzierung ermöglichen es der Tumorstammzelle sich zu allen Zellarten des Tumors zu entwickeln. Die Tumor -stammzellen bilden dabei nur einen kleinen Teil des Tumors und ein Therapieansatz müsste sich, um erfolgreich zu sein, gegen diese Zellen richten (Campbell & Polyak 2007).

Nach dem Modell zur Tumor -Initiation, -Transformation und -Progression des invasiv- duktalen Mammakarzinoms von Wellings, verläuft die Progression der Neoplasie mehrstufig ausgehend vom normalen Mammaepithel über die flache epitheliale Atypie (FEA), weiter zur atypischen duktalen Hyperplasie (ADH), entwickelt sich weiter zum duktalem Carcinoma in situ (DCIS) und endet in der Entwicklung zum invasiv-duktalen Mammakarzinom (Abbildung 1)(Bombonati & Sgroi 2011).



Abbildung 1: modifiziert nach Bombonati & Sgroi, 2011

Weitere Studien beschäftigen sich mit den genetischen Unterschieden von invasiv- duktalen Mammakarzinomen im Bezug auf ihre Tumordifferenzierung. So konnte festgestellt werden, dass hochdifferenzierte Tumoren häufiger einen chromosomalen Verlust von 16q und gains von 1q,16p und 8q aufweisen, während wenig differenzierte Tumoren häufiger einen chromosomalen Verlust von 8p,11q,13q,1p und 18q, gains von 8q,17q, 20q und 16p und häufig Amplifikationen von 17q12 und 11q13 zeigen (Bürger et al. 1999 ; Bombonati & Sgroi 2011). Diese Studien legen nahe, dass es verschiedene genetische Wege in der Entstehung von invasiv- duktalen Mammakarzinomen gibt und diese mit unterschiedlichen Tumordifferenzierungen korrelieren. Die Studien konnten zeigen, dass sich aus einem hochdifferenzierten DCIS ein hochdifferenziertes invasivduktales Mammakarzinom entwickelt und entsprechend aus einem wenig differenzierten DCIS ein wenig differenziertes invasiv- duktales Mamakarzinom entsteht (Bürger et al. 1999).

Die Metastasierung ist eine bedrohliche Eigenschaft von malignen Tumoren. Über 90% der tumorbedingten Todesfälle sind Folge von Metastasen (Gupta & Massague 2006). Besonders durch eine mögliche Resistenz gegenüber konventionellen Therapien sind Metastasen so gefährlich, wobei eine große Hürde die biologische Heterogenität zwischen Primärtumoren und Metastasen darstellt (Fidler 2003). Die wichtigsten Metastasierungswege sind Lymph- und Blutgefäße. Bei der lymphogenen Metastasierung des Mammakarzinoms sind vor allem die Lymphknotenstationen entlang der Vena axillaris betroffen. Die Lymphknoten der Axilla werden in drei Etagen eingeteilt, was auch prognostisch von Bedeutung ist. Die Etagen sind wie folgt eingeteilt. Die erste Etage (untere Axilla, Level I) bilden die Lymphknoten lateral des M. pectorales minor. In der zweiten Etage (mittlere Axilla; Level II) liegen die Lymphknoten zwischen dem lateralen und medialen Rand des M. pectorales minor. Ebenfalls gehören die intrapectoralen Lymphknoten zur mittleren Axilla. Zur dritten Etage (obere Axilla; Level III) gehören die Lymphknoten medial des M. pectorales minor (Sobin et al. 2009). In den Gefäßen des Lymphsystems werden Gewebeflüssigkeit und Makromoleküle aus dem Interstitium ins venöse Blut transportiert. Als Bestandteil der Immunabwehr dient es als Transportweg für und antigenpräsentierende Zellen auf dem Weg Antigene zu den Lymphknotenstationen. Es ist ein durchlässiges System und bietet wenig Widerstand gegenüber Tumorzellen. Die gerichtete Bewegung wird zudem durch Chemokine unterstützt, die normalerweise die Bewegung von antigenpräsentierenden Zellen regulieren (Wagener & Müller 2009).

Hämatogen streut das Mammakarzinom am häufigsten ins Skelettsystem, in die Lunge, in die Leber und ins Hirn (Valastyan & Weinberg 2011).

Der Weg vom Primärtumor zur Metastase ist in einer Invasions-Metastasierungskaskade beschrieben worden, welche aus folgenden Schritten besteht. Zuerst muss die Tumorzelle in das sie umgebende Stroma eindringen. Als nächstes folgen die Intravasation ins Lumen eines Blutgefäßes und der Transport im Blut. Nach der Extravasation ins Ziel-Parenchym muss die Tumorzelle im fremden Mikroumfeld Mikrometastasen bilden und ihr proliferatives Programm reinitieren um Makrometastasen zu bilden (Abbildung 2)(Valastyan & Weinberg 2011; Fidler 2003).

14



Abbildung 2: modifiziert nach Valastyan & Weinberg, 2011

Die Tumorzelle benötigt metastasierende Eigenschaften, die ihr es ermöglichen, sich aus ihrem Verband zu lösen, sich in der fremden Umgebung anzusiedeln und Makrometastasen zu bilden. Studien zeigen, dass bei vielen Tumorpatienten Tumorzellen im Blut nachweisbar sind, ohne dass diese Makrometastasen ausbilden (Nagrath et al. 2007). Tumorzellen müssen über ein großes Repertoire von Eigenschaften verfügen, um die komplette Kaskade zu durchlaufen. Und diese Eigenschaften unterscheiden sich auch für die verschiedenen Tumoren. Einzelne Schritte der Kaskade sind für einige Tumoren schon gut erforscht, während andere Schritte und Mechanismen noch unbekannt sind. Schon 1889 wurde von Paget die Seed and Soil Hypothese aufgestellt, nach der es zur Metastasenbildung kommt, wenn bestimmte Tumorzellen (soil) eine Affinität für bestimmte Organe (seed) haben und eine Kompatibilität zwischen der metastasierenden Tumorzelle und dem Zielgewebe besteht (Fidler, 2003). Wichtig ist bei der erfolgreichen Metastasierung einer Tumorzelle auch die Interaktion mit dem Zielgewebe. Das Mikroumfeld des Zielgewebes beeinflusst die Metastasierung positiv durch parakrine und endokrine Wachstumsfaktoren, Neovaskularisation, Thrombozyten und ihren Produkten sowie Leukozyten und ihren Produkten (Fidler 2003). Studien an Mammakarzinomen konnten zeigen, dass die Eigenschaften der Metastasen bezüglich der Zielorgane sehr unterschiedlich sind. So sind z. B. die biologischen Charakteristika von metastasierenden Tumorzellen des

Mammakarzinoms, die in den Knochen metastasieren, andere als die von Tumorzellen, die in die Lunge oder Leber metastasiert haben (Kang et al. 2003; Minn et al. 2005; Tabaries et al. 2011). Es wird diskutiert, ob Primärtumoren aus Subpopulationen von Tumorzellen mit heterogenen unterschiedlichen biologischen Eigenschaften und unterschiedlichem metastatischem Potential oder ob die metastasierende Zelle erst bestehen. im Laufe der Metastasierungskaskade neue Eigenschaften entwickelt (Valastyan & Weinberg 2011).

Ein Primärtumor unterscheidet sich hinsichtlich seiner Eigenschaftsanforderung von einer Metastase und wahrscheinlich unterscheiden sie sich auch in ihrem genetischen und epigenetischen Repertoire.

Studien zeigen, dass die Überexpression des ER ein frühes Ereignis in der Karzinogenese des Mammakarzinoms ist (Hopp & Fuqua 1998). Und Studien konnten zeigen, dass die ESR1 Amplifikation auch in Vorstufen des Mammakarzinoms vorkommt (Holst et al. 2007; Burkhardt et al. 2010).

Die Therapie des Mammakarzinoms richtet sich nach der Diagnostik, die am Primärtumor gestellt wurde aus, obwohl sie sich häufig gegen Metastasen wendet. Für den HER2 Rezeptor konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der Amplifikationsstatus im Vergleich zwischen Primärtumoren und ihren Metastasen weitgehend homogen ist (Simon et al 2001).

Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Metastasierung verlangt vom Tumor Eigenschaften und Fähigkeiten, über die ein Primärtumor nicht zwingend verfügen muss. Untersuchungen bezüglich der Metastasierung konnten einen Teil dieser Eigenschaften identifizieren (Valastyan & Weinberg 2011). Ob ein Tumor, der im Laufe seiner Entwicklung metastasiert, diese Eigenschaften schon von Anfang der Tumorgenese oder erst im Laufe der Zeit erwirbt, ist unklar. Ein Primärtumor und eine Metastase sind bezüglich bestimmter Eigenschaften heterogen. Diese Heterogenität könnte einen Einfluss auf ein Therapieansprechen haben. Prädiktive Marker werden gewöhnlich an Primärtumoren untersucht, während Metastasen nur eventuell behandelt werden. Die Eignung hängt daher in hohem Maße von der Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Primärtumoren und ihren Metastasen ab.

Der ER ist ein bedeutendes Ziel in der Therapie des ER positiven Mammakarzinoms. Leider ist das Ansprechverhalten auf eine endokrine Therapie sehr unterschiedlich. Die Ursachen hierfür sind teilweise noch nicht bekannt (Barone et al. 2010). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die endokrine Therapie nicht die metastatischen Klone erreicht, da diese kein ER exprimieren oder keine ESR1 Amplifikation aufweisen. Dies könnte dann zur Neuselektionierung des metastatischen Klons führen.

Da ESR1 Amplifikationen auch in duktalen Hyperplasien ohne jegliche morphologische Anzeichen für Malignität gefunden wurden (Holst et al. 2007), könnte die ESR1 Amplifikation ein frühes Ereignis bei der malignen Transformation von Mamma-Epithelzellen darstellen. Sollte dies zutreffen, wäre Homogenität zwischen den Tumorzellen von Primärtumoren und von dazugehörigen Metastasen bezüglich der ESR1 Amplifikation wahrscheinlich.

Um eine mögliche Heterogenität der ESR1 Amplifikation zwischen Primärtumoren und dessen Lymphknotenmetastasen zu klären, haben wir die folgende Untersuchung durchgeführt.

Material und Methoden

Mammakarzinom Nodalmetastasen Array

Ein bereits existierender Tissue Microarray (TMA) (Simon et al. 2001), bestehend aus zwei Gruppen je 196 Tumoren, die im Zeitraum von 1985 bis 1995 im pathologischen Institut des Kantonspitals Basel ausgesucht worden waren, wurde in dieser Studie untersucht.

Das erste Set (Kontroll-Set) bestand aus 196 nodal-negativen Tumoren und beinhaltete 143 invasiv-duktale und 37 invasiv-lobuläre Mammakarzinome sowie 16 Tumoren weiterer histologischer Subtypen. In dieser Gruppe waren 10% pT1, 74% pT2, 9% pT3 und 7% pT4 Karzinome.

Das zweite Tumorset bestand aus 196 hochgradig metastasierten Tumoren mit jeweils mindestens 3 verschiedenen, größer als 0,5 cm durchmessenden Lymphknotenmetastasen. In dieser Gruppe befanden sich 145 invasiv-duktale und 25 invasiv-lobuläre Mammakarzinome sowie 12 Tumoren weiterer histologischer Subtypen. In dieser Gruppe befanden sich 14% pT1, 45% pT2, 16% pT3 und 25% pT4 Karzinome.

Die Gewebestanzen der 196 nodal-negativen Tumoren (Kontroll-Set), der 196 nodal-positiven Primärtumoren und jeweils drei Metastasen von jedem nodalpositiven Primärtumor (3x 196 Proben) wurden auf drei Paraffin-Blöcke mit insgesamt 980 Gewebeproben verteilt (Gesamtproben-Anzahl 5x196).

Um nicht nur potentielle Unterschiede zwischen den Tumorproben, sondern auch einen intratumoralen Vergleich zu ermöglichen, wurden aus jedem Tumor 3 Stanzen entnommen, aus denen je 3 TMAs hergestellt wurden, so dass letztendlich 2940 Gewebezylinder durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung untersucht wurden. Die Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des TMAs und die Abbildung 4 einen Hämatoxylin- Eosin gefärbten Schnitt des benutzten TMAs.

Die Zusammensetzung des Mammakarzinom- Nodalmetastasen- TMA ist in Tabelle 1 dargestellt.



Abbildung 3: Schematische Darstellung des TMA-Aufbaus

Einer Gewebeprobe (in braun dargestellt) werden aus drei verschiedenen Arealen Gewebestanzen entnommen (rot, gelb und blau dargestellt) und auf 3 TMAs (TMA 1-3) aufgebracht



Abbildung 4: a) Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbter Schnitt des Mammakarzinom-Nodalmetastasen- TMAs. b) Der Durchmesser eines einzelnen Gewebespots beträgt 0,6mm. Quelle: Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf

		TMA 1	TMA 2	TMA 3
Gewebetyp:		Anz	ahl Gewebeprot	pen:
Reverenztumor	pN0	196	196	196
Primärtumor	pN+	196	196	196
Lymphknotenmetastase	LK1	196	196	196
Lymphknotenmetastase	LK2	196	196	196
Lymphknotenmetastase	LK3	196	196	196
total		980	980	980

Tabelle 1 : Zusammensetzung des Mammakarzinom-Nodalmetastasen TMA

FISH Analyse

Zur Durchführung der zweifarbigen Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurden 4 µm dicke TMA Schnitte verwendet. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt entsprechend dem Paraffin Pretreatment Reagent Kit Protokoll (Vysis, Downers Grove, Illinois). Die FISH wurde mit einer selbsthergestellten digoxigenierten BAC Sonde (BAC RP11-450E24, RZPD, Deutschland) für das ESR1 Gen und einer kommerziellen Chomosom 6 Centromersonde (CEP6 spectrum orange, Abbott, Abbott Park, Illinois) als Referenz durchgeführt. Die Markierung der ESR1 DNA-Sonde erfolgte durch DIG-Nick-Translation mit dem Nick Translation System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien). Hybridisierung und Post-Hybridisierungs-Waschungen entsprachen dem LSI Verfahren (Vysis).

Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte geschah mit dem Fluorescent Antibody Enhancer Set (Roche, Rotkreuz, Schweiz). Die Objektträger wurden anschließend mit 125ng/ml 4',6-Diamino-2-Phenylindole kontrastgefärbt.

Die genauen Arbeitsschritte gliedern sich in:

- •FISH-Sondenherstellung (pBac-E.coli-Klon Kultivierung, DNA Extraktion, DIG-Nick Translation
- •Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte
- •Hybridisierung
- Waschen
- Detektion
- Auswertung

pBac-E.coli-Klon Kultivierung

<u>Verwendete Materialien:</u> pBac-E.coli-Klon: RZPD-Nr.: RP-11450E24 (C122127D6); LB-Medium: 25 g Luria-Broth-Base (25 g/l dH₂O; autoklaviert), Antibiotikum: Chloramphenicol (34 mg/ml Ethanol abs.)

Laborprotokoll: pBac-E.coli-Klon-Kultivierung

- a) 10 ml LB-Medium in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben geben
- b) 30 µl Chloramphenicol zugeben
- c) Abstrich mit abgeflammter Pinzette und einen autoklavierten Zahnstocher aus der stab-stock-Kultur nehmen und durch Zugabe des Zahnstochers das Medium animpfen
- d) Inkubation des Ansatzes f
 ür 2 Tage bei Raumtemperatur und 200 rpm im Sch
 üttelinkubator
- e) In einen mit 10 ml LB- Medium und 30 µl Chloramphenicol befüllten 100 ml-Erlenmeyerkolben 10 µl des gewonnenen Ansatzes umimpfen
- f) Über Nacht Inkubation des angeimpften Ansatzes bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator

DNA Extraktion

Die DNA wurde aus der pBAC-E.coli-Kultur unter Anwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) extrahiert.

<u>Verwendete Materialien</u>: pBac-E.coli-Flüssigkultur: (RZPD-Nr.: RP-11450E24 (C122127D6)) ; QIAprep Spin Miniprep Kit von Qiagen (inklusive der QIAprep spin-Säulen und aller verwendeten Reagenzien)

Laborprotokoll (modifiziert): DNA-Extraktion aus pBac-E-coli-Klon-Kultur

- a) 3 ml (2 +1 ml) der Flüssigkultur im 2 ml Eppendorf-Röhrchen in einer Tischzentrifuge (~17.900 ×g) für 2 min. bei 13.000 rpm pelletieren
- b) Pellet in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendieren
- c) 250 µl Puffer P2 zugeben und 4-6 x invertieren
- d) 350 µl Puffer N3 zugeben und 4-6 x invertieren
- e) 10 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- f) Überstand in eine QIAprep spin-Säule geben

- g) 1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren und anschließend den Durchfluss verwerfen
- h) QIAprep spin-Säule mit 500µl Puffer PE beladen und 1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren und anschließend den Durchfluss verwerfen
- i) QIAprep spin-Säule erneut mit 500µl Puffer PE beladen und 1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren und anschließend den Durchfluss verwerfen
- j) QIAprep spin-Säule erneut 1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- k) QIAprep spin-Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen setzen
- QIAprep spin-Säule mit 50 µl auf 70°C erwärmten Puffer EB beladen und 1 min bei Raumtemperatur inkubieren
- m)1 min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- n) Messung des DNA Gehaltes + Reinheitsgrades mit dem Nanodrop-Photometer. Aufbewahrung im 1,5 ml Eppendorf Röhrchen bei 4°C

DIG-Nick Translation

Die Markierung der ESR1 DNA-Sonde erfolgte durch DIG-Nick-Translation mit dem Nick Translation System (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien). <u>Verwendete Materialien:</u> Nick Translation System (Invitrogen); Digoxigenin 11-

dUTP (Roche); Polymerase I (Invitrogen)

Laborprotokoll (modifiziert): DIG-Nick-Translation zur FISH Sondenherstellung Pipettierschema für ein 0,5 ml-Eppendorf Röhrchen:

5 μl dNTP-Mix ohne dTTP; 1 μl Digoxigenin- 11dUTP (Roche); 38 μl pBAC-DNA –Lösung; 5 μl Pol I-DNase- Mix; 1 μl Polymerase 1 (Invitrogen)

- a) Ansatz gut durchmischen und herunterzentrifugieren
- b) Für 90 min bei 15°C im Thermocycler inkubieren
- c) 5 µl Pol I -DNase Mix zugeben und mit der Pipette durchmischen
- d) Für 15 min bei 15°C im Thermocycler inkubieren
- e) 5 µl Stop Puffer zugeben und anschließend vortexen und zentrifugieren
- f) Ansatz bei 4°C lagern

Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

Entsprechend des Protokolls Paraffin Pretreatment Reagent Kit von Vysis wurden die TMA Schnitte vor der Hybridisierung behandelt.

<u>Verwendete Materialien:</u> Destilliertes Wasser (dH₂O); Ethanol (70% / 80% / 95%); VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis) ; VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL) (Vysis) ; Xylol

Laborprotokoll: Parafffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung

- a) Die TMA-Schnitte im Xylolbad (3×10 min) und anschließend im Ethanolbad (95%) (2×5 min) entparaffinieren
- b) 3 min auf der Heizplatte(48°C) lufttrocknen
- c) 15 min in Pretreatmentlösung (Wasserbad; 80°C) inkubieren und anschließend 2 min in dH₂O waschen
- d) 150 min in Proteaselösung (Wasserbad;37°C) inkubieren und anschließend
 2 min in dH₂O waschen
- e) 3x3 min in Küvette mit Ethanol (70%,80%,95%) stellen
- f) 3 min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

Hybridisierung

Für die zweifarbige FISH Analyse wurden eine selbst hergestellte Sonde (6q25.1; RZPD Nr. RP11-450E24) und eine kommerzielle Sonde als Referenz für das Centromer des Chromosoms 6 (Spectrum orange, Abbott) eingesetzt. Die kommerzielle Centromersonde wurde nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt.

<u>Verwendete Materialien:</u> 20×SSC; Cot-DNA; Dextransulfat ; Formamid (deionisiert)

Laborprotokoll: Herstellen des Basis-Hybridisierungsmix

- a) 5 ml deionisiertes Formamid, 1,5 ml 20×SSC und 1g Dextransulfat in ein Becherglas geben und bei 60°C auf dem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat auflöst
- b) Suspension mit HCI auf pH 7 einstellen
- c) mit H₂0 auf 7ml auffüllen
- d) Lagerung bei 4°C

<u>Pipettierschema zur Hybridisierung: (Hybridisierungsmix (20µI)):</u> 14µI Basis-Hybridisierungsmix; 2µI Cot-DNA; 3,5µI Sonden-DNA; 0.5 µI CEP orange Chromosom 6 DNA (Abbott)

Laborprotokoll: Hybridisierung

- a) Hybridisierungsmix auf die TMA Schnitte geben
- b) TMA Schnitte mit einem 24×32 mm Deckgläschen eindecken und mit Rubbercement versiegeln
- c) Die TMA Schnitte für 10 min im Hybrite denaturieren (72°C) und anschließend über Nacht im Hybrite inkubieren (37°C(

Waschen

Nach 12 -stündiger Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Verwendete Materialien: 2×SSC, dH₂O, NP40, 1xPBS

Laborprotokoll: Waschen

- a) Rubbercement und Deckgläschen entfernen
- b) TMA Schnitte in Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) bei Raumtemperatur stellen
- c) TMA Schnitte 2 min bei 72°C im Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) waschen
- d) TMA Schnitte in 1x PBS stellen

Detektion

Die Detektion wurde mit dem Fluorescent Antibody Enhancer Set (Roche) durchgeführt.

<u>Verwendete Materialien:</u> 1x PBS; 0,2% Tween20; Blocking-Solution (Roche); Maus-Anti-DIG-AK (Roche); Anti-Maus-AK-DIG (Roche); Anti-DIG-Flourescein (Roche); Dapi- Antifade DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector Laboratories, Buringame, Kalifornien)) Laborprotokoll: FISH-Enhancer-Kit-Detektion:

- a) Objektträger mit 500 µl 1 x Blockinglösung eindecken (10 x Blockingsolution aus Kit-Flasche mit 1x PBS 1:10 verdünnen)
- b) Objektträger in trockener Kammer für 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
- c) Blocking-Lösung abkippen
- d) 50 µl Maus –Anti-DIG- AK Lösung (2 µl AK-Lsg. aus Kit Tube # 1 in 48 µl 1 x Blocking-Lösung) auf die TMA Schnitte auftragen, mit Parafilm bedecken und 1 Stunde bei 37 ° C in feuchter Kammer inkubieren
- e) 3 x 1 min. mit 100 ml Waschpuffer (1x PBS, 0,2% Tween 20) bei 37°C waschen
- f) 50 µl Anti-Maus-AK-DIG-Lösung (2 µl AK-Lsg. aus Kit Tube # 2 in 48 µl 1 x Blocking-Lösung) auf die TMA Schnitte auftragen, mit Parafilm bedecken und 1 Stunde bei 37 ° C in feuchter Kammer inkubieren
- g) 3 x mit 100 ml Waschpuffer (1x PBS, 0,2% Tween 20) bei 37°C waschen
- h) 50 µl Anti-DIG-Flourescein-Lösung (2 µl AK-Lsg. aus Kit Tube # 3 in 48 µl 1 x Blocking-Lösung) auf die TMA Schnitte auftragen, mit Parafilm bedecken und 1 Stunde bei 37 ° C in feuchter Kammer inkubieren
- i) 3 x 5 min. mit 100 ml Waschpuffer (1x PBS, 0,2% Tween 20) bei 37°C waschen
- j) TMA Schnitte im Dunkeln lufttrocknen
- k) Eindecken der TMA Schnitte mit 50 µl Dapi- Antifade DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)) und anschließend mit Deckgläschen (24 x 32 mm) abdecken.

Auswertung

Alle FISH-Präparate wurden unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop bei 63-100facher Vergrößerung ausgewertet. Es wurden die von Abbott empfohlenen Fluoreszenzfilter für *spectrum green* und *spectrum orange* verwendet.

Die Anzahl der Fluoreszenzsignale wurden in je 20 Zellkernen in jeder Gewebeprobe für die Centromer 6- und die ESR1 Gen-Sonden ausgezählt. Bei einer unterschiedlichen Anzahl von Signalen zwischen den Zellkernen in einer Gewebeprobe wurde ein Intervall notiert mit der niedrigsten und höchsten Anzahl an Signalen. Zur weiteren Auswertung wurde aus den Intervallergebnissen der Mittelwert gebildet.

Gewebe mit mindestens doppelt so vielen ESR1 Signalen wie Centromersignalen (Ratio≥2.0) wurden als "ESR1 amplifiziert" betrachtet.

Alle anderen analysierbaren Gewebespots (Ratio <2.0) wurden als "nichtamplifiziert" klassifiziert.

Immunhistochemie

Die Ergebnisse der FISH Auswertung wurden mit schon bestehenden immunhistochemischen Daten für denselben TMA verglichen. Diese Daten wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf erhoben und zur Verfügung gestellt. Zur immunhistochemischen Detektion des ER -Proteins wurde der Antikörper NCL-L-ER-6F11 (anti estrogen receptor alpha, Vision Biosystems, Newcastle, UK) verwendet.

Die IHC Auswertung wurde entsprechend dem Allred Score ausgeführt, der sich aus der Kombination einer 4-Stufen-Skala (0-3) für die ER Färbungsintensität und einer 6-Stufen Skala (0-5) für die ER positiven Tumorzellen zusammensetzt (Tabelle 2)(Qureshi & Pervez ,2010).

Verhältnis- Score ((PS): Anteil positiver	Beobachtung	Intensitäts- Score (IS)	Beobachtung
Tumorzellen)			
0	keine	0	keine
1	1%	1	schwach
2	1-10%	2	mäßig
3	10-33%	3	stark
4	33-66%		
5	66-100%		

Tabelle 2: Allred Score modifiziert nach Qureshi & Pervez ,2010.

Summe von Verhältnis-Score und Intensitäts-Score

Gesamtpunktzahl	Interpretation
0-2	negativ
3-8	positiv

Ergebnisse

Assoziation zwischen FISH und IHC

In einer ersten Analyse wurde die Korrelation zwischen IHC und FISH Ergebnissen untersucht. Alle Gewebeproben der 3 Replikate (3x980 Proben) wurden in die Analyse einbezogen. Insgesamt waren 1403/2940 (47,8%) Gewebeproben für ESR1 in der FISH und 2569/2940 (87,4%) Gewebeproben für ER- Expression in der IHC analysierbar.

Fehler während der Hybridisierung, die zu schwachen Signalen oder zu starken Hintergrundsignalen führten, als auch teils fehlende Gewebeproben oder eine zu geringe Anzahl von Tumorzellen innerhalb einer Probe sind ursächlich für den Anteil nicht analysierbarer Gewebeproben.

ESR1 Amplifikationen wurden bei 430/1403 (30,64%) und ER Expression bei 1723/2569 (67%) der analysierbaren Gewebeproben vorgefunden.

Daten für FISH und IHC waren verfügbar für 1387/2940 (47,16%) Gewebeproben.

Eine hohe Korrelation zeigte sich zwischen der ESR1 Amplifikation und positiver ER Expression. Von den 429 Gewebeproben mit ESR1 Amplifikation wiesen 422 (98,34%) der Proben einen positiven ER Expressionstatus auf. Im Gegensatz dazu waren nur 559/958 (58,35%) der Proben ohne ESR1 Amplifikation positiv für ER Expression (p<0.0001, Tabelle 3).

Beispiele von interpretierbaren Tumorproben für die ESR1 Amplifikation und für einen Normalbefund des ESR1 Gens werden jeweils in den Abbildungen 5a und 5b gezeigt.



Abbildung 5

a b

Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit ESR1 Sonde und Chromosom 6 Centromer Sonde: a) ESR1 Amplifikation b) Normalbefund

Tabelle 3: Assoziation zwischen IHC and FISH

	ER negativ	ER positiv	p-Wert
ohne ESR1 Amplifikation (n=958)	41,65.0%	58,35.0%	p<0.0001
ESR1 Amplifikation (n=422)	1,66%	98.34%	

Intratumorale Heterogenität

Um die Prävalenz von intratumoraler Heterogenität einzuschätzen, wurde in einer Analyse der ESR1 Amplifikationsstatus zwischen verschiedenen Arealen einer Gewebeprobe verglichen. Diese Areale waren auf den Replikaten 1-3 präsentiert. In die Auswertung wurden alle Gewebeproben eingeschlossen, bei denen alle 3 Replikate analysierbar waren (n=185). Von diesen 185 Tumoren hatten 157/185 (84,9%) ein identisches Ergebnis. 51 der Gewebeproben waren übereinstimmend amplifiziert, 106 waren nicht amplifiziert. 28/185 (15,1%) der Gewebeproben zeigten einen unterschiedlichen ESR1 Status (Abbildung 6). Bei Betrachtung der diskrepanten Fälle zeigte sich jedoch, dass die Diskrepanzen vorwiegend durch Proben mit niedrigem ESR1 Level oder durch Proben, die als negativ bewertet wurden, aber eine Ratio von >1 und < 2 haben, verursacht wurden. Diese Entität wird in der Literatur auch als *gain* bezeichnet (Holst et al. 2007).

Alle heterogenen Fälle sind in Tabelle 4 abgebildet.



Abbildung 6: Intratumorale Heterogenität

	TMA 1			TMA 2			TMA 3		
Gewebetyp	ESR1	C6	RATIO	ESR1	C6	RATIO	ESR1	C6	RATIO
meta3	3	2	1.50	4-6	2	2.50	4-6	2	2.50
meta2	3-4	2	1.80	4-8	2	3.00	3-6	2	2.30
meta3	3-4	2	1.80	6-8	2	3.50	4-6	2	2.50
meta2	2	2	1.00	3-5	2	2.00	4	2	2.00
meta2	2	2	1.00	4-6	2	2.50	3-5	2	2.00
meta3	2	2	1.00	4-6	2	2.50	4-6	2	2.50
meta1	3	2	1.50	4-6	2	2.50	8-10	2	4.50
meta2	2	2	1.00	4-6	2	2.50	5-6	2	2.80
pTN0	2	2	1.00	4-6	2	2.50	6-7	2	3.30
meta3	2	2	1.00	3	2	1.50	4-6	2	2.50
meta2	2	2	1.00	2	2	1.00	4-5	2	2.30
meta1	3-4	2	1.80	3-4	2	1.80	3-5	2	2.00
pTN0	2	2	1.00	3-4	2	1.80	6-8	2	3.50
meta2	6-8	1-2	4.70	4-5	1-2	3.00	3-4	2	1.80
meta1	4-6	2	2.50	4-5	2	2.30	3	2	1.50
meta3	3-5	2	2.00	4-6	2	2.50	3-4	2	1.80
meta2	4-5	2	2.30	2	2	1.00	3-4	2	1.80
meta3	5-6	2	2.80	2	2	1.00	3-4	2	1.80
pTN+	4-6	2	2.50	2	2	1.00	2	2	1.00
meta1	3-4	2	1.80	4-5	2	2.30	3-4	2-3	1.40
pTN+	3	2	1.50	3-5	2	2.00	3-4	2	1.80
meta1	3	2	1.50	4-6	2	2.50	3-4	2	1.80
meta1	2	2	1.00	6-8	2	3.50	3-4	2	1.80
meta3	2	2	1.00	4-5	2	2.30	3	2	1.50
meta3	2	2	1.00	3-5	2	2.00	2	2	1.00
meta3	4-6	2	2.50	3-4	2	1.80	6-8	2	3.50
pTN+	4-5	2	2,30	3-4	2	1.80	3-5	2	2.00
pTN+	6-12	1-2	6,00	1-2	1-2	1.00	4-5	2	2.30

Tabelle 4: Intratumorale Heterogenität

Legende: pTN0: nodal-negativer Primärtumor pTN+: nodal-positiver Primärtumor meta1-3: Lymphknotenmetastasen



amplifizierte Tumorproben nicht amplifizierte Tumorproben

ESR1 Status in primären und metastasierten Mammakarzinomen

Anschließend wurde der ESR1 Amplifikationsstatus in den 3 Replikaten der nodal-negativen Primärtumoren und der nodal-positiven Primärtumoren sowie der der drei jeweilig dazugehörigen Metastasen verglichen. Um mögliche Selektionseffekte zu vermeiden und um die Komplexität des Datensatzes zu reduzieren, wurde von jedem Tumor nur die erste auswertbare Gewebeprobe der 3 Replikate in die Analyse eingeschlossen. 741/980 (75,6%) der Tumorproben konnten in die Analyse einbezogen werden. Insgesamt zeigten sich in 215/741 (29,0%) Tumorproben ESR1 Amplifikationen. Die Fraktion der ESR1 amplifizierten Tumoren war sowohl zwischen den metastasierten Primärtumoren und den zugehörigen Metastasen, wie auch bei der Kontrollgruppe der nodal-negativen Primärtumoren (p=0.4212) vergleichbar. Von den nodal- negativen Primärtumoren zeigten 42/138 (30,4%) eine ESR1 Amplifikation. Die Fraktion der nodal- positiven Primärtumore zeigte in 32/127 (25,2%) der Fälle eine ESR1 Amplifikation und in der Gruppe der Metastasen waren 141/476 (29,6%) der Tumoren amplifiziert (Abbildung 7).



Abbildung 7: Prävalenz der ESR1 Amplifikationen bei primären und metastasierten Mammakarzinomen:

Legende:

pTN0: nodal negative Primärtumoren pTN+: nodal positive Primärtumoren Meta 1-3: Lymphknotenmetastasen

Heterogenität zwischen Lymphknotenmetastasen eines Patienten

In einer weiteren Analyse wurden jeweils die Lymphknotenmetastasen eines Patienten hinsichtlich des ESR1 Amplifikationsstatus untersucht. In die Analyse einbezogen wurden diejenigen Patientinnen (n=110), bei denen alle 3 Metastasen auswertbar waren. Insgesamt waren 476 von 588 Metastasen analysierbar. Um die Komplexität des Datensatzes zu reduzieren und um mögliche Selektionseffekte zu vermeiden, wurde nur die erste analysierbare Gewebeprobe von jeder der 476 Metastasen in die Analyse einbezogen.

Von den Lymphknotenmetastasen der 110 Patientinnen waren 60 (54,5%) homogen nicht amplifiziert, 25 (22,7%) homogen amplifiziert und 25 (22,7%) zeigten ein heterogenes Ergebnis (Abbildung 8). Die Metastasen, welche ein heterogenes Resultat zeigten, waren also teils amplifiziert und teils nicht amplifiziert. Die Tabelle 5 zeigt Beispiele von heterogenen Metastasen. Die festgestellte Heterogenität lässt sich hauptsächlich auf niedrige Amplifikationslevel oder Genkopiezahlen mit einer Ratio, die größer als 1, aber kleiner als 2 ist, zurückführen, so dass die heterogenen Fälle in einem Grenzbereich zwischen normaler Genkopiezahl und amplifizierter Genkopiezahl liegen.



Abbildung 8: Vergleich der Lymphknotenmetastasen eines Patienten bezüglich des ESR1 Status.

Gewebe typ	ESR1	C6	Ratio
meta1	4-5	2	2.25
meta2	3-4	2	1.75
meta3	4-6	2-4	1.66
meta1	3-5	2	2.00
meta2	3	2	1.50
meta3	3-4	2	1.75
meta1	4-8	1-2	4.00
meta2	3-4	2	1.75
meta3	3-4	2	1.75
meta1	3-5	2	2.00
meta2	3-4	2	1.75
meta3	3-5	2	2.00
meta1	3-5	2	2.00
meta2	3-4	2	1.75
meta3	3	2	1.50

Tabelle 5: Heterogene Metastasen

Gewebe typ	ESR1	C6	Ratio
meta1	3	2	1.50
meta2	3-4	2	1.75
meta3	4-5	2	2.25
meta1	4-5	2	2.25
meta2	4-5	2	2.25
meta3	3-4	2	1.75
meta1	4-5	2	2.25
meta2	2	2	1.00
meta3	4-5	2	2.25
meta1	2	2	1.00
meta2	4-6	2	2.50
meta3	3-4	2	1.75
meta1	3	1	3.00
meta2	3-4	2	1.75
meta3	3-5	2	2.00

Legende:

amplifizierte Tumorproben nicht amplifizierte Tumorproben

Meta 1-3: Lymphknotenmetastasen

Heterogenität zwischen Primärtumoren und ihren zugehörigen Lymphknotenmetastasen

einer weiteren Unterschieden In Analyse wurde nach im ESR1 Amplifikationsstatus zwischen metastasierten Primärtumoren und ihren Metastasen gesucht. In die Auswertung wurden 114 nodal positive Primärtumoren einbezogen, für welche mindestens zwei zugehörige Metastasen analysierbar waren.

Um die Komplexität des Datensatzes zu reduzieren, wurde nur der erste analysierbare Gewebespot von jedem der 980 Tumorproben in die Analyse einbezogen. Die Metastasen wurden dem ESR1 Status entsprechend in drei Gruppen kategorisiert. Die Metastasen wurden als ESR1 amplifiziert betrachtet, wenn alle Metastasen ESR1 Amplifikationen aufzeigten, als nicht-amplifiziert, wenn alle Metastasen keine ESR1 Amplifikation aufzeigten und als heterogen, wenn sich die Metastasen bezüglich des ESR1 Status unterschieden.

Auf diesen Kriterien basierend, hatten von den 84 nodal-positiven Primärtumoren ohne ESR1 Amplifikation 71 (84,5%) nicht-amplifizierte Metastasen, 2 (2,4%) ESR1 amplifizierte Metastasen und 11 (13,1%) zeigten ein heterogenes Ergebnis.

Von den 30 nodal-positiven Tumoren mit ESR1 Amplifikation hatten 19 (63,3%) amplifizierte Metastasen, 3 (10%) hatten nicht-amplifizierte Metastasen und 8 (26,6%) zeigten ein heterogenes Ergebnis (Abbildung 9). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein identischer ESR1 Status (amplifiziert oder nicht-amplifiziert) bei 180 von 228 (79%) Paaren von Primärtumoren/Metastasen gefunden wurde. Einen Wechsel von einem amplifizierten /nicht amplifizierten Primärtumor zu nicht amplifizierten / amplifizierten Metastasen gab es nur in 5/114 (4,4%) Fällen. Beispiele von 12 diskrepanten Fällen sind in Tabelle 6 dargestellt. Die beobachteten Diskrepanzen waren vorwiegend durch niedrige ESR1 Amplifikationen bedingt, welche zu grenzwertigen Ergebnissen führten.



Abbildung 9: Vergleich des ESR1 Amplifikationsstatus bei primären Mammakarzinomen und korrespondierenden Lymphknotenmetastasen.

Tabelle 6: H	eterogenität bei	Primärtumoren und	korrespondierenden	Metastasen
--------------	------------------	-------------------	--------------------	------------

Gewebetyp	ESR1	C6	Ratio
pTN+	4-6	2	2.50
meta1	2	2	1.00
meta2	2	2	1.00
meta3	2	2	1.00
pTN+	4-6	2	2.50
meta1	3-4	2	1.75
meta2	2	2	1.00
meta3	-	-	-
pTN+	3-5	2	2.00
meta1	3	2	1.50
meta2	3-4	2	1.75
meta3	3-4	2	1.75
pTN+	3-4	2	1.75
meta1	4-5	2	2.25
meta2	4-6	2	2.50
meta3	3-6	1-2	3.00
pTN+	3-4	2	1.75
meta1	4-5	2	2.25
meta2	4-5	2	2.25
meta3	4-6	2	2.25
pTN+	2-3	2-3	1.00
meta1	4-5	2	2.25
meta2	3-4	2	1.75
meta3	4-6	2-4	1.67

Legende:

amplifizierte Tumorproben nicht amplifizierte Tumorproben

pTN+: nodal positiver Primärtumor

Meta 1-3: Lymphknotenmetastasen

Diskussion

In dieser Studie zeigten 27,9% der primären Mammakarzinome eine Amplifikation entsprechend der vordefinierten Kriterien. Dies ist etwas höher als in einer vorhergehenden Studie, die an einem anderen Kollektiv im selben Labor durchgeführt wurde (Holst et al. 2007). Hier zeigten 20.6% der Mammakarzinome eine Amplifikation und 15.3% ein ESR1 gain. Nach Veröffentlichung dieser Ergebnisse, wurde der ESR1 Amplifikationsstatus von verschiedenen Forschungsgruppen mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Der ESR1 Amplifikationsstatus schwankt hier von unter 1% bis fast 23%, je nach Untersuchungsverfahren und Forschungsgruppe. So wurden unter anderen mittels aCGH, quantitativer Polymerase Kettenreaktion (gPCR) und FISH Amplifikationen in 0-10% der Fälle gefunden (Vincent-Salomon et al. 2008; Reis-Filho et al. 2008; Horlings et al. 2008; Brown et al. 2008), während eine Forschungsgruppe um Tomita unter Anwendung einer dreidimensionalen FISH Analyse in 22,6% Amplifikationen und in 11,3 % gains vorfinden konnten (Tomita et al. 2009). Eine Untersuchung an DCIS kommt auf eine Amplifikationsrate von 19-24,1% (Burkhardt et al. 2010).

Diese teils erheblichen Unterschiede machen deutlich, dass die Messung der ESR1 Amplifikation einige Schwierigkeiten aufweist. Die weit voneinander abweichenden Ergebnisse innerhalb der Methode FISH lassen sich teilweise durch die Anwendung von manuellen und automatisierten Verfahren erklären. So konnte Tomita et al. allein 9,1 % mehr Amplifikationen durch ein dreidimensionales FISH Auswertungsverfahren detektieren (Tomita et al. 2009). Das sensitivste Verfahren zur Analyse von Amplifikationen ist die FISH, da die Genkopiezahl in einzelnen Tumorzellkernen bestimmt wird. Im Gegensatz sind andere Methoden, die isolierte DNA zur Analyse benutzen (z.B. wie aCGH, PCR) anfällig gegen Kontaminationen der Gewebeproben durch Nicht-Tumorzellen. Lymphozyten, wie zum Beispiel Endothelzellen oder Stromazellen.

Jedoch bringt auch die ESR1 Auswertung mit FISH weitere spezifische technische Schwierigkeiten mit sich, welche zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Ein wichtige Rolle spielt die kleine Größe des ESR1 Amplikons, und die dadurch bedingte ungewöhnlich kleine Distanz zwischen ESR1

37

Gensignalen und das meist niedrige Level der ESR1 Genkopienzahl.

Statt als wolkenartiges FISH Signal, das als typisch für HER2 Gen-Amplifikationen angesehen wird, erscheint das kleine Cluster von ESR1 Gensignalen eher häufig als ein einziges, irregulär groß geformtes FISH Signal, wodurch die exakte Bestimmung der Kopienanzahl bei manchen Gewebespots unmöglich wird.

Hinzu kommt, dass die vorherigen und die laufende Analyse von verschiedenen Personen durchgeführt wurden. Aufgrund dieser Schwierigkeiten, die genaue FISH Kopienzahl zu bestimmen, sind die beobachteten geringen Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen durch technische Probleme und Intraobservervarianz zu erklären. Diese Daten zeigen, dass genaue Schätzungen der ESR1 Genkopienzahl mit derzeitig verfügbaren FISH Reagenzien sich als schwierig erweist.

Immerhin zeigten 79% eine komplette Übereinstimmungsrate des ESR1 Amplifikationsstatus von primären Mammakarzinomen und ihren Lymphknotenmetastasen. Im Licht der oben genannten Probleme ist diese Zahl als sehr hoch zu bewerten. Ein Studie, die am selben Kollektive für HER2 durchgeführt wurde, ergab eine Übereinstimmungsrate von 77%. (Simon et al. 2001)

In dieser Studie betrug die durchschnittliche ESR1 Kopienzahl 6,2. Das ist deutlich niedriger als die üblichen 20-30 Signale, die typischerweise bei HER2 amplifizierten Fällen vorkommen (Sauter et al. 2009). Ein großer Teil von niedrigen Amplifikationskopien wird ausnahmslos zu einer erhöhten Anzahl von Grenzfällen führen, die verschieden kategorisiert werden können, sogar bei zweimaliger Zählung des gleichen FISH Datensatzes.

Keiner der hoch amplifizierten oder eindeutig nicht-amplifizierten Fälle zeigte diskrepante Ergebnisse zwischen Primärtumoren und den zugehörigen Metastasen. Alle diskrepanten Fälle in unserer Studie beinhalteten Grenzfälle. Es ist möglich, dass die Anzahl dieser Fälle mit einer professionellen Sonde mit einem optimaleren Signal-Untergrund-Verhältnis weiter vermindert werden könnte.

Darüber hinaus liefern unsere Daten keinen Beweis für die Existenz einer eindeutigen Diskrepanz des ESR1-Amplifikationsstatus bei verschiedenen

Karzinommanifestationen eines Patienten. Indirekt lassen diese Befunde auch einen niedrigen Grad an ESR1 Amplifikationsheterogenität bei Primärtumoren vermuten.

Im Falle einer hohen Primärtumoren-Heterogenität wurde erwartet, dass eine zufällige Metastasierung amplifizierter und nicht-amplifizierter Karzinomzellen zu verschiedenen ESR1 Befunden in verschiedenen Metastasen von "gemischten" Primärtumoren führen würde. Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass die Amplifikationsanalyse, durchgeführt bei kleinen Gewebeproben, wie beispielsweise im Rahmen einer Stanzbiopsie gewonnen, möglicherweise hoch repräsentative Informationen über den ESR1 Status des gesamten Karzinoms liefern könnte.

Der niedrige Anteil an ESR1 Amplifikationsheterogenität entspricht der Hypothese von ESR1 Amplifikationen als ein frühes Ereignis in der malignen Transformation von Mamma-Epithelzellen. Der Vergleich von DCIS mit invasiven Mammakarzinomen in Bezug auf ESR1 Amplifikationen untermauert diese Hypothese, da der Anteil an Amplifikationen in DCIS nicht signifikant von denen in invasiven Karzinomen abweicht (Burkhardt et al. 2010; Moelans et al. 2010).

Obwohl der Amplifikationsgrad bei vielen Karzinomen niedrig war, wurde eine hohe Korrelation mit ER Expression (98,34%) festgestellt. Sogar in der Tumorgruppe mit 4-6 ESR1 Kopien pro Zelle, wurde ein Allred Score von 7-8 in 85,7% der Fälle beobachtet. Jedoch zeigten 58,35% der ER expremierenden Tumoren keine ESR1 Amplifikation. Andere Mechanismen für ER Hochregulierung, wie erhöhte Promotor Aktivität des ER α Gens auf transkriptionaler Ebene oder ein verminderter Abbau von ER α Proteinen durch Ubiquitination und proteasomale Prozesse, treffen vielleicht für diese Tumoren zu (Miyoshi et al. 2010).

Weitere Studiendaten weisen auf eine Verbindung zwischen der ESR1 Amplifikation und einem längeren krankheitsfreien Überleben hin, sowie die negative Korrelation mit Tumorgröße, Anzahl von positiven Lymphknoten, negativen ER α und positiven HER2 Status (Tomita et al. 2009). Eine mögliche Erklärung für die Bedeutung der ESR1 Amplifikation als prediktiven Wert könnte

39

die Hypothese sein, dass die Amplifikation einen Schwachpunkt im Tumor darstellt. Ein Selektionsprozess, der zu der Präsenz ebendieser Amplifikation in allen Tumorzellen führt, könnte den Tumor entscheidend abhängig machen von diesem die Amplifikation involvierenden Signalweg. Die Blockade dieses Signalweges wäre dann therapeutisch sehr gut nutzbar.

Dagegen stehen Ergebnisse einer Forschungsgruppe, die in ihren Versuchen die ESR1 Amplifikation mit einer schlechten Prognose und einem schlechten krankheitsfreien Überleben verbunden sahen (Nielsen et al. 2010). In einem Vergleich zwischen Patientinnen mit Rezidiv zeigten die Tumoren in 22 % eine ESR1 Amplifikation, wohingegen die Tumoren von Patientinnen, die über 7 Jahre rezidivfrei waren, nur in 5% der Fälle eine ESR1 Amplifikation hatten. Zudem korrelierte die Amplifikation mit einem höherem Tumorgrading und einem positiven Nodalstatus (Nielsen et al 2010).

Interessanterweise wurde in unserer Analyse keine bedeutsame Differenz bei der Häufigkeit von ESR1 Amplifikationen zwischen nodal-negativen Karzinomen (30,4%), nodal-positiven (25,2%) und den dazugehörigen Metastasen (29,6 %, p=0,4212) beobachtet. Dieser Befund könnte als Gegenargument zu einer starken prognostischen Bedeutung von ESR1 Amplifikationen bei Mammakarzinomen angesehen werden.

Heterogenität bei ESR1 Genamplifikationen von Primärkarzinomen und ihren Metastasen wurde bisher noch nicht ausgiebig untersucht. In einer Studie wurden 23 korrespondierende Lymphknotenmetastasen untersucht und diese waren übereinstimmend mit den Primärtumoren in Bezug auf die ESR1 Amplifikation (Burkhardt et al. 2010). Die meisten Heterogenitätsdaten betreffen den HER2 Status beim Mammakarzinom. Hier sind Genamplifikationen fast vollständig homogen. In einer Studie über nodale Metastasen am gleichen TMA wurden kaum wirklich diskrepante Fälle von HER2 Amplifikationen zwischen Primärtumoren und ihren Metastasen gesehen, insbesondere nach der Korrektur von Grenzfällen (Simon et al. 2001).

Die vorliegenden Daten lassen ein ähnlich hohes Level an Homogenität für ESR1 Amplifikationen vermuten. Solche Daten sprechen für ein frühes Auftreten beider Amplifikationen in der Kanzerogenese in bestimmten Subtypen von Mammakarzinomen. Dies steht im Einklang mit der zentralen Rolle von HER2 und Östrogenrezeptor Expression in der Mammakarzinom-Klassifikation beruhend auf Genexpressions -Messwerten (Hannemann et al. 2006; Castro et al. 2008).

Die hohe Homogenität des Rezeptorstatus kann auch dazu geführt haben, dass diese sich außerordentlich gut als therapeutische Ziele eignen. Es ist gut möglich, dass weniger Homogenität von Genamplifikationen bei anderen Genund Karzinomtypen vorgefunden wird. Heterogenität von Amplifikationen kann erhebliche negative Auswirkungen auf den therapeutischen Nutzen dieser Gene haben.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ESR1 Amplifikationen weitgehend zwischen Mammakarzinomen und ihren Metastasen übereinstimmend sind. Sie lassen vermuten, dass sich der ESR1 Amplifikationsstatus nicht weiter unter Therapie verändert. Weitere Studien werden benötigt, um mögliche Unterschiede beim Ansprechen auf antihormonelle Therapien bei amplifizierten und nicht-amplifizierten Karzinomen zu erforschen.

Zusammenfassung

Vorherige Studienergebnisse deuten auf eine erhöhte Responsivität von ESR1 amplifizierten Mammakarzinomen auf eine endokrine Therapie hin (Holst et al. 2007). Da ESR1 Amplifikationen auch in duktalen Hyperplasien ohne jegliche morphologischen Anzeichen für Malignität gefunden wurden (Holst et al. 2007), wurde die Hypothese aufgestellt, dass ESR1 Amplifikationen ein frühes Ereignis bei der malignen Transformation von Mamma-Epithelzellen darstellen könnte. Unter dieser Annahme könnte sich die ESR1 Amplifikation wohlmöglich als prädiktiver Marker eignen. Allerdings werden prädiktive Marker gewöhnlich an Primärkarzinomen untersucht, während Metastasen nur eventuell behandelt werden. Die Eignung hängt daher in hohem Maße von der Übereinstimmung der molekularen Ergebnisse zwischen Primärkarzinomen und ihren Metastasen ab.

Es wurde ein TMA, zusammengesetzt aus 196 Primärkarzinomen sowie jeweils 3 zugehörige Lymphknotenmetastasen durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) analysiert, um potentielle Unterschiede hinsichtlich des ESR1 Status bei Primärkarzinomen und ihren zugehörigen Metastasen zu identifizieren. Zudem wurden aus jeder Tumorprobe 3 Stanzen entnommen, um auch eine mögliche Heterogenität innerhalb einer jeden Gewebeprobe untersuchen zu können.

In dieser Studie haben wir ESR1 Amplifikationen bei 27,9% der Primärkarzinome gefunden. Die ESR1 Amplifikation korrelierte stark mit der ER Expression (p<0.0001). Zum großen Teil bestand Homogenität im intratumoralen Vergleich, sowohl im Vergleich zwischen den Primärtumoren und den dazugehörigen Metastasen, als auch zwischen den Metastasen eines Patienten.

Diskrepante Ergebnisse wurden zwischen Primärkarzinomen und ihren Metastasen in 21% der Fälle und zwischen verschiedenen Metastasen eines jeweiligen Patienten in 22,7% der Fälle festgestellt.

Alle diskrepanten Fälle hatten grenzwertige Ergebnisse, die vermuten lassen, dass die beobachteten Unterschiede eher durch Schwankungen bei der Auswertung als durch tatsächliche biologische Unterschiede verursacht wurden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ESR1 Amplifikationen häufig bei Mammakarzinomen auftreten und sehr homogen sind. Dies steht im Einklang mit der Rolle von ESR1 Amplifikation als ein frühes Ereignis in der Entwicklung von Mammakarzinomen sowie deren Eignung als diagnostischer Marker auch bei kleinen Gewebeproben.

Literaturverzeichnis

Aktories, K.; Förstermann,U.; Hofmann, F. B.; Starke, K. (2009) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 10. Auflage :683-696 Urban & Fischer in Elsiever, München

Albertson, D. G. (2006). "Gene amplification in cancer." Trends Genet 22(8): 447-455.

Barrett, J. C. (1993). "Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment." <u>Environ Health Perspect</u> **100**: 9-20.

Barone, I., L. Brusco, et al. (2010). "Estrogen receptor mutations and changes in downstream gene expression and signaling." <u>Clinical cancer research : an official</u> journal of the American Association for Cancer Research **16**(10): 2702-2708.

Bombonati, A. and D. C. Sgroi (2011). "The molecular pathology of breast cancer progression." <u>J Pathol</u> **223**(2): 307-317.

Brown, L. A., J. Hoog, et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" <u>Nature genetics</u> **40**(7): 806-807; author reply 810-802.

Buerger, H., F. Otterbach, et al. (1999). "Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes." <u>J Pathol</u> **189**(4): 521-526.

Buijs, C., E. G. de Vries, et al. (2008). "The influence of endocrine treatments for breast cancer on health-related quality of life." <u>Cancer Treat Rev</u> **34**(7): 640-655.

Burkhardt, L., T. J. Grob, et al. (2010). "Gene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast." <u>Breast cancer research and treatment</u> **123**(3): 757-765.

Campbell, L. L. and K. Polyak (2007). "Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution?" <u>Cell Cycle</u> **6**(19): 2332-2338.

Castro, N. P., C. A. Osorio, et al. (2008). "Evidence that molecular changes in cells occur before morphological alterations during the progression of breast ductal carcinoma." <u>Breast cancer research : BCR</u> **10**(5): R87.

Cella, D. and L. J. Fallowfield (2008). "Recognition and management of treatmentrelated side effects for breast cancer patients receiving adjuvant endocrine therapy." <u>Breast cancer research and treatment</u> **107**(2): 167-180.

Cuzick, J., I. Sestak, et al. (2010). "Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial." <u>The lancet oncology</u> **11**(12): 1135-1141.

"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." <u>Lancet</u> **365**(9472): 1687-1717.

Elston, C. W. and I. O. Ellis (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." <u>Histopathology</u> **19**(5): 403-410.

Farmer, P., H. Bonnefoi, et al. (2005). "Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis." <u>Oncogene</u> **24**(29): 4660-4671.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. <u>GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide</u>: IARC CancerBase No. 10 Lyon, France

Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." <u>Nat Rev Cancer</u> **3**(6): 453-458.

Fleissig, A., L. J. Fallowfield, et al. (2006). "Post-operative arm morbidity and quality of life. Results of the ALMANAC randomised trial comparing sentinel node biopsy with standard axillary treatment in the management of patients with early breast cancer." <u>Breast cancer research and treatment</u> **95**(3): 279-293. Geyer, C. E., J. Forster, et al. (2006). "Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer." <u>The New England journal of medicine</u> **355**(26): 2733-2743.

Geyer, F. C., T. Decker, et al. (2009). "[Genome-wide expression profiling as a clinical tool: are we there yet?]." <u>Pathologe</u> **30**(2): 141-146.

Goldberg, J. I. and P. I. Borgen (2006). "Breast cancer susceptibility testing: past, present and future." <u>Expert Rev Anticancer Ther</u> **6**(8): 1205-1214.

Gupta, G. P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." <u>Cell</u> **127**(4): 679-695.

Hadji, P. (2010). "Improving compliance and persistence to adjuvant tamoxifen and aromatase inhibitor therapy." <u>Critical reviews in oncology/hematology</u> **73**(2): 156-166.

Hannemann, J., A. Velds, et al. (2006). "Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling." <u>Breast cancer research : BCR</u> **8**(5): R61.

Holst, F., P. R. Stahl, et al. (2007). "Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer." <u>Nature genetics</u> **39**(5): 655-660.

Hopp, T. A. and S. A. Fuqua (1998). "Estrogen receptor variants." <u>J Mammary Gland</u> <u>Biol Neoplasia</u> **3**(1): 73-83.

Horlings, H. M., A. Bergamaschi, et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" <u>Nature genetics</u> **40**(7): 807-808; author reply 810-802.

Joensuu, H., P. L. Kellokumpu-Lehtinen, et al. (2006). "Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer." <u>The New England journal of medicine</u> **354**(8): 809-820.

Kang, Y., P. M. Siegel, et al. (2003). "A multigenic program mediating breast cancer

metastasis to bone." Cancer Cell 3(6): 537-549.

Kelsey, J. L., M. D. Gammon, et al. (1993). "Reproductive factors and breast cancer." <u>Epidemiologic reviews</u> **15**(1): 36-47.

Kurzrock, R., H. M. Kantarjian, et al. (2003). "Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics." <u>Ann Intern Med</u> **138**(10): 819-830.

Liotta, L. A. (2001). "An attractive force in metastasis." Nature 410(6824): 24-25.

Minn, A. J., G. P. Gupta, et al. (2005). "Genes that mediate breast cancer metastasis to lung." <u>Nature</u> **436**(7050): 518-524.

Miyoshi, Y., K. Murase, et al. (2010). "Mechanisms of estrogen receptor-alpha upregulation in breast cancers." <u>Medical molecular morphology</u> **43**(4): 193-196.

Moelans, C. B., R. A. de Weger, et al. (2010). "Molecular differences between ductal carcinoma in situ and adjacent invasive breast carcinoma: a multiplex ligation-dependent probe amplification study." <u>Analytical cellular pathology</u> **33**(3): 165-173.

Musgrove, E. A. and R. L. Sutherland (2009). "Biological determinants of endocrine resistance in breast cancer." <u>Nature reviews. Cancer</u> **9**(9): 631-643.

Myllykangas, S. and S. Knuutila (2006). "Manifestation, mechanisms and mysteries of gene amplifications." <u>Cancer Lett</u> **232**(1): 79-89.

Nagrath, S., L. V. Sequist, et al. (2007). "Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology." <u>Nature</u> **450**(7173): 1235-1239.

Narayanan, V., P. A. Mieczkowski, et al. (2006). "The pattern of gene amplification is determined by the chromosomal location of hairpin-capped breaks." <u>Cell</u> **125**(7): 1283-1296.

Nembrot, M., B. Quintana, et al. (1990). "Estrogen receptor gene amplification is found in some estrogen receptor-positive human breast tumors." <u>Biochemical and</u> <u>biophysical research communications</u> **166**(2): 601-607.

Nielsen, T. O., F. D. Hsu, et al. (2004). "Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma." <u>Clin Cancer</u> <u>Res</u> **10**(16): 5367-5374.

Nielsen, K. V., B. Ejlertsen, et al. (2010). "Amplification of ESR1 may predict resistance to adjuvant tamoxifen in postmenopausal patients with hormone receptor positive breast cancer." <u>Breast cancer research and treatment</u>.

Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2011). "Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes." <u>Clinical pharmacology and therapeutics</u> **89**(1): 44-55.

Osborne, C. K. (1998). "Steroid hormone receptors in breast cancer management." <u>Breast Cancer Res Treat</u> **51**(3): 227-238.

Palesty, J. A., J. M. Foster, et al. (2006). "Axillary recurrence in women with a negative sentinel lymph node and no axillary dissection in breast cancer." <u>Journal of surgical oncology</u> **93**(2): 129-132.

Parker, M. G., N. Arbuckle, et al. (1993). "Structure and function of the estrogen receptor." <u>Annals of the New York Academy of Sciences</u> **684**: 119-126.

Perez, E. A. (2007). "Safety profiles of tamoxifen and the aromatase inhibitors in adjuvant therapy of hormone-responsive early breast cancer." <u>Annals of oncology :</u> <u>official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO</u> **18 Suppl 8**: viii26-35.

Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." <u>Nature</u> **406**(6797): 747-752.

Piccart-Gebhart, M. J., M. Procter, et al. (2005). "Trastuzumab after adjuvant

chemotherapy in HER2-positive breast cancer." <u>The New England journal of medicine</u> **353**(16): 1659-1672.

Pinkel, D. and D. G. Albertson (2005). "Comparative genomic hybridization." <u>Annu Rev</u> <u>Genomics Hum Genet</u> **6**: 331-354.

Polin, S. A. and S. M. Ascher (2008). "The effect of tamoxifen on the genital tract." <u>Cancer Imaging</u> 8: 135-145.

Qureshi, A. and S. Pervez (2010). "Allred scoring for ER reporting and it's impact in clearly distinguishing ER negative from ER positive breast cancers." <u>J Pak Med Assoc</u> **60**(5): 350-353.

Rayala, S. K., P. den Hollander, et al. (2005). "Functional regulation of oestrogen receptor pathway by the dynein light chain 1." <u>EMBO Rep</u> **6**(6): 538-544.

Reis-Filho, J. S., S. Drury, et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" <u>Nature genetics</u> **40**(7): 809-810; author reply 810-802.

Robertson, J. F., S. E. Come, et al. (2005). "Endocrine treatment options for advanced breast cancer--the role of fulvestrant." <u>European journal of cancer</u> **41**(3): 346-356.

Romond, E. H., E. A. Perez, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." <u>The New England journal of medicine</u> **353**(16): 1673-1684.

Ross, R. K., A. Paganini-Hill, et al. (2000). "Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin." <u>Journal of the National</u> <u>Cancer Institute</u> **92**(4): 328-332.

Sauter, G., J. Lee, et al. (2009). "Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations." <u>Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology</u> **27**(8): 1323-1333.

49

Slamon, D. J., G. M. Clark, et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." <u>Science</u> **235**(4785): 177-182.

Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." <u>The New England journal of medicine</u> **344**(11): 783-792.

Simon, R., A. Nocito, et al. (2001). "Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer." <u>Journal of the National</u> <u>Cancer Institute</u> **93**(15): 1141-1146.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind, Ch (2009). TNM. Classification of Malignant Tumours. 7th ed. New York: Wiley:181-193.

Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **98**(19): 10869-10874.

Stark, G. R. and G. M. Wahl (1984). "Gene amplification." <u>Annu Rev Biochem</u> 53: 447-491.

Tabaries, S., Z. Dong, et al. (2011). "Claudin-2 is selectively enriched in and promotes the formation of breast cancer liver metastases through engagement of integrin complexes." <u>Oncogene</u> **30**(11): 1318-1328.

Tavassoli, F.A., Devilee, P. (Hrsg.):WHO-Classification of Tumors: Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs (WHO/IARC 2003):10-11

Tomita, S., Z. Zhang, et al. (2009). "Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients." <u>Cancer</u> <u>science</u> **100**(6): 1012-1017.

50

van der Groep, P., E. van der Wall, et al. (2011). "Pathology of hereditary breast cancer." <u>Cell Oncol (Dordr)</u> **34**(2): 71-88.

van Dongen, J. A., A. C. Voogd, et al. (2000). "Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial." <u>Journal of the National Cancer Institute</u> **92**(14): 1143-1150.

Valastyan, S. and R. A. Weinberg (2011). "Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms." <u>Cell</u> **147**(2): 275-292.

Vincent-Salomon, A., V. Raynal, et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" <u>Nature genetics</u> **40**(7): 809; author reply 810-802.

Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." <u>N Engl J Med</u> **319**(9): 525-532.

Wagener, C.; Müller,O. (2009). Molekulare Onkologie. 3. Auflage: 351-366 Thieme, Stuttgart

Weigelt, B., F. L. Baehner, et al. (2010). "The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade." <u>J Pathol</u> **220**(2): 263-280.

Wittekind, Ch. ,Meyer, H-J (Hrsg.): TNM Klassifikation maligner Tumoren. 7. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim 2010: 169 -179.

Yang, X. R., J. Chang-Claude, et al. (2011). "Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the breast cancer association consortium studies." <u>Journal of the National Cancer Institute</u> **103**(3): 250-263.

Youlden, D. R., S. M. Cramb, et al. (2012). "The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality." <u>Cancer Epidemiol</u> **36**(3): 237-248.

Zepeda-Castilla, E. J., E. Recinos-Money, et al. (2008). "[Molecular classification of breast cancer]." <u>Cir Cir</u> **76**(1): 87-93.

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Atypische duktale Hyperplasie
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AF-2	Aktivierungsfunktion 2
AP1	Aktivator Protein 1
BET	Brusterhaltende Therapie
BRCA 1	Familial breast and ovarian cancer
BRCA2	Familial breast and ovarian cancer syndrom
CGH	komparative genomische Hybridisierung
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DM	Double minutes
DNA	Desoxyribonuleinsäure
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ER	Östrogenrezeptor
ESR1	Estrogen Rezeptor 1
FEA	flache epitheliale Atypie
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HRS	Intrachromosomal homogeneously staining regions
IHC	Immunhistochemie
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
PgR	Progesteron Rezeptor
SERD	Selective estrogen receptor downregulator
SERM	Selective estrogen receptor modulator
TMA	Tissue Microarray
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. G. Sauter und Herrn PD. Dr. rer .nat. R. Simon für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit und die freundliche und gute Betreuung sowohl im Labor als auch während des Schreibens meiner Dissertation bedanken. Ganz besonders möchte ich Herrn PD. Dr. rer. nat. R. Simon für die Geduld danken, die er mir entgegen gebracht hat und die stete Unterstützung, mit der er mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Molekularpathologie für die freundliche Aufnahme in ihre Gemeinschaft, die gute Zusammenarbeit und die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre im Labor.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern und meinen beiden Großmüttern.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Auflage und Jahr des Erscheinens, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt habe oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: