

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Cyclin D1 Gene Amplification is Highly Homogeneous in  
Breast Cancer**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Martin Grünert  
geboren in Schleiz

Hamburg, 2014

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.10.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:** **Prof. Dr. Guido Sauter**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:** **Prof. Dr. Volkmar Müller**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:** **PD Dr. Alexander Gröbe**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Letter of acceptance.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Paper.....</b>	<b>5</b>
2.1.    Abstract.....	7
2.2.    Introduction .....	8
2.3.    Materials and Methods.....	10
2.4.    Results.....	12
2.5.    Discussion.....	14
2.6.    References.....	19
2.7.    Legends.....	23
2.8.    Figures and Tables.....	25
<b>3. Zusammenfassende Darstellung.....</b>	<b>30</b>
3.1.    Hintergrund der Arbeit.....	30
3.2.    Die Rolle von CCND1 bei Brustkrebs.....	30
3.3.    Eigene Untersuchung.....	31
3.4.    Bedeutung der eigenen Befunde.....	32
<b>4. Danksagung.....</b>	<b>36</b>
<b>5. Lebenslauf.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>38</b>

## **1. Letter of acceptance**

**Von:** Editorial Office <[no-reply@editorialmanager.com](mailto:no-reply@editorialmanager.com)>

**Betreff: BRCA: Decision on BRCA-D-13-00221R1**

**Datum:** 9. Mai 2014 09:55:53 MESZ

**An:** Eike Burandt <[e.burandt@uke.de](mailto:e.burandt@uke.de)>

**Antwort an:** Editorial Office <[bcan@springer.jp](mailto:bcan@springer.jp)>

Ref.: Ms. No. BRCA-D-13-00221R1

Cyclin D1 Gene Amplification is Highly Homogeneous in Breast Cancer  
Breast Cancer

Dear Dr. Burandt,

I am pleased to inform you that your work has now been accepted for publication in Breast Cancer.

The publication process and steps you will need to take are described at  
<http://springer.jp/mypublication/oc-mypub-en.html>.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards

SHINZABURO NOGUCHI

Editor-in-Chief

Breast Cancer

Reviewer #1: The manuscript has been much improved and is in a nice condition now.

## **2. Paper**

# Cyclin D1 Gene Amplification is Highly Homogeneous in Breast Cancer

Eike Burandt<sup>1\*</sup>, Martin Grünert<sup>1\*</sup>, Annette Lebeau<sup>1</sup>, Matthias Choschzick<sup>1</sup>, Alexander Quaas<sup>1</sup>, Fritz Jänicke<sup>2</sup>, Volkmar Müller<sup>2</sup>, Ursula Scholz<sup>2</sup>, Carsten Bokemeyer<sup>3</sup>, Cordula Petersen<sup>4</sup>, Stefan Geist<sup>5</sup>, Peter Paluchowski<sup>5</sup>, Christian Wilke<sup>6</sup>, Uwe Heilenkötter<sup>7</sup>, Ronald Simon<sup>1</sup>, Guido Sauter<sup>1</sup>, Waldemar Wilczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Pathology, University Medical Center Hamburg- Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

<sup>2</sup> Department of Gynecology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

<sup>3</sup> Department of Internal Medicine II, Oncology Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

<sup>4</sup> Department of Radiotherapy and Radio-Oncology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany

<sup>5</sup> Department of Gynecology, Regio Clinic Pinneberg, 25421 Pinneberg, Germany

<sup>6</sup> Department of Gynecology, Regio Clinic Elmshorn, 25337 Elmshorn, Germany

<sup>7</sup> Department of Gynecology, Clinical Centre Itzehoe, 25524 Itzehoe, Germany

\* These authors have contributed equally

## **Correspondence**

Eike Burandt, MD, Department of Pathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany, e-mail: [e.burandt@uke.de](mailto:e.burandt@uke.de)

Running title: Cyclin D1 heterogeneity in breast cancer

Keywords: Cyclin D1, heterogeneity, breast cancer, FISH, Heterogeneity-TMA

## 2.1. ABSTRACT

**Background:** Cyclin D1 (CCND1) gene amplification is a molecular key alteration in breast cancer and was suggested to predict resistance to anti-hormonal therapy. As tissue heterogeneity may affect diagnostic accuracy of predictive biomarkers, CCND1 genetic heterogeneity was assessed in this study. A novel tissue microarray (TMA) platform was manufactured for this purpose. **Methods:** Primary breast carcinomas from 147 patients were sampled in a “heterogeneity TMA” by taking 8 different tissue cores from 4 to 8 tumor containing blocks per case. Additional tissue samples were taken from 1 to 4 corresponding nodal metastases in 35 of these patients. CCND1 amplification was assessed by fluorescence in situ hybridization (FISH). **Results:** CCND1 amplification was seen in 28 of 133 (21.05%) informative patients. Amplification was significantly associated with high tumor grade ( $p=0.042$ ) but unrelated to tumor type ( $p=0.307$ ), stage ( $p=0.540$ ) and ER ( $p=0.061$ ) or PR ( $p=0.871$ ) expression. A discordant Cyclin D1 amplification status was detected in 6 out of 28 (21.43%) amplified tumors by heterogeneity TMA analysis. Re-testing on large sections revealed 3 patients with true heterogeneity of high level CCND1 amplification and another 3 patients with variable interpretation of borderline FISH ratios ranging between 1.7 and 2.3. No discrepancies were detected between 22 primary tumors and their matched lymph node metastases. **Conclusions:** The high degree of homogeneity seen for CCND1 amplification suggests that this alteration is an early event in the development of a small subset of breast cancers.

## **2.2. INTRODUCTION**

It is assumed that about 40% of breast cancer patients treated with endocrine therapy are resistant to this therapy [1]. Suggested predictors for tamoxifen resistance include altered expression of ESR [1], PAX2 and AIB-1/SRC-3 [2], Pak1 [3], ERR-gamma, Ap1 [4] and XBP1 [5], PKA [6], and activation of the PI3K/AKT survival pathways [7].

Several studies have also discussed Cyclin D1 (CCND1) amplification as a possible mechanism for tamoxifen resistance [8-11]. CCND1, located on chromosome 11q13 is amplified in about 10-20% of breast cancers [12-14]. Cyclin D1 protein plays an important role in the regulation of the G1 phase in the cell cycle. It binds to cyclin dependent kinase 4 (CDK4) or CDK6 to promote phosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb) and other substrates. The inhibition of cell cycle progression by unphosphorylated Rb is hereby repealed and cells are able to enter S phase [15].

The expression and function of Cyclin D1 is regulated by estrogens through the estrogen receptor and can be indirectly affected by antiestrogen drugs [16]. On the other hand it is suggested that ectopic expression of Cyclin D1 can stimulate the transcriptional activity of the estrogen receptor in the absence of estradiol [17]. Cyclin D1 seems to play also a role in the steroid-induced proliferation of mammary epithelium during pregnancy [18].

CCND1 amplification preferentially occurs in ER positive breast cancers [12,14]. Eight different studies have shown data suggesting that CCND1 amplification is linked to poor response of tamoxifen therapy [8-11,19,20-22]. However, other authors could not confirm these findings. At least six studies failed to find such an association [15,23,24-27]. There are also controversial data regarding the prognostic value of CCND1 amplification and Cyclin D1 overexpression. Some studies found an association between CCND1 amplification and bad outcome [28,29], other studies failed to see a connection [13] or

found an improved prognosis for CCND1 positive patients [30].

One potential weakness of all molecular tumor testing is that a molecular tumor status is mostly determined from one tissue sample of the primary tumor that was removed during initial surgery. But systemic therapies target disseminated tumor cells that give rise to tumor metastases. A heterogeneous molecular status of the primary tumor and potentially also of the metastases could either prevent response to therapy or lead to a situation where a potential target is not detected by standard diagnostic procedures in the primary tumor.

While previous studies on breast cancer have suggested a high homogeneity of HER2 amplification and overexpression in these tumors, such analyses are lacking for CCND1. In an attempt, to quantify the level of heterogeneity of CCND1 amplification in breast cancer, we analyzed CCND1 amplification in a newly designed “heterogeneity tissue microarray (TMA)” comprising 8 different tumor areas taken from 147 breast cancer patients. Additionally lymph node metastases from 35 of these patients were included in the TMA. Our results show a very low frequency of CCND1 genetic heterogeneity in breast cancer.

## **2.3. MATERIALS AND METHODS**

**Tissue microarray.** By reviewing the paraffin sections of 530 consecutive breast carcinomas stored at the archives of the Institute of Pathology of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 147 tumors with extensive tumor sampling (at least 4 paraffin blocks per tumor) were identified to analyze genetic heterogeneity in breast cancer. Eight different tissue cores were taken per tumor for TMA construction. If less than 8 paraffin blocks were available, two tissue cores had to be taken from at least one block. Emphasis was placed on taking these samples from areas that were as distant from each other as possible. In 47 patients 8 different tumor blocks were available for punching, while 7 blocks were available in 17 patients, 6 blocks in 16 patients, 5 blocks in 24 patients and 4 blocks in 43 patients. Additionally, paraffin blocks of lymph node metastases were available in 35 of the patients. One tissue core was analyzed per metastasis. The number of punched metastases was 4 in 11 patients, 3 in 4 patients, 2 in 10 patients, and 1 in 10 patients.

**Fluorescence in-situ hybridization (FISH).** For FISH analysis 4 µm sections of the resulting TMA blocks were cut and transferred to an adhesive coated slide system (Instrumedics Inc., Hackensack, New Jersey). A commercial kit was used for proteolytic slide pretreatment (paraffin pretreatment reagent kit, Vysis, Downers Grove, IL, USA). FISH analysis was performed with a commercial FISH probe kit containing both the CCND1 gene specific and the corresponding CEP 11 centromere probe (cat.# 5J4101, Abbott, USA). Hybridization and posthybridization washes were done according to the 'LSI procedure' (Abbott). Slides were then counterstained with 125 ng/ml 4',6-diamino-2-phenylindole in an antifade solution. Copy numbers of gene specific and the corresponding centromere sequences were estimated for each tissue spot as previously described

[12,31-33]. Each tissue spot was completely screened for amplified cells in order to potentially detect focal amplification. A tumor was considered amplified if predominant tumor cell population had at least twice as many gene signals than centromere signals of the respective chromosome (ratio  $\geq 2.0$ ). A detailed scoring of 20 cells per sample was executed in case of equivocal results (i.e. relative increase of CCND1 signals but absence of clear cut amplification). All other tumors were considered non-amplified. If different spots of one tumor showed discordant results, the tumor was considered putative heterogeneous. For validation of CCND1 heterogeneity, FISH analysis was performed on large sections of all tumor blocks sampled for the TMA. Additionally, the presence of cancer cells in each TMA spot was reconfirmed by a second observer. Figures 1 and 2 give examples of amplified and non-amplified tumors.

**Statistics.** Contingency table analysis and chi square tests were used to study the relationship between FISH results and other parameters. SAS software (SAS Institute Inc, JMP 5.1 software; Cary, North Carolina, USA) was used for data analysis.

## 2.4. RESULTS

**Technical aspects.** In 14 of 147 (9.52%) patients no TMA spots were informative due to insufficient hybridization (equivocal signals, high background) or absence of tissue or cancer cells in arrayed tissue. In the remaining 133 patients, the number of interpretable tissue spots was 1 in 15 patients, 2 in 10 patients, 3 in 12 patients and 4 in 96 patients.

**CCND1 amplification.** CCND1 amplification was detected in 28 of 133 informative tumors (21.05%). In all these cases, amplification involved the entire tumor cell population of a TMA spot. These cases included 14 patients with high-level gene amplification (>10 gene copies per tumor cell nucleus) and 14 patients with low-level amplification (2 – 10 CCND1 copies per tumor cell nucleus). The detailed scoring results per tissue spot for CCND1 are described for all 28 amplified tumors in Figure 3. These data also demonstrate that the higher the CCND1 copy numbers were, the higher the likelihood of amplification homogeneity. All associations between CCND1 gene amplification and tumor phenotype are shown in Table 1. Amplification was significantly associated with high histological grade ( $p=0.042$ ). It tended to be correlated with nodal status (pN) ( $p=0.057$ ) and ER status ( $p=0.061$ ).

**Heterogeneity of CCND1 amplification in primary tumors.** Discordances in the CCND1 amplification status were detected between the arrayed samples of 6 amplified tumors. Heterogeneity was confirmed on large sections in 3 cases with high-level amplification, i. e. 10.7% of the amplified tumors and 2.3% of all informative cases, respectively. The discordant results in the remaining cases were due to the variable determination of the CCND1 to CEP 11 ratio in the borderline range between 1.7 and 2.3. (data are

summarized in Table 2). Representative cases are pictured in Figure 1 and 2.

**CCND1 amplification in metastases and concordance to primary tumors.**

Interpretable CCND1 FISH data were available for 1-3 lymph node metastases from 23 patients. FISH was informative in the primary tumor spots in 22 of these cases. 6 patients of these showed homogeneously positive and 15 homogeneously negative primary tumors and metastases with a complete concordance of the CCND1 amplification status between primary tumors and metastases. There was only one patient with heterogeneous CCND1 status in the primary tumor and absence of amplification in all 3 metastases. Therefore, the concordance rate between primary tumor and metastases added up to 100%.

## **2.5. DISCUSSION**

In this study, FISH was used to identify breast cancers with CCND1 amplification. CCND1 amplification was found in 28 of our 133 tumors (21.05%). This frequency is in the range of previous studies, which found CCND1 amplification in about 10-20%. In 5 studies amplification-status was determined by FISH [9,11,12,23,34], in 6 studies immunohistochemistry for Cyclin D1 was performed [9-11,13,14,23] and 3 other studies [10,13,14] also used other methods (real time PCR, CISH).

Tumor heterogeneity is a critical issue and a major limitation for molecular diagnostics and targeted cancer therapy. Diagnostic accuracy of a molecular assay may be limited if the analyzed biomarker is only present in a fraction of a tumor. Absence of a drug target structure in a cancer subpopulation of a patient tested “positive” for a specific drug target may cause drug resistance after outgrowth of the target-negative population under therapy. Considering its importance, the number of studies analyzing target heterogeneity is relatively small. If tumor heterogeneity is analyzed and quantified, this is usually based on the analysis of one slide/block per tumor/patient. However, one tissue section may not completely represent the biology of a large cancer. For example, one tissue section containing a tumor area of  $2 \times 1 \text{ cm}$  represents 1/88 of a cancer measuring  $0.07 \text{ cm}^3$  (the minimal volume among the breast cancers included in this study) or 1/275000 of a cancer measuring  $220 \text{ cm}^3$  (the maximal volume among the breast cancers included in this study).

In order to better understand and quantify molecular heterogeneity in breast cancer, a new analysis platform was generated for this study. The TMA constructed in this study contains tissue samples measuring 0.6 mm in diameter from 4-8 different tumor blocks per primary

tumor as well as samples from 1-4 different nodal metastases. Based on the assumption that biologically relevant subpopulations are coherent and will expand within one region of a tumor, this approach is likely to enable an unprecedented representation of the molecular diversity of a breast cancer. For each arrayed tumor, great effort was taken to assure maximal possible distances between the individual punches. The average number of tumor blocks per breast cancer specimen was 6.0 in this study (specification without metastatic blocks). The heterogeneity TMA concept introduced in this project, which is shown in Figure 4, differs markedly from previous attempts to increase the representativity of TMAs by sampling multiple cores from one tumor block. It is conceivable, that arraying 3 and more cores from one tumor block may not substantially improve the sampling representativity on a tumor level, although it will improve the concordance of TMA results with corresponding large section analyses [35].

The low frequency (2.26%) of heterogeneous CCND1 amplification argues for an early occurrence of CCND1 amplification in breast cancer development. This notion also fits well with our previous observation of a very high concordance between CCND1 amplification in DCIS and neighbouring invasive ductal carcinomas. In 73 analyzed cases, we earlier observed a concordance rate of 97.3% between invasive carcinoma and DCIS [36]. The 100% concordance rate between the findings in 22 invasive carcinomas and their nodal metastasis regarding their CCND1 amplification status further supports the notion of early occurrence of CCND1 amplification in a subset of breast cancer. Similar observations were made with respect to the absolute CCND1 copy numbers, which showed only little variability across the same cancer. Tumors with high-level amplification typically had more than 10 CCND1 gene copy in all analysable tissue spots of the same tumor specimen, again arguing for CCND1 amplification as an early event in a fraction of breast cancers.

From these and other data, breast cancer appears to represent an unusually homogeneous tumor, at least on the level of gene amplifications. For example, several studies have demonstrated a high level of homogeneity of HER2 amplification [36-39]. Others and we have also failed to find massive differences in the amplification frequency of MYC and ESR1 between DCIS and adjacent invasive cancers [36,40-42], another argument for a generally early occurrence of the major gene amplifications in breast cancer. The marked intratumoral heterogeneity of MYC and Cyclin D1 amplification described in one early breast cancer study might be caused by PCR based DNA quantitation with the inherent risk of a variable admixture of non-neoplastic cells [43]. Here, the fraction of tumor cells in the tissue sample may become an important factor largely influencing the outcome of the analysis. In case of a low-level CCND1 amplified sample with 5 gene copies, the ratio CCND1 to the reference gene will be  $5 : 2 = 2.5$  provided the tumor cell content is 100%. However, a tumor cell content of 70% is generally accepted as being sufficient for molecular analysis. In this case, the ratio drops to  $4.1 : 2 = 2.05$  (because the average CCND1 copy number is  $5 \text{ gene copies} \times 70\% + 2 \text{ gene copies} \times 30\% = 4.1 \text{ gene copies}$ ), which comes already very close to “non-amplified”. In low-level amplified cases with less than 70% tumor cells, aneuploidy of chromosome 11, or CCND1 copy number heterogeneity, the ratio may easily drop below the 2.0 threshold, and PCR analysis will reveal a false-negative result. In contrast, FISH analysis is not affected by concomitant non-neoplastic cells since these can be easily identified and excluded from the analysis. FISH analysis of tissue spots measuring 0.6 mm in diameter typically includes about 200-500 individual cancer cells. In our study, we have not counted a particular number of cell nuclei per tissue spot, but rather estimated the predominant copy numbers for CCND1 and centromere 11 in each tissue spot. This procedure massively

accelerates the analysis of high density TMA. Data from our laboratory have previously shown that diagnosis of amplification based on signal number estimation is highly reliable [44].

It is noteworthy, that other cancers show dramatically higher rates of genomic heterogeneity. In prostate cancer, for example, we recently showed that ERG overexpression caused by TMPRSS2-ERG rearrangements are heterogeneous in about 2/3 of ERG positive cases using a similar heterogeneity TMA approach as used in this study [45]. Both lung and colorectal cancer show intratumoral heterogeneities regarding the EGFR status [31,46]. Also, there are many studies, which found amplification differences of EGFR between primary tumor and metastases in those two tumor entities [47-49]. We had also found considerable heterogeneity of the important therapeutic target HER2 in studies on bladder [50] and colon cancer [51], while the same target is apparently homogeneously amplified in breast [36-39] and gastric cancer [52]. The significant homogeneity of HER2 in breast cancer constitutes an optimal therapeutic target, which already finds clinical usage. If further studies should confirm CCND1 induced tamoxifen resistance, CCND1 analysis could be reliably performed on small biopsies.

Technical issues represent a significant problem in studies analyzing heterogeneity, because every false positive or false negative result will lead to a falsely heterogeneous case. Every effort was thus taken in this study to avoid false interpretations including morphologic confirmation of presence of cancer for each arrayed tissue sample and a large section confirmation in all heterogeneous cancers. We thus believe, that our data are not affected by technical insufficiencies. It cannot be excluded, however, that very small areas of CCND1 amplification (or missing amplification) have still been missed by our

approach.

In summary, the results of this study show that CCND1 amplification is rarely heterogeneous in breast cancer. The high degree of homogeneity seen for CCND1 amplification suggests that this alteration represents an early event in breast cancer development in a small subset of breast cancers and that the CCND1 amplification status determined in a core biopsy will be highly representative of the entire tumor and appropriate for predicting treatment outcome if applicable.

### **Conflict of interest and source of funding**

The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining this article.

### **Acknowledgements**

The authors appreciate the excellent technical support of Christina Koop, Sylvia Schnöger and Sasha Eghtessadi.

## 2.6. REFERENCES

1. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer* 2004;11(4):643-658. doi:11/4/643 [pii] 10.1677/erc.1.00776
2. Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, et al. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* 2008;456(7222):663-666. doi:nature07483 [pii] 10.1038/nature07483
3. Holm C, Rayala S, Jirstrom K, Stal O, Kumar R, Landberg G. Association between Pak1 expression and subcellular localization and tamoxifen resistance in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(10):671-680. doi:98/10/671 [pii] 10.1093/jnci/djj185
4. Riggins RB, Lan JP, Zhu Y, Klimach U, Zwart A, Cavalli LR, et al. ERRgamma mediates tamoxifen resistance in novel models of invasive lobular breast cancer. *Cancer Res* 2008;68(21):8908-8917. doi:68/21/8908 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-08-2669
5. Shajahan AN, Riggins RB, Clarke R. The role of X-box binding protein-1 in tumorigenicity. *Drug News Perspect* 2009;22(5):241-246. doi:1378631 [pii] 10.1358/dnp.2009.22.5.1378631
6. Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, Verwoerd D, Janssen L, Jalink K, et al. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell* 2004;5(6):597-605. doi:10.1016/j.ccr.2004.05.016 S1535610804001461 [pii]
7. Campbell RA, Bhat-Nakshatri P, Patel NM, Constantinidou D, Ali S, Nakshatri H. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001;276(13):9817-9824. doi:10.1074/jbc.M010840200 [pii]
8. Rudas M, Lehnert M, Huynh A, Jakesz R, Singer C, Lax S, et al. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(6):1767-1774. doi:14/6/1767 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-07-4122
9. Jirstrom K, Stendahl M, Ryden L, Kronblad A, Bendahl PO, Stal O, et al. Adverse effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer with cyclin D1 gene amplification. *Cancer Res* 2005;65(17):8009-8016. doi:65/17/8009 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-05-0746
10. Bostner J, Ahnstrom Waltersson M, Fornander T, Skoog L, Nordenskjold B, Stal O. Amplification of CCND1 and PAK1 as predictors of recurrence and tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer. *Oncogene* 2007;26(49):6997-7005. doi:1210506 [pii] 10.1038/sj.onc.1210506
11. Lundgren K, Holm K, Nordenskjold B, Borg A, Landberg G. Gene products of chromosome 11q and their association with CCND1 gene amplification and tamoxifen resistance in premenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res* 2008;10(5):R81. doi:bcr2150 [pii] 10.1186/bcr2150
12. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zaharieva B, Novotny H, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res* 2004;64(23):8534-8540. doi:64/23/8534 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-04-1945
13. Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, James M, Steele D, Jones RL, et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: an immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridisation analysis. *Mod Pathol*

2006;19(7):999-1009. doi:3800621 [pii] 10.1038/modpathol.3800621

14. Elsheikh S, Green AR, Aleskandarany MA, Grainge M, Paish CE, Lambros MB, et al. CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat* 2006;109(2):325-335. doi:10.1007/s10549-007-9659-8
15. Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, Gee JM, Blamey RW, Nicholson RI, et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5(8):2069-2076
16. Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2003;10(2):179-186
17. Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J, et al. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol* 1997;17(9):5338-5347
18. Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, Li T, Fazeli A, Gardner H, et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 1995;82(4):621-630. doi:0092-8674(95)90034-9 [pii]
19. Wilcken NR, Prall OW, Musgrove EA, Sutherland RL (1997) Inducible overexpression of cyclin D1 in breast cancer cells reverses the growth-inhibitory effects of antiestrogens. *Clin Cancer Res* 3 (6):849-854
20. Stendahl M, Kronblad A, Ryden L, Emdin S, Bengtsson NO, Landberg G. Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 2004;90(10):1942-1948. doi:10.1038/sj.bjc.6601831. 6601831 [pii]
21. Hui R, Finney GL, Carroll JS, Lee CS, Musgrove EA, Sutherland RL. Constitutive overexpression of cyclin D1 but not cyclin E confers acute resistance to antiestrogens in T-47D breast cancer cells. *Cancer Res* 2002;62(23):6916-6923
22. Petrakova K, Nenutil R, Grell P, Fabian P, Zichova I, Svoboda M, et al. Factors predicting failure of adjuvant hormonotherapy of breast carcinoma. A study in tamoxifen treated patients. *Klin Onkol* 2008;21 (5):303-308
23. Muss HB, Bunn JY, Crocker A, Plaut K, Koh J, Heintz N, et al. Cyclin D-1, interleukin-6, HER-2/neu, transforming growth factor receptor-II and prediction of relapse in women with early stage, hormone receptor-positive breast cancer treated with tamoxifen. *Breast J* 2007;13 (4):337-345. doi:TBJ440 [pii] 10.1111/j.1524-4741.2007.00440.x
24. Ahnstrom M, Nordenskjold B, Rutqvist LE, Skoog L, Stal O. Role of cyclin D1 in ErbB2-positive breast cancer and tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 2005;91 (2):145-151. doi:10.1007/s10549-004-6457-4
25. Han S, Park K, Bae BN, Kim KH, Kim HJ, Kim YD, et al. Cyclin D1 expression and patient outcome after tamoxifen therapy in estrogen receptor positive metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 2003;10 (1):141-144
26. Linke SP, Bremer TM, Herold CD, Sauter G, Diamond C. A multimarker model to predict outcome in tamoxifen-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2006;12 (4):1175-1183. doi:12/4/1175 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-05-1562
27. Gillett C, Smith P, Gregory W, Richards M, Millis R, Peters G, et al. Cyclin D1 and

- prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 1996;69 (2):92-99. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960422)69:2<92::AID-IJC4>3.0.CO;2-Q [pii] 10.1002/(SICI)1097-0215(19960422)69:2<92::AID-IJC4>3.0.CO;2-Q
28. Cuny M, Kramar A, Courjal F, Johannsdottir V, Iacopetta B, Fontaine H, et al. Relating genotype and phenotype in breast cancer: an analysis of the prognostic significance of amplification at eight different genes or loci and of p53 mutations. *Cancer Res* 2000;60 (4):1077-1083
  29. Naidu R, Wahab NA, Yadav MM, Kutty MK. Expression and amplification of cyclin D1 in primary breast carcinomas: relationship with histopathological types and clinicopathological parameters. *Oncol Rep* 2002;9 (2):409-416
  30. Seshadri R, Lee CS, Hui R, McCaul K, Horsfall DJ, Sutherland RL. Cyclin D1 amplification is not associated with reduced overall survival in primary breast cancer but may predict early relapse in patients with features of good prognosis. *Clin Cancer Res* 1996;2 (7):1177-1184
  31. Personeni N, Fieuws S, Piessevaux H, De Hertogh G, De Schutter J, Biesmans B, et al. Clinical usefulness of EGFR gene copy number as a predictive marker in colorectal cancer patients treated with cetuximab: a fluorescent in situ hybridization study. *Clin Cancer Res* 2008;14 (18):5869-5876. doi:14/18/5869 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-08-0449
  32. Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, et al. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet* 2007;39 (5):655-660. doi:ng2006 [pii] 10.1038/ng2006
  33. Zaharieva BM, Simon R, Diener PA, Ackermann D, Maurer R, Alund G, et al. High-throughput tissue microarray analysis of 11q13 gene amplification (CCND1, FGF3, FGF4, EMS1) in urinary bladder cancer. *J Pathol* 2003;201 (4):603-608. doi:10.1002/path.1481
  34. Jensen LB, Bartlett JM, Witton CJ, Kirkegaard T, Brown S, Muller S, et al. Frequent amplifications and deletions of G1/S-phase transition genes, CCND1 and MYC in early breast cancers: a potential role in G1/S escape. *Cancer Biomark* 2009;5 (1):41-49. doi:0678377181784353 [pii] 10.3233/CBM-2009-0570
  35. Champeme MH, Bieche I, Hacene K, Lidereau R. Int-2/FGF3 amplification is a better independent predictor of relapse than c-myc and c-erbB-2/neu amplifications in primary human breast cancer. *Mod Pathol* 1994;7 (9):900-905
  36. Burkhardt L, Grob TJ, Hermann I, Burandt E, Choschzick M, Janicke F, et al. Gene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2010;9123 (3):757-765. doi:10.1007/s10549-009-0675-8
  37. Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93 (15):1141-1146
  38. Jimenez RE, Wallis T, Tabasczka P, Visscher DW. Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol* 2000;13 (1):37-45. doi:10.1038/modpathol.3880007
  39. Masood S, Bui MM. Assessment of Her-2/neu overexpression in primary breast cancers and their metastatic lesions: an immunohistochemical study. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30 (3):259-265
  40. Watson PH, Safneck JR, Le K, Dubik D, Shiu RP. Relationship of c-myc amplification

to progression of breast cancer from *in situ* to invasive tumor and lymph node metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1993;85 (11):902-907

41. Glockner S, Lehmann U, Wilke N, Kleeberger W, Langer F, Kreipe H. Amplification of growth regulatory genes in intraductal breast cancer is associated with higher nuclear grade but not with the progression to invasiveness. *Lab Invest* 2001;81 (4):565-571
42. Moelans CB, de Weger RA, Monsuur HN, Maes AH, van Diest PJ. Molecular differences between ductal carcinoma *in situ* and adjacent invasive breast carcinoma: a multiplex ligation-dependent probe amplification study. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2010;33 (3):165-173. doi:8525755767155N3R [pii] 10.3233/ACP-CLO-2010-0546
43. Glockner S, Buurman H, Kleeberger W, Lehmann U, Kreipe H. Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer. *Lab Invest* 2002;82 (10):1419-142
44. Simon R, Nocito A, Hubscher T, Bucher C, Torhorst J, Schraml P, et al. Patterns of her-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2001;93 (15):1141-1146
45. Minner S, Gartner M, Freudenthaler F, Bauer M, Kluth M, Salomon G, et al. Marked heterogeneity of ERG expression in large primary prostate cancers. *Modern Path* 2012; (1):106-116. doi:10.1038/modpathol.2012.130
46. Savic S, Tapia C, Grilli B, Rufle A, Bihl MP, de Vito Barascud A, et al. Comprehensive epidermal growth factor receptor gene analysis from cytological specimens of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer* 2008;98 (1):154-160. doi:6604142 [pii] 10.1038/sj.bjc.6604142
47. Tortola S, Steinert R, Hantschick M, Peinado MA, Gastinger I, Stosiek P, et al. Discordance between K-ras mutations in bone marrow micrometastases and the primary tumor in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19 (11):2837-2843
48. Daniele L, Cassoni P, Bacillo E, Cappia S, Righi L, Volante M, et al. Epidermal growth factor receptor gene in primary tumor and metastatic sites from non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2009;4 (6):684-688. doi:10.1097/JTO.0b013e3181a52359
49. Monaco SE, Nikiforova MN, Cieply K, Teot LA, Khalbuss WE, Dacic S. A comparison of EGFR and KRAS status in primary lung carcinoma and matched metastases. *Hum Pathol* 2010;41 (1):94-102. doi:S0046-8177(09)00241-X [pii] 10.1016/j.humpath.2009.06.019
50. Sauter G, Moch H, Moore D, Carroll P, Kerschmann R, Chew K, et al. Heterogeneity of erbB-2 gene amplification in bladder cancer. *Cancer Res* 1993;53 (10 Suppl):2199-2203
51. Marx AH, Burandt EC, Choschzick M, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, et al. Heterogenous high-level HER-2 amplification in a small subset of colorectal cancers. *Hum Pathol* 2010;41 (11):1577-1585. doi:S0046-8177(10)00138-3 [pii] 10.1016/j.humpath.2010.02.018
52. Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, et al. HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol* 2010;40 (6):769-777. doi:S0046-8177(08)00572-8 [pii] 10.1016/j.humpath.2008.11.014

## 2.7. Legends

Figure 1: Examples of FISH-analyses for the *CCND1* gene. A) HE staining, showing an invasive lobular breast carcinoma. B) Corresponding FISH analysis demonstrating *CCND1* amplification. There are cluster of red signals (up to 30 per blue stained nucleus) indicating the *CCND1* gene. The green signals (2 - 4 per nucleus) represent the centromeric region of chromosome 11. C) HE staining, showing an invasive ductal breast carcinoma. D) Corresponding FISH analysis without *CCND1* amplification. The tumor cells exhibit 2 - 3 red signals (*CCND1* gene) and 2 - 3 green signals (centromeric region of chromosome 11) per nucleus.

Figure 2: Heterogeneity of *CCND1* amplification. Comparison of a non-amplified and an amplified spot of the same tumor. A) HE staining, showing an invasive ductal breast carcinoma (there are only small but distinctive tumor cells). B) Corresponding FISH analysis without *CCND1* amplification. The tumor cells exhibit 1 - 3 red signals (*CCND1* gene) and 1 - 2 green signals (centromeric region of chromosome 11) per nucleus (stained in blue). C) HE staining, showing the same breast carcinoma, representing another tumor block. D) Corresponding FISH analysis demonstrating *CCND1* amplification. There are cluster of red signals (up to 15 per blue stained nucleus) indicating the *CCND1* gene. The green signals (1 - 3 per nucleus) represent the centromeric region of chromosome 11.

Figure 3: Box-plot of CCND1 copy numbers in 28 CCND1-amplified breast cancers. Boxes show the median and 25-75% quartiles, whiskers indicate the lowest and highest copy numbers. The horizontal line corresponds to the threshold of 10 CCND1 copies defining high-level amplification.

Figure 4: Concept of Heterogeneity-TMAs (H-TMA). Patient #1, an example for a case with 8 tumor containing paraffin blocks available. Patient #2, an example for a case with 4 tumor containing paraffin blocks available. In such a case, two cores each were taken per tumor block, with as much space between the two cores per block as possible.

Table 1: Association of CCND1 amplification with breast cancer phenotype, hormone receptor - estrogen receptor (ER), progesteron receptor (PR), and HER2 receptor status. The total number of amplified cases and the fraction (in brackets) are given. P-value refers to the chi<sup>2</sup>-test. BRE score = histological grade according to Bloom, Richardson and Ellis [Elston CW, Ellis IO (1991); Histopathology 19 (5):403-410].

Table 2: Illustration of the heterogeneity data. These are the six cases with a discordant amplification status. A large section validation revealed true heterogeneity of CCND1 amplification in the first 3 cases listed. In the last 3 cases discordant results were due to variable interpretation of borderline results. T1-T8 = the different TMA spots of one tumor. The first number represents the copy number of CCND1, the second of centromere 11 and the ratio is given in brackets.

## 2.8. Figures and Tables

Figure 1:

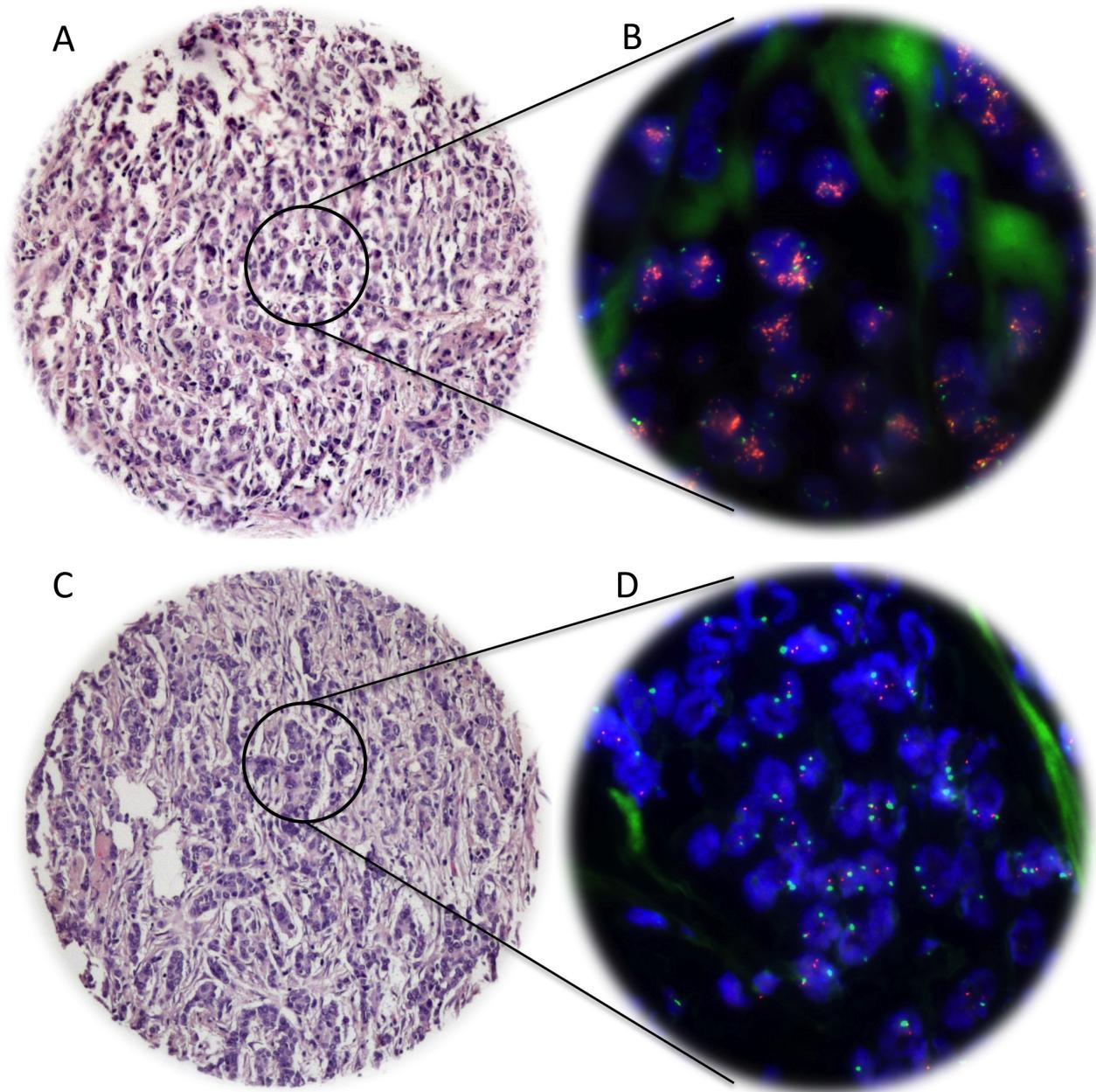


Figure 2:

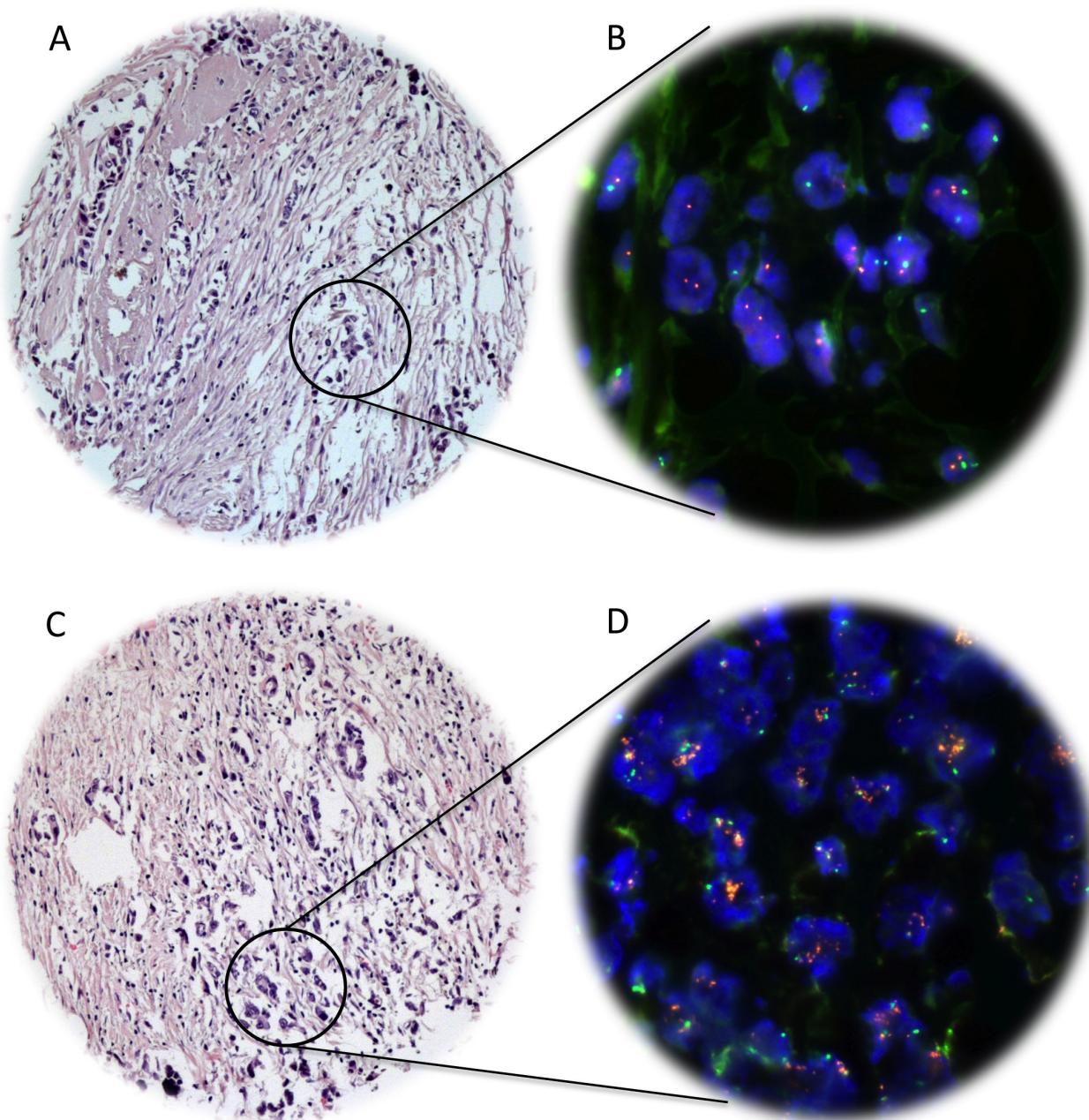


Figure 3:

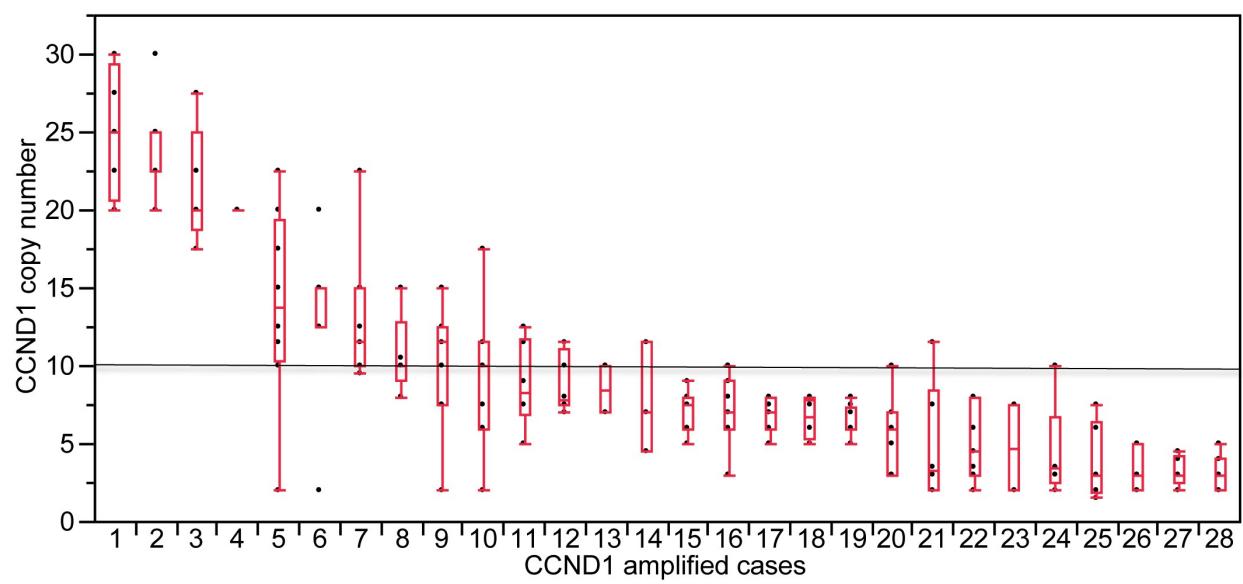


Figure 4

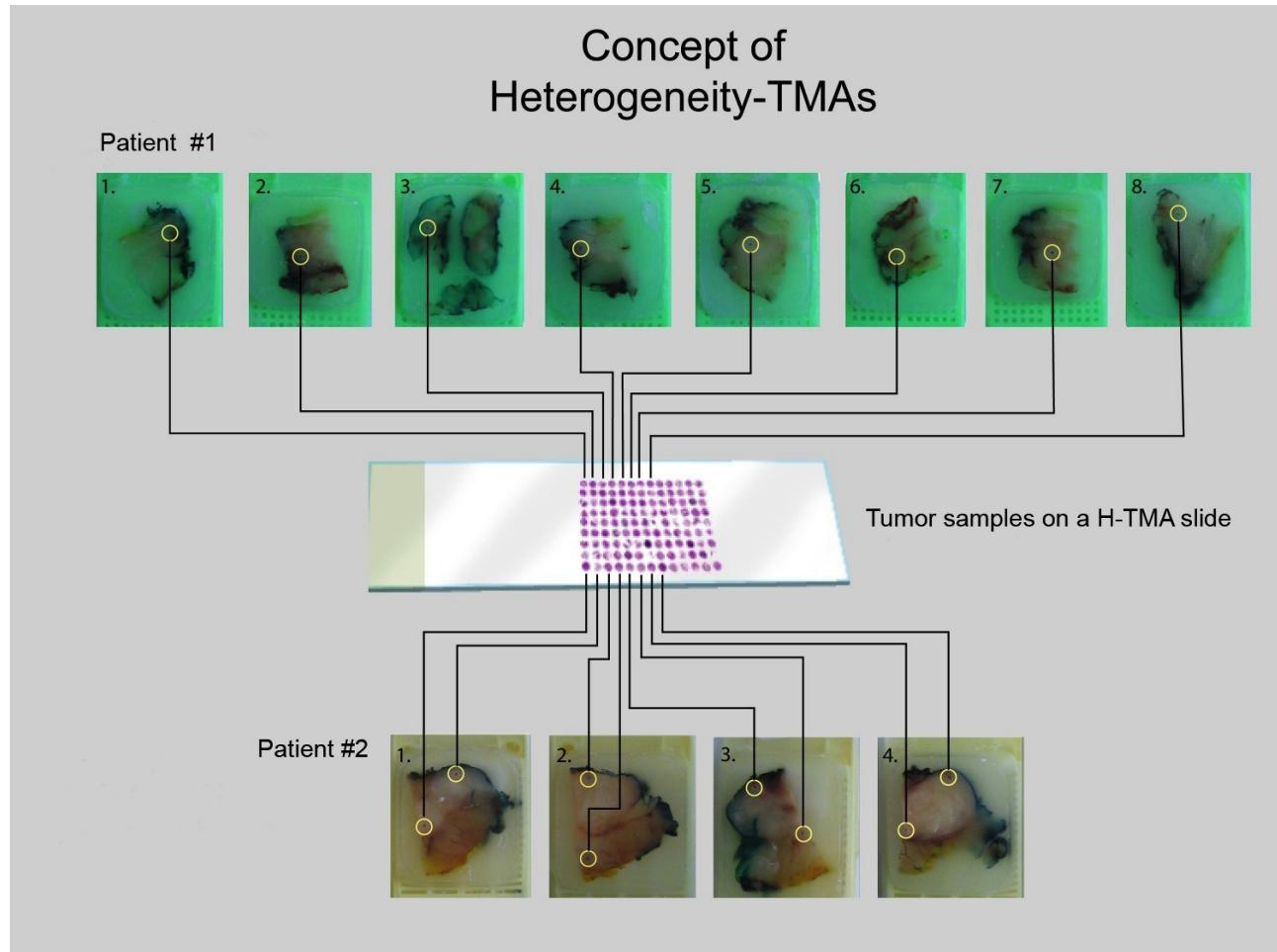


Table 1:

<b>CCND1 vs Phenotype</b>				
		<b>analyzable (n)</b>	<b>CCND1 amplification (%)</b>	<b>p-value</b>
	all cancers	133	28 (21.05)	
<b>Tumor type</b>	ductal	87	21 (24.14)	0.3065**
	lobular	32	5 (15.63)	
	other types	14	2 (14.29)	
<b>Tumor stage</b>	pT1	38	6 (15.79)	0.5395
	pT2	70	18 (25.71)	
	pT3	9	1 (11.11)	
	pT4	14	3 (21.43)	
<b>BRE grade</b>	G1	18	1 (5.56)	0.0417
	G2	72	14 (19.44)	
	G3	40	13 (32.50)	
<b>Nodal stage</b>	pN0	59	13 (22.03)	0.0565
	pN1	33	8 (24.24)	
	pN2	13	6 (46.15)	
	pN3	8	0 (0.00)	
<b>Receptor status</b>	ER+	110	26 (23.64)	0.0614
	ER-	17	1 (5.88)	
	PR+	83	18 (21.69)	0.8714
	PR-	44	9 (20.45)	
	HER2+	23	7 (30.43)	0.2877
	HER2-	105	21 (20.00)	

\*Numbers do not add up to total n, because of missing information

\*\*Ductal vs lobular

Table 2:

Illustration of the heterogeneity data								
	Analyzed TMA blocks							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Discordant cases for validation	No 1	2/2 (1)	**	7,5/2 (3,75)	11,5/2 (5,75)	2/2 (1)	3/3 (1)	**
	No 2	**	6/3 (2)	3/3 (1)	5/1,5 (3,33)	6/2 (3)	10/2 (5)	7/2 (3,5)
	No 3	3/2 (1,5)	2/2 (1)	1,5/1,5 (1)	**	**	7,5/2 (3,75)	3/3 (1)
	No 4	3,5/2 (1,75)	8/2 (4)	4,5/2,5 (1,8)	8/3 (2,67)	6/2 (3)	3,5/2 (1,75)	3/3 (1)
	No 5	**	2/2 (1)	**	4/3 (1,33)	3/3 (1)	3/3 (1)	**
	No 6	3/3 (1)	5/2 (2,5)	**	3/3 (1)	3/3 (1)	4/2,5 (1,6)	2/2 (1)

\*\* FISH not analyzable (no tissue or unsufficient hybridization)

### **3. Zusammenfassende Darstellung**

#### **3.1. Hintergrund der Arbeit**

Die Heterogenität von Tumoren stellt ein großes Problem der Krebstherapie dar. Sie begrenzt die Möglichkeiten der molekularen Diagnostik und gezielten Tumorbehandlung in hohem Maße, indem sie die diagnostische Aussagefähigkeit prädiktiver Biomarker erheblich einschränkt und oft ursächlich für den Misserfolg gezielter Therapien ist. So kann die Abwesenheit von medikamentösen Zielstrukturen in Teilen eines Karzinoms, das „positiv“ für eine spezifische Zielstruktur getestet wurde, zum Erscheinungsbild der Medikamentenresistenz führen, da die zielstruktturnegative Zellpopulation trotz Therapie an Größe zunehmen kann. Derzeitige molekulare Tumoruntersuchungen beim Mammakarzinom sind somit unvollkommen, da der molekulare Tumorbefund häufig nur anhand einer einzigen Gewebeprobe des Primärtumors ermittelt wird, die aus der ersten Tumoroperation stammt. Der molekulare Status der disseminierten Tumorzellen, welche im Körper verbleiben und ursächlich für die Entstehung von Tumormetastasen sind, der Zellen also, die das eigentliche Therapieziel darstellen sollten, bleibt dabei unbekannt. Auf diese Weise kann ein heterogener molekularer Primärtumorstatus, verbunden mit einem möglicherweise ebenfalls heterogenen Metastasenstatus, entweder ein Nichtansprechen der Therapie bewirken oder dazu führen, dass ein mögliches Therapieziel durch das derzeitige diagnostische Standardvorgehen nicht erkannt wird. Dieser Sachverhalt verlangt nach einem alternativen diagnostischen Vorgehen.

In dieser Arbeit soll ein neuartiges Untersuchungsverfahren für Tumorheterogenität am Beispiel der Heterogenitätsanalyse von Cyclin D1 vorgestellt werden.

#### **3.2. Die Rolle von CCND1 bei Brustkrebs**

Es wird angenommen, dass ungefähr 40% aller Brustkrebspatienten, die eine endokrine Therapie erhalten, resistent gegen die Behandlung sind [1]. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine veränderte Expression bestimmter, auf den Zellzyklus einwirkender Proteine die Vorhersage einer Tamoxifenresistenz zulässt [1-7]. In diesem Zusammenhang wird auch die Cyclin D1 (CCND1) Amplifikation von verschiedenen Studien als ein möglicher Mechanismus für die Entstehung einer Tamoxifenresistenz diskutiert [8-11]. Das CCND1 Gen liegt in ungefähr 10-20% der Brustkrebsfälle amplifiziert vor [12-14]. Sein Produkt, das Cyclin D1 Protein, spielt eine entscheidende regulierende Rolle im Zellzyklus, beim Übergang der G1 Phase in die S Phase. Es bindet an die zyklinabhängige Kinase 4

(CDK4) oder CDK6, um die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) und anderer Substrate voranzutreiben. Die Inhibition der Zellzyklusprogression durch unphosphoryliertes Rb ist dadurch aufgehoben, und die Zellen sind in der Lage, in die S Phase einzutreten [15].

Die Expression und Funktion des Cyclin D1 wird durch Östrogene mittels des Östrogenrezeptors reguliert und kann indirekt durch antiöstrogene Medikamente beeinflusst werden [16]. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass eine veränderte Expression von Cyclin D1 die transkriptionelle Aktivität des Östrogenrezeptors in Abwesenheit von Östradiol stimulieren kann [17]. Cyclin D1 scheint auch eine Rolle bei der steroidinduzierten Proliferation des Brustdrüseneipithels während der Schwangerschaft zu spielen [18].

Die CCND1 Amplifikation tritt bevorzugt in östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs auf [12, 14]. Acht verschiedene Studien lieferten Ergebnisse, die eine Verbindung zwischen CCND1 Amplifikation und schlechtem Ansprechen auf eine durchgeführte Tamoxifentherapie nahelegen [8-11, 19-22]. Jedoch konnten andere Autoren diese Ergebnisse nicht bestätigen. Mindestens sechs Studien fanden diese Verbindung nicht [15, 23-27]. Es gibt auch widersprüchliche Forschungsergebnisse bezüglich des prognostischen Wertes einer CCND1 Amplifikation und Cyclin D1 Überexpression. Einige Studien fanden eine solche Korrelation [28, 29], andere Studien konnten wiederum keine solche Verbindung nachweisen [13] oder fanden eine verbesserte Prognose für CCND1 positive Patienten [30].

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Forschungsergebnisse könnte der Heterogenitätsaspekt von CCND1 liefern. Dieser wurde bisher methodisch nur unzureichend analysiert, da bei früheren Studien zu wenige und zu nah beieinanderliegende Tumorbereiche für die Heterogenitätsbestimmung miteinander verglichen wurden.

### **3.3. Eigene Untersuchung**

Um das Maß der Heterogenität der CCND1 Amplifikation in Brustkrebs zu quantifizieren, wurde in dieser Studie Brustkrebsgewebe von 147 Patienten in einen neu entwickelten „heterogenitäts tissue microarray (TMA)“ eingebracht und untersucht. Dabei wurden 8 unterschiedliche Gewebszylinder von 4 bis 8 tumorhaltigen Gewebeblöcken pro Fall für die Herstellung verwendet. Zusätzlich wurden Lymphknotenmetastasen von 35 dieser Patienten in diesem TMA untersucht. Eine Amplifikation des CCND1 Gens wurde mit Hilfe

einer dual labeling Fluoreszenz in Situ Hybridisierung (FISH) festgestellt. Abschließend wurden die gewonnenen Daten statistisch ausgewertet, um Zusammenhänge zwischen den FISH Ergebnissen und den vorgegebenen Parametern zu untersuchen.

Die Untersuchung ergab eine Amplifikation des Gens in 28 von 133 (21.05%) der mittels FISH auswertbaren Fälle. Diese Häufigkeit ist vereinbar mit der anderer Studien, welche, wie schon eingangs erwähnt, CCND1 Amplifikationsraten von 10-20% beobachteten [12-14]. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CCND1 Genamplifikation und dem Differenzierungsgrad des Tumors (BRE-Grad) ( $p=0.042$ ). Es konnte keine Verbindung zwischen der CCND1 Amplifikation und einem bestimmten Tumortyp ( $p=0.307$ ), Tumorstadium ( $p=0.540$ ) und PR Expression ( $p=0.871$ ) gefunden werden.

Eine inhomogene Cyclin D1 Amplifikation konnte zunächst in 6 der 28 (21.43%) amplifizierten Tumore durch TMA Analyse gefunden werden. Die nachträglich durchgeführte Überprüfung der Großflächenschnitte bestätigte die CCND1 Heterogenität in nur 3 dieser Fälle. Die initiale Inhomogenität der restlichen Fälle wurde durch die unterschiedliche Kategorisierung der Gewebeproben im Amplifikationsgrenzbereich verursacht (CCND1/Zentromer 11 Ratios zwischen 1.7 und 2.3). Eine eindeutige Heterogenität der CCND1 Amplifikation wurde damit in 3 von 133 auswertbaren Karzinomen festgestellt (2.3%). Es wurden keine Amplifikationsunterschiede zwischen den 22 Primärtumoren und ihren zugehörigen Lymphknotenmetastasen festgestellt.

### **3.4. Bedeutung der eigenen Befunde**

Bedenkt man die große therapeutische Bedeutung des Heterogenitätsaspektes, so ist die Anzahl der Studien, die sich mit der Heterogenität der medikamentösen Zielstrukturen befassen, verhältnismäßig klein. Wird Tumorheterogenität analysiert und quantifiziert, so wird dies gewöhnlich nur auf Grundlage der Untersuchung eines Tumorschnittes pro Patient gemacht. Jedoch kann ein Gewebeschnitt nicht die Biologie eines ausgedehnten Karzinoms *in toto* widerspiegeln. So repräsentiert ein Gewebeschnitt mit einer angeschnittenen Tumorfläche von  $2 \times 1 \text{ cm}$  nur  $1/88$  eines  $0.07 \text{ cm}^3$  messenden Karzinoms (entsprechend dem in der Studie verwendeten kleinsten Karzinomsvolumen) oder nur  $1/275000$  eines Karzinoms, das  $220 \text{ cm}^3$  misst (größtes analysiertes Karzinom). Der eigens für dieses Projekt entwickelte Untersuchungsaufbau hilft dabei, die molekulare Heterogenität des Brustkrebses besser verstehen und quantifizieren zu können. Der angefertigte TMA enthält Gewebsstanzen, deren Durchmesser  $0.6 \text{ mm}$  betragen und von

4-8 verschiedenen Tumorblöcken, sowie von 1-4 verschiedenen Lymphknotenmetastasenblöcken pro Patient stammen. Basierend auf der Annahme, dass molekularbiologisch ähnliche Tumoranteile zusammenhängend an einer Stelle des Tumors vorliegen, stellt unsere Herangehensweise höchstwahrscheinlich eine Möglichkeit dar, ein in seiner molekularen Vielfalt noch nie dagewesenes Bild des Brustkrebses zu ermitteln. Bei jedem untersuchten Tumor wurden große Anstrengungen darauf verwendet, maximal mögliche Abstände zwischen einzelnen Gewebsstanzanzen sicherzustellen. Die durchschnittliche Anzahl der verwendeten Tumorblöcke pro Brustkrebsfall betrug in dieser Studie 6 (Angabe ohne Metastasenblöcke). Das Konzept des Heterogenitäts-TMAs, das durch diese Arbeit eingeführt werden soll, unterscheidet sich deutlich von den bisherigen Versuchen, die Repräsentativität von TMAs zu verbessern. Frühere Studien versuchten durch Entnahme mehrerer Gewebsstanzanzen aus nur einem einzigen Tumorblock die Probenrepräsentativität hinsichtlich des Gesamttumors zu erhöhen. Diese wird jedoch nicht heraufgesetzt, es wird lediglich eine Verbesserung der Übereinstimmung des TMA Ergebnisses mit der Einzelschnittuntersuchung erreicht, nicht jedoch mit der Gesamttumormasse [35].

Der geringe Anteil (2.26%) der heterogen amplifizierten CCND1 Tumoren in dieser Studie spricht für ein frühes Auftreten der CCND1 Amplifikation in der Brustkrebsentwicklung. Diese Vorstellung deckt sich auch mit den Ergebnissen einer anderen Studie, bei der eine hohe Übereinstimmung der CCND1 Amplifikation zwischen DCIS (duktales carcinoma in situ) und angrenzenden invasiven duktalen Karzinomen beobachtet werden konnte. In den 73 untersuchten Fällen konnte eine Übereinstimmungsrate von 97.3% zwischen invasivem Karzinom und DCIS gefunden werden [36]. Die 100%ige Übereinstimmungsrate zwischen den Ergebnissen in den 22 invasiven Karzinomen und deren Lymphknotenmetastasen bezüglich des CCND1 Amplifikationsstatus' gibt einen weiteren Anhalt dafür, dass die Annahme des frühen Auftretens der CCND1 Amplifikation in einem Teil des Brustkrebses richtig ist.

Ausgehend von diesen und anderen Forschungsergebnissen scheint das Mammakarzinom, vom Level der Genamplifikationen aus betrachtet, eine ungewöhnlich homogene Tumorentität darzustellen. So zeigten mehrere Studien ein hohes Maß an Homogenität hinsichtlich der HER2 Amplifikation [36-39]. Auch konnten keine massiven Unterschiede der Amplifikationshäufigkeiten von MYC und ESR1 zwischen DCIS und den zugehörigen invasiven Karzinomen festgestellt werden [36, 40-42]. Diese Beobachtung ist ein weiteres Argument für das eher frühzeitige Entstehen der Hauptgenamplifikationen bei

Brustkrebs. Die in einer früheren Brustkrebsstudie beschriebene Tumorheterogenität von MYC- und Cyclin D1-Amplifikationen, kann durch das Risiko der variablen Beimischung von Nicht-Tumorgewebs-Zellen, das dem Verfahren der PCR basierten DNA Quantifizierung innewohnt, erklärt werden [43].

Bemerkenswerterweise besitzen andere Karzinomentitäten viel höhere Anteile an genomicscher Heterogenität. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die durch die TMPRSS2-ERG Mutation verursachte ERG Überexpression beim Prostatakarzinom in etwa 2/3 der ERG-positiven Fälle heterogen vorkommt. Für die Untersuchung wurde ein ähnliches Heterogenitäts-TMA Verfahren wie in dieser Studie verwendet (S. Minner, persönliche Mitteilung). Auch Lungenkrebs und kolorektale Karzinome zeigen intratumorale Heterogenität bezüglich ihres EGFR Status' [31, 46]. Des Weiteren gibt es viele Studien, die EGFR-Amplifikationsunterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen bei den beiden zuletzt genannten Tumorentitäten gefunden haben [47-49]. Auch konnte eine beachtliche Heterogenität des wichtigen therapeutischen Ziels HER2 in Studien zur Harnblase [50] und zum Kolonkarzinom [51] festgestellt werden, während dieses Therapieziel anscheinend homogen amplifiziert in Brust- [36-39] und Magenkrebs [52] vorliegt. Die signifikante Homogenität von HER2 bei Brustkrebs stellt ein optimales therapeutisches Ziel dar, welches schon jetzt klinische Anwendung findet. In dieser Studie wurde festgestellt, dass die CCND1 Genamplifikation bei Brustkrebs typischerweise homogen vorliegt. Sollten weitere Studien die Vermutung bestätigen, dass die Amplifikation des CCND1-Gens eine Tamoxifenresistenz induziert, könnte in Zukunft das Resistenzverhalten des Gesamttumors lediglich anhand der Analyse des CCND1 Status' einer kleinen Biopsie verlässlich bestimmt werden.

Ein signifikantes Problem bei Heterogenitätsstudien stellen technische Schwierigkeiten dar, da jeder falsch positive oder falsch negative Befund zu einem falsch heterogenen Ergebnis führt. In dieser Studie wurde daher große Anstrengung darauf verwendet, eine solche falsche Interpretation zu vermeiden. Dies geschah durch lichtmikroskopische Nachkontrolle der Karzinomprässens bei jeder gestanzten Gewebeprobe und eine Großflächenkontrolluntersuchung bei jedem heterogenen Fall. Daher ist davon auszugehen, dass die aufgezeigten Forschungsergebnisse nicht von technischen Mängeln beeinflusst wurden. Dennoch kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass sehr kleine Gebiete mit CCND1 Amplifikation (oder fehlender Amplifikation) auch durch unser Untersuchungsverfahren übersehen wurden.

**Zusammenfassend zeigt diese Studie, dass die CCND1 Amplifikation typischerweise homogen bei Brustkrebs vorkommt. Die Ergebnisse lassen ein frühes Auftreten der CCND1 Amplifikation in der Brustkrebsentwicklung vermuten. Daher ist der bei einer Probebiopsie ermittelte CCND1 Status hoch repräsentativ für die restliche Gesamttumormasse und kann dazu herangezogen werden einen Therapieerfolg vorherzusagen, sofern eine Therapiemöglichkeit zur Verfügung steht. Durch den beschriebenen neuartigen Versuchsaufbau des Heterogenitäts-TMAs kann in Zukunft die Heterogenität molekularer Marker genauer verstanden und quantifiziert werden.**

Hinweis: Die angegebenen Zitathinweise beziehen sich auf die Quellen der Originalarbeit

## **4. Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Guido S a u t e r, danke ich für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, seine wegweisende Hilfe und Beratung bei der experimentellen Aufgabenlösung an dem von ihm geleiteten Institut für Pathologie.

Ich danke meinem wissenschaftlichen Betreuer, Herrn Dr. med. Eike B u r a n d t, für die fachlich kompetente Begleitung meiner Arbeit. Er war mir stets ein geduldiger und hilfreicher Ansprechpartner.

In wissenschaftlich-technischen Angelegenheiten konnte ich auf die wertvolle Hilfe und Erfahrung der Leiterin des TMA-Labors Frau Christina Koop bauen. Ihr, sowie Frau Sylvia Schnöger und Herrn Sascha Eghtessadi sei an dieser Stelle gedankt.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden, meinen Eltern und meinem Bruder, die mich bei meiner Arbeit kritisch begleitet und liebevoll unterstützt haben.

Berlin, Juni 2014

## **5. Lebenslauf**

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## **6. Eidesstattliche Erklärung**

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 oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....  
Unterschrift