

Aus dem Institut für Pathologie
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

Prävalenz und klinische Relevanz der Östrogen Rezeptor Amplifikation beim Mammakarzinom

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg vorgelegt von

Phillip Rolf Stahl

aus Buffalo, USA

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 03.11.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Herr Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Herr PD Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. F. Jänicke

Inhalt

Inhalt.....	2
Verwendete Abkürzungen	3
Arbeitshypothese und Fragestellung.....	4
1. Einleitung.....	5
1.1 Vorarbeiten.....	13
2. Material und Methoden	15
2.1 Gewebekollektiv	15
2.2 Immunhistochemie	17
2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	18
2.3.1 pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung.....	19
2.3.2 DNA-Extraktion	20
2.3.3 DNA-Markierung mittels Nick-Translation.....	21
2.3.4 Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung	23
2.3.5 Hybridisierung.....	24
2.3.6 Waschen.....	26
2.3.7 Detektion	27
2.4 Statistik	28
3. Resultate	29
3.1 ESR1 Amplifikation.....	29
3.2 Östrogen Rezeptor Expression.....	32
3.3 Prognostische Relevanz der ESR1-Genkopiezahlvermehrungen	34
4. Diskussion	38
5. Zusammenfassung	42
6. Literatur	43
7. Danksagung.....	47
9. Eidesstattliche Versicherung.....	48

Verwendete Abkürzungen

AIB	Amplified in breast cancer-1
APC	Adenomatosis Polyposis Coli
BCL2	B-cell leukemia/lymphoma 2
BRE	Bloom-Richard-Elston
CCND1	Cyclin D1
CGH	Comparative genomic hybridization (Komparative Genomische Hybridisierung)
CMYC/MYC	Myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCC	Deleted in colon cancer (Deletiert beim Kolonkarzinom)
DCIS	Ductal Carcinoma in situ (Duktales Carcinoma in situ)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Estrogen Receptor (Östrogenrezeptor)
ERBB2	Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ESR1	Estrogen Receptor 1/alpha
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IHC	Immunhistochemie
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LCIS	Lobular Carcinoma in situ (Lobuläres Carcinoma in situ)
MDM2	Transformed 3T3 cell double minute 2
P53	Protein 53 / Tumorprotein 53
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RB1	Retinoblastoma gene (Retinoblastom-Gen)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SERM	Selective estrogen receptor modulator
SERD	Selective estrogen receptor downregulator
TMA	Tissue Microarray
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

Arbeitshypothese und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es nach noch nicht entdeckten, klinisch relevanten Genamplifikationen beim Mammakarzinom zu suchen. Diese sollten an einem großen Gewebekollektiv von über 2000 Mammakarzinomen mit dazugehörigen Follow-up Daten der Patientinnen validiert werden.

Hierzu sollten die Daten einer vorausgegangenen Array-CGH-Studie (Affymetrix 10K SNP Array) nach kleinen Amplicons von potentiell relevanten Gengruppen durchsucht werden. Um identifizierte Amplifikationen zu validieren und deren mögliche klinische Bedeutung erkennen zu können, sollte in einem zweiten Schritt eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung an Tissue Microarrays durchgeführt werden.

1. Einleitung

Brustkrebs stellt mit mehr als 350.000 Todesfällen pro Jahr weltweit nach wie vor die bei Frauen am häufigsten zum Tode führende maligne Erkrankung dar (Ferlay et al. 2000). Durchschnittlich erkrankt in Deutschland etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens. Insbesondere in den industrialisierten Ländern zeigt sich eine weiterhin steigende Inzidenz des Mammakarzinoms (Taylor et al. 2001).

Wie bei den meisten malignen Tumoren stellt die chirurgische Tumorentfernung auch beim Brustkrebs die wichtigste Behandlungsmethode dar. Das Mammakarzinom zählt darüber hinaus zu denjenigen Tumoren, deren Prognose sich durch eine (neo-)adjuvante Therapie verbessern lässt. Man nimmt an, dass die derzeit etablierten zytostatischen bzw. hormonellen (neo-)adjuvanten Therapiemöglichkeiten eine 20-30%ige Verminderung der Mortalität bewirken können (Allred und Swanson 2000; Allred et al. 2001). Tatsächlich ist die Reduktion der Sterblichkeit, bedingt durch das oft höhere Alter der betroffenen Patientinnen, nicht ganz so groß, da es nicht selten auch zum Versterben aufgrund anderer Erkrankungen kommt, bevor die Tumorerkrankung in ihre Endphase tritt. Auch wenn der Effekt der (neo-)adjuvanten zytostatischen und hormonellen Behandlung sich bewiesenermaßen günstig auf den Krankheitsverlauf beim Mammakarzinom auswirkt, ist zu berücksichtigen, dass diese Therapien auch eine signifikante Toxizität aufweisen, so dass im Idealfall nur die Patienten therapiert werden sollten, die auch tatsächlich von einer solchen Behandlung profitieren. Trotz der Fortschritte in der Hormon- und Chemotherapie ist die Mortalität beim Mammakarzinom weiterhin hoch. Diese ist auch durch die Variabilität seines Verhaltens bedingt, welche ein bisher ungelöstes und wenig verstandenes Problem darstellt.

Tumorerkrankungen entstehen generell als Folge von genetischen Veränderungen (Mutationen) in einzelnen Zellen. Verschiedene Mutationsformen sind bekannt. Man unterscheidet auf DNA-Ebene Punktmutationen (Austausch einer Base gegen eine andere), Deletionen (Verlust einer oder mehrerer Basen), Insertionen (Einbau einer oder mehrerer Basen), Duplikationen (Verdopplung eines Gens oder Sequenzen eines Gens) und Amplifikationen (Vermehrung eines Gens oder eines ganzen Genomabschnitts). Sind ganze Chromosomen oder Abschnitte von Chromosomen betroffen, so spricht man von Chromosomenmutationen.

Die Ursachen von Genmutationen sind vielseitig. Sie können spontan entstehen. Die Mechanismen ihrer Entstehung gehen dann meist auf zelluläre Ereignisse oder Stoffwechselprozesse zurück (z.B. Fehler der DNA-Polymerase bei der DNA-

Replikation, zufällige spontane Änderungen in den Basen der DNA, die auf deren Instabilität beruhen oder Fehler beim „crossing-over“ während der meiotischen Rekombination). Mutationen können allerdings auch durch Strahlung (ionisierende Strahlung oder UV-Strahlung) oder chemische Mutagene (z.B. Tabak, Ruß, Anilinfarben) induziert werden.

Mutationen können zur Tumorentstehung beitragen, tun dies aber nicht zwingend. Ihre Kanzerogenität hängt vor allem davon ab, wo sie auf DNA-Ebene stattfinden. So ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine Mutation phänotypisch auswirkt höher, wenn sie den kodierenden Bereich eines Gens (Exon) betrifft, als wenn sie innerhalb eines nicht-kodierenden Genabschnitts (Intron) liegt. Entscheidend ist auch, in welche Prozesse (z.B. Zellproliferation) das Genprodukt, für welches das mutierte Gen kodiert, involviert ist. Inzwischen ist eine Vielzahl von Genen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, bekannt. Hierbei lassen sich Gene, die durch eine übermäßige Aktivierung aufgrund einer Mutation oder Fehlregulierung direkt an der malignen Transformation einer Zelle beteiligt sind (Onkogene) unterscheiden von Genen, die durch den Verlust ihrer Funktion zur malignen Entartung beitragen (Tumorsuppressorgene). Onkogene sind beispielsweise das BCL2-Gen bei Lymphomen, das MYC-Gen beim Burkitt-Lymphom (Butturini und Gale 1990; Kramer et al. 1998), das ERBB2-Gen beim Mammakarzinom (Slamon et al. 1987) oder das EGFR-Gen beim Glioblastom (Mischel et al. 2003; Shinojima et al. 2003). Bekannte Tumorsuppressorgene sind z.B. p53 bei kolorektalen und anderen Karzinomen (Hollstein et al. 1991) und das RB1-Gen beim Retinoblastom (Giordano und Kaiser 1996; Knudsen und Knudsen 2006). Dennoch reicht eine einzige Mutation eines Gens meist nicht aus, um eine Zelle maligne entarten zu lassen. Da neoplastische Zellen mehrere Eigenschaften (z.B. unkontrolliertes Wachstum, Loslösung aus dem Zellverband, Migrationsfähigkeit, Überleben in fremden Gewebetypen, fehlende Alterung der Zellen) besitzen müssen, um erfolgreich expandieren und schließlich metastasieren zu können, müssen normalerweise mehrere Mutationen innerhalb eines Zellklons stattfinden. Dafür spricht auch, dass die Häufigkeitsgipfel vieler Tumoren im fortgeschrittenen Alter liegen. So werden Mutationen, die für die maligne Entartung eines Zellklons nötig sind, nach und nach über einen langen Zeitraum erworben. Ein Beispiel hierfür ist die Adenom-Karzinom-Sequenz bei kolorektalen Karzinomen. Man geht davon aus, dass sich über 80% der kolorektalen Karzinome auf dem Boden vorbestehender Adenome entwickeln. Diese stellen also präkanzeröse Läsionen der Dickdarmschleimhaut dar, deren Entartungsrisiko von verschiedenen Faktoren abhängt (z.B. Größe, Wuchsform, histologische Differenzierung, Grad und Ausmaß der Dysplasie). Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung vom

Adenom zum Karzinom sequentiell mit verschiedenen genetischen Veränderungen einhergeht (Cho und Vogelstein 1992). Dabei dürfte weniger eine bestimmte Reihenfolge in der Ausbildung genetischer Alterationen eine Rolle spielen, als vielmehr deren kritische Kumulation. An der Entwicklung von der gesunden Dickdarmschleimhaut zum Adenom und dann schließlich weiter zum Karzinom sind auf genetischer Ebene beispielsweise das APC-Gen, p53, KRAS und DCC beteiligt (Goyette et al. 1992).

Auf molekulargenetischer Ebene sind mehrere Mechanismen bekannt, die eine Rolle bei der Progression von Brustkrebs spielen. In den möglicherweise wichtigsten Mechanismus sind Östrogene involviert.

Auf molekularer Ebene bindet Östrogen an spezielle Rezeptoren (Östrogenrezeptoren), die im Zellkern lokalisiert sind, durch diese Bindung phosphoryliert und somit aktiviert werden. Aktivierte Rezeptormoleküle bilden Dimere, die als Transkriptionsfaktoren wirken, d.h. sie binden an die DNA und initiieren die Expression bestimmter Gene, deren Proteinprodukte letztlich das Wachstum der Brustdrüsenzellen verursachen (Parker et al. 1993). In menschlichen Zellen existieren zwei unterschiedliche Östrogenrezeptoren (ER), die als ER-alpha und ER-beta bezeichnet werden. Sie werden von unterschiedlichen Genen kodiert und zeigen teilweise voneinander verschiedene Expressionsmuster in Zellen und Geweben. ER-alpha und ER-beta zeigen einen hohen Grad an Homologität in der ligandenbindenden (AF-2) und der DNA-bindenden Domäne, aber unterscheiden sich in der „activation function“ (AF-1)-Domäne. Vergleicht man die AF-1-Domänen beider Rezeptoren, lässt sich vermuten, dass die Aktivität von „estrogen response elements“ bei ER-alpha viel größer ist, als bei ER-beta (Cowley und Parker 1999). Obwohl vergleichsweise wenig über die Funktion und klinische Relevanz von ER-beta bekannt ist, wird angenommen, dass ER-beta in seiner Funktion der von ER-alpha entgegenwirkt und zu einer Reduktion der durch Östrogene stimulierten Proliferation führt (Omoto et al. 2003).

Mehr als zwei Drittel aller Mammakarzinome zeigen zum Zeitpunkt ihrer Diagnosestellung eine Expression von ER-alpha (Stierer et al. 1993). Dies macht den ER zu einem der wichtigsten therapeutischen Ziele beim Mammakarzinom (Sunderland und Osborne 1991). Mammakarzinome werden daher routinemäßig immunhistochemisch auf ihre ER-Positivität untersucht, damit eine Entscheidung für oder gegen eine anti-ER-Therapie getroffen werden kann (Andersen und Poulsen 1989).

Seit über 30 Jahren wird Tamoxifen zur anti-ER-Therapie eingesetzt. Tamoxifen gehört zur Gruppe der den Östrogenrezeptor blockierenden selektiven Modulatoren (sog. SERMs). Aufgrund der partiellen Östrogen-agonistischen Wirkung von Tamoxifen und

der damit verbundenen Nebenwirkungen (z.B. erhöhtes Risiko für das Auftreten von Endometriumkarzinomen) und der teils schon gegebenen, teils erworbenen Tamoxifen-Resistenz vieler Mammakarzinome, sind inzwischen viele neue Medikamente zur anti-ER-Therapie entwickelt worden. Hierzu gehören andere SERMs, die eine dem Tamoxifen ähnliche Struktur aufweisen (z.B. Toremifen, Droloxifen) und SERMs, die sich in ihrer Struktur von Tamoxifen unterscheiden (z.B. Raloxifen). Zu einer anderen Substanzgruppe, den sogenannten ER-destabilisierenden „selective downregulators“ (SERDs) gehört Fulvestrant. Dieses Medikament zeigt eine reine Östrogen-antagonistische Wirkung und zeigt auch nicht die für viele SERMs bekannte Kreuzresistenz mit Tamoxifen.

Eine neuere Substanzgruppe bilden die Aromatase-Inhibitoren, die nicht den ER-Rezeptor direkt blockieren, sondern die Produktion von Östrogenen hemmen. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Anastrozole und Exemestan.

Die anti-ER-Therapie führt bei 30-50% aller Patienten zu einer signifikanten Abnahme des Tumorwachstums (Wolmark und Dunn 2001).

Ein weiteres wichtiges Zielgen für die Therapie des Mammakarzinoms ist der HER2-Rezeptor. HER2 (Human epidermal growth factor receptor-2) gehört zu einer Familie von vier Transmembranrezeptoren (HER1-HER4), die in Signaltransduktionskaskaden involviert sind, welche das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren. HER2 wird im gesunden Gewebe praktisch nicht exprimiert, wobei jedoch der Herzmuskel eine (klinisch äußerst relevante) Ausnahme darstellt (Crone et al. 2002; Garratt et al. 2003). Der Rezeptor besteht aus einer Cystein-reichen extrazellulären ligandenbindenden Domäne, einem lipophilen transmembranen Segment und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne. Die Rezeptoren der HER-Familie bilden Heterodimere (oder seltener Homodimere) und können dann einen Liganden binden. Diese Bindung führt zu einer Aktivierung der intrazellulären Tyrosin-Kinase, die den Ausgangspunkt für die Transduktion eines Wachstumssignals zum Zellkern darstellt (Yarden 2001).

In verschiedenen Tumoren des Menschen sind Amplifikationen/Überexpressionen von HER2 gefunden worden. Hierzu gehören außer dem Mammakarzinom auch Tumoren der Lunge (Pellegrini et al. 2003), des Magens (Risio et al. 2003), des Ovars (Mayr et al. 2006) und orale Tumoren (Cornolti et al. 2007). Beim Mammakarzinom führt eine HER2-Genamplifikation zu einer erhöhten HER2-Expression (Überexpression). Als Amplifikation bezeichnet man die Vermehrung der Kopiezahl einzelner Gene oder ganzer Genomabschnitte. Durch Amplifikationen können Tumorzellen gezielt solche

Genprodukte stark überexprimieren, die ihnen einen Wachstums- oder Überlebensvorteil verleihen (Rubin und Yarden 2001).

Durch die HER2-Amplifikation werden die normalen Kontrollmechanismen der Zelle unterbrochen und die Entstehung maligner Tumorzellen begünstigt. Die HER2-Amplifikation findet sich in 20-30% aller Mammakarzinome (Pauletti et al. 1996) und ist mit einem aggressiven Tumorverhalten assoziiert. Die HER2-Amplifikation/Überexpression ist weiterhin mit einer schlechten Prognose und einer signifikant kürzeren Überlebenszeit assoziiert (Slamon et al. 1987; Pegram und Slamon 2000).

Am Beispiel von HER2 lässt sich sehr gut zeigen, welche Rolle amplifizierte Gene als therapeutisches Ziel spielen können. Die Behandlung mit Trastuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen den HER2-Rezeptor, zeigt sich als sehr effektiv in der Behandlung von HER2-amplifizierten Mammakarzinomen (Pegram et al. 1998; Albanell und Baselga 1999).

Amplifikationen sind beim Mammakarzinom auch für andere Gene beschrieben worden. Beispiele hierfür sind CMYC auf 8q24 (Visscher et al. 1997), EGFR auf 7p12 (Al-Kuraya et al. 2004), AIB auf 20q13 (Anzick et al. 1997) oder CCND1 auf 11q13 (Simpson et al. 1997). Vieles spricht dafür, dass eine große Zahl von Genen, die durch Amplifikationen Mamma-Epithelzellen einen Wachstumsvorteil verleihen können, noch gar nicht entdeckt wurde. Dies liegt zum einen sicherlich daran, dass amplifizierte Chromosomenabschnitte (Amplicons) für gewöhnlich mehrere Megabasen groß sind und damit auch sehr viele Gene umfassen können. Das macht es schwierig, das Gen, von welchem die Amplifikation ausgeht, herauszufiltern. Zum anderen ist es wiederum schwierig, relativ kleine Amplicons mit den gängigen Screening-Methoden überhaupt zu finden.

In den letzten Jahren und Jahrzehnten sind verschiedene Techniken zur Identifikation und Detektion von Genkopiezahlveränderungen entwickelt worden.

Die erste Technik mit der chromosomale Defekte detektiert werden konnten ist die Karyotypisierung, die Ende der 50er Jahre entwickelt wurde. Hierbei werden die Chromosomen so vorbehandelt, dass sie sich ausbreiten. Sie lassen sich dann differenzieren und in Paaren anordnen, so dass Chromosomenabnormalitäten numerischer und struktureller Natur sichtbar werden.

Durch das Ende der 60er Jahre entwickelte „Chromosomen-Banding“, bei dem Metaphasechromosomen mit speziellen Färbemitteln angefärbt werden und dadurch Muster von hellen und dunklen Banden zeigen, konnten chromosomale Abnormalitäten noch besser studiert werden. Nachteilig hierbei ist vor allem, dass der Untersucher auf

sich teilende Zellen angewiesen ist und Limitierungen in der Auflösung keine Detektion kleiner Abberationen zulassen. Dieser Limitierung wurde mit der Entwicklung zytogenetischer Verfahren begegnet. Anfang der 80er Jahre wurde die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) vorgestellt. Der methodische Hintergrund dieser Technik ist unter „Material und Methoden“ beschrieben. Bei Anwendung der FISH zur Erkennung von Genkopiezahlvermehrungen ist man allerdings auf die Kenntnis der ungefähren Lokalisation der Genveränderungen angewiesen und kann immer nur eine limitierte Zahl von Genen untersuchen. Diese Technik eignet sich zur Detektion bekannter Genloci, ist allerdings für die Suche nach unbekannten Genkopiezahlveränderungen eher unbrauchbar.

Die erste Technik mit der in einem Ansatz Genkopiezahlveränderungen des gesamten Genoms eines Individuums analysiert werden konnte, ist die „comparative genomic hybridization“ (CGH), die 1992 von Kallioniemi et al. vorgestellt wurde (Kallioniemi et al. 1992). Hierbei wird die zu untersuchende DNA gegen eine normale Referenz-DNA gemessen. Beide DNAs werden auf Metaphase-Chromosomen hybridisiert, wo sie um Bindungsstellen an der DNA konkurrieren. Durch verschiedene Farbmarkierungen der zu untersuchenden und der Referenz-DNA lassen sich in der Analyse drei Gruppen über die Farbgebung unterscheiden. Herrscht an einem Genlocus die Farbe, mit der die zu untersuchende DNA markiert wurde vor, so spricht dies für eine Amplifikation an dieser Stelle; herrscht die Markierungsfarbe der Referenz-DNA vor, so liegt an dieser Stelle eine Deletion der zu untersuchenden DNA vor; keine Genkopiezahlveränderung liegt vor, wenn sich eine Mischung aus beiden Markierungsfarben zeigt.

Abbildung 1 zeigt das Bild einer CGH.

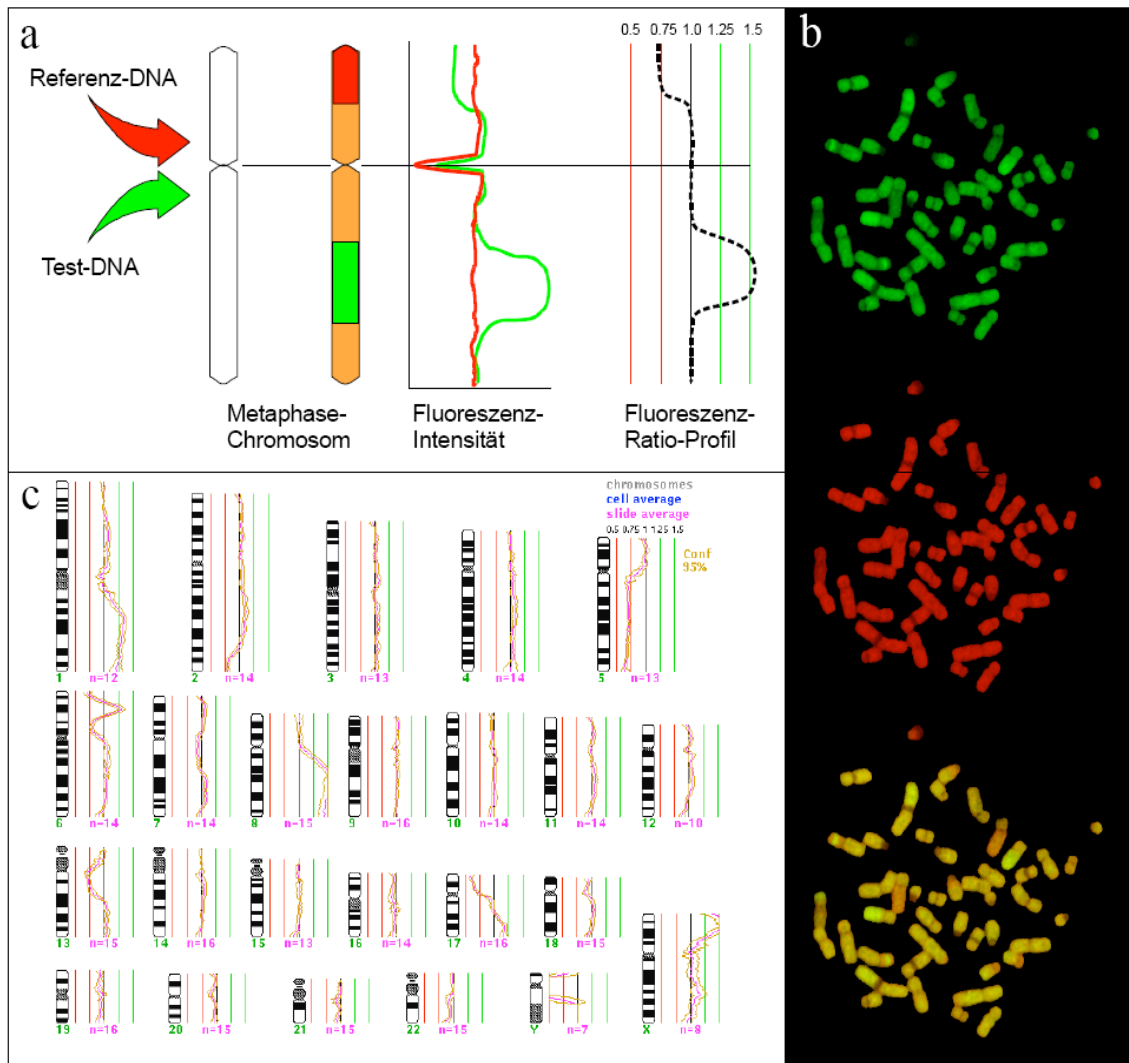


Abb.1a) schematischer Ablauf einer CGH-Analyse (siehe auch Text); ein Ratio-Profil von 1,0 zeigt normale DNA-Verhältnisse, Verschiebungen der Fluoreszenzratio über 1,25 werden als Zugewinne, Verschiebungen unter 0,75 als Verluste chromosomalen Materials der Tumor-DNA am entsprechenden chromosomalen Lokus gewertet.

b) Fluoreszenzbilder von Metaphasechromosomen, die mit grüner (FITC-markierter) Tumor-DNA (oben) und roter (Rhodamin-markierter) Referenz-DNA (mitte) markiert wurden. Die synchrone Anregung der grünen und roten Fluoreszenz (unten) zeigt Zugewinne der Tumor-DNA als Bereiche intensiver grüner Fluoreszenz, während DNA-Verluste rot erscheinen.

c) CGH-Ratio-Profil; die roten Linien repräsentieren den Mittelwert, die flankierenden gelben Linien stellen die Standardabweichung dar.

Da mit der konventionellen CGH alle Chromosomen in einem einzigen Experiment analysiert werden können und man nicht auf sich teilende Zellen angewiesen ist, ist sie zur populärsten Technik zum „scannen“ des Genoms geworden.

Den größten Nachteil der konventionellen CGH stellt allerdings auch wiederum das limitierte Auflösungsvermögen dar. DNA-Veränderungen, die kleiner als 5-10 Mb sind, können nicht detektiert werden (Kallioniemi et al. 1994; du Manoir et al. 1995; Bentz et al. 1998).

Diese Limitierung wurde mit der Vorstellung der „microarray-based CGH“ (Array-CGH) aufgehoben. Die Array-CGH bedient sich des Prinzips der konventionellen CGH, wobei die Metaphase-Chromosomen durch geklonte DNA-Fragmente ($\pm$ 100-200 Kb) ersetzt werden. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer viel detaillierteren Detektion von Abberationen und die Veränderungen lassen sich direkt auf der genomischen Sequenz „mappen“. Durch dieses Vorgehen können Arrays konstruiert werden, die jede Region von Interesse mit jeder gewünschten Auflösung abbilden. Die nächste Weiterentwicklung stellen Oligonukleotid-Arrays (GeneChips) dar, die sich durch ein noch höheres Auflösungsvermögen auszeichnen (ca. 50 Kb). Sie sind in den letzten Jahren zur Marktreife gekommen und ermöglichen die kombinierte Analyse von DNA-Kopiezahl und RNA-Expressionsniveau von praktisch allen humanen Genen aus derselben Gewebeprobe.

Ziel dieser Arbeit war es nach noch nicht entdeckten, klinisch relevanten Genamplifikationen beim Mammakarzinom zu suchen und diese an einem großen Kollektiv von Mammakarzinomen zu validieren. Die Arbeit zur vorliegenden Studie teilt sich in zwei Bereiche. Zuerst wurden existierende Daten aus einer vorausgegangenen Array-CGH-Studie (Affymetrix 10K SNP Array) nach kleinen Amplicons von potentiell relevanten Gengruppen durchsucht. Um identifizierte Amplifikationen zu validieren und deren mögliche klinische Bedeutung zu erkennen wurde dann in einem zweiten Schritt eine FISH an Tissue Microarrays durchgeführt.

1.1 Vorarbeiten

Für die DNA-Chipanalyse wurde Gewebe von 30 frisch eingefrorenen Mammakarzinomen (alle G3) aus dem Gewebearchiv des Instituts für Pathologie des Unispitals Basel (Schweiz) gewonnen. Aus jedem der 30 Tumoren wurden jeweils drei Stanzbiopsien (Durchmesser: 0,6 mm) genommen und aus dem gewonnenen Gewebe wurde gemäß der Anleitung des „QIAmp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) DNA extrahiert. Mit der DNA wurde gemäß der Anleitung des „GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay“ (Affymetrix, Santa Clara, CA) weiterverfahren. 250ng der DNA wurden mit dem Restriktionsenzym XBA I verdaut, an einen Adaptor ligiert und mit Hilfe der PCR amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden fragmentiert, markiert und auf den „GeneChip Human Mapping 10K Array Xba 142 2.0“ hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde der Microarray-Chip gewaschen und mittels der „Affymetrix fluidics station“ gefärbt. Die Chips wurden dann mit dem „Affymetrix GeneChip scanner“ untersucht.

Die Rohdaten der untersuchten Arrays wurden mit Hilfe der „GeneChip Operating Software“ (Affymetrix) erhoben. Die Qualität der Daten wurde gemäß der Anleitung „GeneChip Mapping 10K 2.0 Assay“ (Affymetrix) geprüft. Nur 22 der 30 Proben haben den Qualitätsanforderungen entsprochen und konnten für die weitere Datenanalyse verwendet werden. Die Daten wurden in die „dChip software“ importiert (Li und Wong 2001) und das „pre-processing“ und die Normalisierung wurden, der Gebrauchsanleitung entsprechend, vorgenommen. Die resultierenden Signalintensitäten wurden in die „R suite“ (R Development Core Team 2005) importiert. Die Daten wurden weiterhin mit einer eigens entwickelten Analysemethode verarbeitet, wobei für jeden „DNA spot“ die Messungen zwischen der 25. und 75. Perzentile als Referenz verwendet wurden. Die Daten wurden dann entsprechend den Anforderungen des „DNACopy package“ (Venkatraman und Olshen 2004) der „Bio Conductor suite“ (Gentleman et al. 2004) modifiziert. Das „DNACopy package“ wurde verwendet, um die Bereiche mit ähnlichem DNA-Gehalt zu berechnen und zu visualisieren. Bereiche mit höherem DNA-Gehalt als im zuvor berechneten Referenzbereich wurden als Regionen potentieller Genamplifikationen eingestuft.

22 der 30 durchgeführten Chip-Experimente haben den Qualitätsanforderungen, die in der Anleitung von Affymetrix beschrieben sind, entsprochen. Bei zwei (9%) dieser 22 Proben wurden Amplifikationen, die das für den ER codierende Gen enthielten, identifiziert. In einer der beiden Proben umfasste das Amplicon einen Bereich von ungefähr 25 Megabasen (ungefähre Basenpositionen: 132.650.000-155.730.000). In

der anderen Probe hingegen umfasste der amplifizierte Bereich nur 514 Kilobasen auf 6q25.1 (Basenpositionen: 152.025.289-152.539.833). Der Östrogenrezeptor-alpha ist das einzige Gen, welches in dieser Region lokalisiert ist.

2. Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Um die Amplifikationen epidemiologisch evaluieren zu können, wurde der „Breast Prognosis TMA“ ausgewertet. Die Zusammenstellung dieses TMAs ist bereits beschrieben worden (Ruiz et al. 2006). Für 420 Patientinnen ist die Art der adjuvanten Therapie bekannt. Eine Gruppe von 261 Patientinnen wurde nur mit Tamoxifen behandelt und erhielt keine zusätzliche adjuvante zytotoxische Chemotherapie. Die Therapie wurde standardmäßig für 5 Jahre durchgeführt, wobei allerdings keine detaillierten Informationen erhältlich waren. Die Behandlung und Evaluation der Patientinnen erfolgte am Unispital Basel (Schweiz), dem Frauenkrankenhaus Rheinfelden und dem Kreiskrankenhaus Lörrach im Zeitraum von 1985 bis 2000. Die behandelnden Ärzte wurden kontaktiert und so die klinischen „follow-up“-Daten der Patientinnen gesammelt. Die Daten für das „staging“ wurden den Pathologieberichten entnommen. Dazu gehörten der maximale Tumordurchmesser, das pT-Stadium und der Lymphknotenstatus (Anzahl untersuchter und Anzahl positiver Lymphknoten, pN-Stadium).

Desweiteren wurde ein zweiter Tissue Microarray analysiert. Dieser enthielt 50 Proben aus gesundem Brustgewebe und 186 Proben aus nicht neoplastischem und prä malignem Gewebe. Diese 186 Proben waren im Einzelnen aus 62 DCIS, 10 LCIS, 14 apokrinen Metaplasien, 27 intraduktalen Hyperplasien, 5 atypischen intraduktalen Hyperplasien, 22 Mastopathien, 31 Papillomen und 15 Fällen von sklerosierenden Adenosen zusammengesetzt.

Mit Hilfe des „Breast Prognosis TMA“ wurden 2197 formalinfixierte, in Paraffin eingebettete, Mammakarzinome untersucht, die aus 4 verschiedenen Kollektiven stammen. Die Verwendung dieser Daten wurde durch die Ethikkommission des Universitätsspitals Basel genehmigt.

1. 648 Tumoren stammen von Patientinnen, die aufgrund eines Mammakarzinoms am Chirurgischen Spital des Kantonspitals Basel, an der Frauenklinik des Kantonspitals Basel bzw. an der Frauenklinik Rheinfelden oder im Kreiskrankenhaus Lörrach operiert wurden und deren Tumormaterial am Institut für Pathologie des Kantonspitals Basel untersucht wurde. Von allen Patientinnen sind Daten zum weiteren Krankheitsverlauf, inklusive angewandter Therapien und zum Zeitpunkt des Auftretens

von Rezidiven bzw. Metastasen bekannt. Ermitteln ließen sich somit sowohl tumorspezifische, wie auch Roh-Überlebensraten.

2. 324 Tumoren wurden am Institut für Pathologie des Stadtspitals Triemli in Zürich aufgearbeitet. Auch für diese Patientinnen gibt es Daten zu den angewandten Therapien, dem Zeitpunkt des Auftretens von Rezidiven sowie gegebenenfalls zum Todeszeitpunkt und der Todesursache. Außerdem konnte man für diese Patientinnen tumorspezifische und Roh-Überlebensraten bestimmen.

3. Zu den 785 Mammakarzinomen, die am Institut für klinische Pathologie in Basel untersucht wurden, liegen lediglich Daten zu den Roh-Überlebensraten, nicht jedoch zu den tumorspezifischen Überlebensraten vor.

4. Auch zu 446 Mammakarzinomen, die am Institut für Pathologie des Kantonspitals Basel aufgearbeitet wurden, konnten lediglich Daten zu den Roh-Überlebensraten erhoben werden, nicht jedoch zu den tumorspezifischen Überlebensraten.

Das mittlere Überlebensalter der Patientinnen betrug 62 Jahre (26 bis 101 Jahre), bei einer mittleren Beobachtungszeit von 68 Monaten (1 bis 176 Monate). Die Roh-Überlebensraten wurden entweder durch das Krebsregister in Basel oder durch die betreuenden Ärzte der betroffenen Patientinnen erhoben. Tumorstadium, Tumordurchmesser und Lymphknotenstatus der untersuchten Tumoren wurden jeweils den ersten pathologischen Berichten (UICC 1992) entnommen.

Die histologischen Schnitte eines jeden Tumors wurden durch einen von zwei Pathologen (Prof. J. Torhorst, Prof. G. Sauter) begutachtet, um den histologischen Tumortyp zu definieren und den histologischen Grad entsprechend der Einteilung von Bloom-Richard-Elston (BRE) festzustellen (Elston und Ellis 1991).

Die genaue Zusammensetzung des „Breast Prognosis TMA“ nach Histologie, Tumorstadium, Nodalstatus und Grading ist unter „Ergebnisse“ aufgelistet (Tabelle1/Tabelle2).

2.2 Immunhistochemie

Um das Östrogenrezeptor-Protein immunhistochemisch zu detektieren, wurde der Antikörper NCL-L-ER-6F11 (Novocastra, Newcastle, UK) verwendet. Die Schnitte wurden entparaffiniert und für 12 Minuten bei 120°C unter Druck in einem pH6-Citratpuffer (Retrievit 6 #BS-1006-00, BioGenex, San Ramon, CA) inkubiert. Nach Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte im verdünnten (1:1000) Primärantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert. Um die Antikörperbindung nachzuweisen wurde das „Vectastain ABC Elite“-System benutzt. Der Grad der Positivität der IHC-Färbung wurde nach Allred (Harvey et al. 1999) eingeteilt. Die ER-Färbung wurde in eine Skala von vier Intensitäten (0-3) unterteilt, der Anteil an positiven Tumorzellen wurde in fünf Stufen (1-5) unterteilt. Die Kombination beider Parameter resultierte in einer 8-Punkte-Skala, wobei alle Proben mit einer Punktzahl über zwei als ER-positiv gewertet wurden.

2.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für die zweifarbige FISH-Analyse wurden 4µm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Dies geschah gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis, Downers Grove, IL). Zur Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte digoxigenierte BAC-Sonde (6q25.1; BAC RP11-450E24, RZPD, Deutschland), welche das ESR1-Gen umfasst, eingesetzt. Als Referenz wurde eine kommerzielle Sonde für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum orange, Vysis) eingesetzt. Die Markierung der selbst hergestellten DNA-Sonde mittels Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt. Die Detektion der hybridisierten TMA-Schnitte wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ (Roche) durchgeführt. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und Laborprotokolle zur Durchführung der FISH aufgeführt. Diese umfassen:

- 1) pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung
- 2) DNA-Extraktion aus der E.coli-Kultur
- 3) DNA-Markierung mittels Nick-Translation
- 4) Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung der TMA-Schnitte
- 5) Hybridisierung
- 6) Waschen
- 7) Detektion

2.3.1 pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung

Verwendete Materialien

- pBAC-E.coli-Klon, RZPD-Nr.: RP11-450E24 (stab-stock-Kultur)
- Kulturmedium: 25g Luria-Broth-Base (25g/l dH₂O); autoklaviert
- Antibiotikum: Chloramphenicol (34mg/ml Ethanol abs.)

Laborprotokoll: pBAC-E.coli-Klon-Kultivierung

- 1) 10ml Medium in einen 100ml Erlenmeyerkolben füllen
- 2) Zugabe von 30µl Chloramphenicol
- 3) Mit abgeflammter Pinzette einen autoklavierten Zahnstocher fassen und einen Abstrich aus der stab-stock-Kultur machen
- 4) Animpfen des Mediums durch Zugabe des Zahnstochers
- 5) Inkubation der angeimpften Kultur bei Raumtemperatur und 200rpm im Schüttelinkubator für 2 Tage
- 6) Überimpfen von 10µl der trüb gewordenen Kultur in einen mit 10ml Medium gefüllten und mit 30µl Chloramphenicol versetzten 100ml-Erlenmeyerkolben mittels Pipette
- 7) Inkubation der angeimpften Kultur bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator über Nacht
- 8) DNA-Extraktion

2.3.2 DNA-Extraktion

Die DNA wurde aus einer pBAC-E.coli-Flüssigkultur mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen nach leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprep spin Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten.

Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus einer pBAC-E.coli-Klon-Flüssigkultur

- 1) 3ml (2ml + 1ml) der Flüssigkultur im 2ml-Tube in einer Tischzentrifuge (~17.900 x g) für 90sec bei 13.000rpm pelletieren
- 2) Pellet in 250µl Puffer P1 vollständig resuspendieren
- 3) Zugabe von 250µl Puffer P2 und vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges invertieren (nicht länger als 5min mit dem folgenden Schritt warten)
- 4) Zugabe von 350µl Puffer N3 und sofortiges, vorsichtiges Mischen durch 4-6 maliges invertieren
- 5) 10 min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 6) Überstand in eine „QIAprep spin Säule“ überführen
- 7) 1 min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 8) Durchfluß verwerfen
- 9) „QIAprep spin Säule“ mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 10) Durchfluß verwerfen
- 11) „QIAprep spin Säule“ erneut mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 12) Durchfluß verwerfen
- 13) „QIAprep spin Säule“ erneut 1min bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
- 14) Durchfluß verwerfen; „QIAprep spin Säule“ in ein 1,5ml-Tube setzen
- 15) „QIAprep spin Säule“ mit 50µl auf 70°C erwärmten Puffer EB beladen
- 16) 1min bei Raumtemperatur inkubieren
- 17) 1min Zentrifugation bei 13.000rpm in einer Tischzentrifuge
- 18) Säule entfernen und Quantifizierung der DNA im „Nanodrop“ und Aufbewahrung im 1,5ml-Tube bei 4°C

2.3.3 DNA-Markierung mittels Nick-Translation

Die Nick-Translation ist eine Methode zum gleichmäßigen Einbau markierter Nukleotide in den DNA-Doppelstrang, wobei die DNA gleichzeitig auf die optimale Fragmentlänge zur Hybridisierung eingestellt wird. Die Fragmentlänge kann durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden.

Die Nick-Translation wurde mit dem „Nick Translation System“ (Invitrogen) durchgeführt, wobei eine Mindestmenge von 1µg DNA zu einem Ansatz von 50µl gegeben wurde. Das Protokoll des Kits wurde modifiziert. Das zulässige Höchstvolumen an pBAC-DNA-Lösung von 38µl wurde als Standardvolumen gewählt (entsprechend ca. 1,5 bis 2,5µg DNA). Außerdem wurde nach Ablauf der Standardinkubationszeit ein weiteres Mal Pol I-/DNase-Enzym-Mix zugegeben und weiter inkubiert.

Verwendete Materialien

- Nick Translation System (Invitrogen)
- Digoxigenin 11-dUTP (Roche)
- Polymerase I (Invitrogen)

Pipettieransatz im 0,5ml-Tube

dNTP-Mix ohne dTTP	5µl
Digoxigenin 11-dUTP	1µl
pBAC-DNA-Lösung	38µl
Pol I-/ DNase Enzym Mix	5µl
DNA Polymerase I	1µl
Ansatzmenge	50µl

Laborprotokoll: DNA-Markierung mittels Nick-Translation

- 1) Ansatz gut durchmischen und danach herunterzentrifugieren
- 2) Inkubation für 90min bei 15°C im Thermocycler
- 3) Zugabe von weiteren 5µl Pol I-/DNase-Enzym-Mix; mit der Pipette durchmischen
- 4) Inkubation für 15min bei 15°C im Thermocycler
- 5) Zugabe von 5µl Stop Buffer
- 6) Durchmischen (auf dem Vortex) und danach zentrifugieren
- 7) Lagerung bei 4°C

2.3.4 Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

Die TMA-Schnitte wurden vor der Hybridisierung gemäß des Protokolls des „Paraffin Pretreatment Reagent Kit“ (Vysis) behandelt.

Verwendete Materialien

- Destilliertes Wasser (dH₂O)
- Ethanol (70% / 80% / 95%)
- VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL) (Vysis)
- Xylol

Laborprotokoll: Entparaffinierung und proteolytische Vorbehandlung

- 1) TMA-Schnitte 3×10min in Xylol stellen
- 2) TMA-Schnitte 2×5min in Ethanol (95%) stellen
- 3) TMA-Schnitte 3min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen
- 4) TMA-Schnitte 15min in 80°C warmer Pretreatmentlösung (Wasserbad) inkubieren
- 5) TMA-Schnitte 2min in dH₂O waschen
- 6) TMA-Schnitte 150min in 37°C warmer Proteaselösung (Wasserbad) inkubieren
- 7) TMA-Schnitte 2min in dH₂O waschen
- 8) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (70%) stellen
- 9) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (80%) stellen
- 10) TMA-Schnitte 3min in Ethanol (95%) stellen
- 11) TMA-Schnitte 3min auf Heizplatte (48°C) lufttrocknen

2.3.5 Hybridisierung

Die Hybridisierung wurde mit einer selbst hergestellten genspezifischen Sonde (6q25.1, RZPD Nr.: RP11-450E24) und einer kommerziellen Sonde, als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum orange, Vysis), durchgeführt. Die kommerzielle Sonde wurde nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Beide Sonden wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner Cot-DNA (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen/repetetiver Sequenzen) und einem Hybridisierungsmix (Basis-Hybridisierungsmix) auf die TMA-Schnitte gegeben, mit diesen für 10min bei 72°C co-denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Vysis) durchgeführt.

Verwendete Materialien

- 20×SSC
- Cot-DNA
- Dextransulfat
- Formamid (deionisiert)

Laborprotokoll: Herstellen des Basis-Hybridisierungsmix

- 1) 5ml deionisiertes Formamid, 1,5ml 20×SSC und 1g Dextransulfat in ein kleines Becherglas geben
- 2) bei 60°C auf dem Heizrührer rühren, bis sich das Dextransulfat gelöst hat
- 3) Suspension mit HCl auf pH7 einstellen
- 4) mit dH₂O auf 7ml auffüllen
- 5) bei 4°C aufbewahren

Hybridisierungsmix (Master-Mix 1.0)

Basis-Hybridisierungsmix	14µl
Cot-DNA	2µl
Sonden-DNA	4µl
Ansatz	20µl

Laborprotokoll: Hybridisierung

- 1) Hybridisierungsmix auf den TMA geben
- 2) Eindeckeln mit einem 24×32mm Deckgläschen
- 3) mit Rubbervement versiegeln
- 4) bei 75°C für 10min im Hybrite denaturieren und dann über Nacht bei 37°C im Hybrite inkubieren

2.3.6 Waschen

Im Anschluss an die Hybridisierung wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen.

Verwendete Materialien

- 2×SSC
- dH₂O
- NP40

Laborprotokoll: Waschen

- 1) TMA-Schnitte aus dem Hybrite nehmen und Rubbercement und Deckgläschen entfernen
- 2) Schnitte in Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) bei Raumtemperatur stellen
- 3) Schnitte 2min bei 72°C im Waschpuffer (2×SSC; 0,3% NP40) waschen
- 4) Schnitte kurz in dH₂O waschen
- 5) Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

2.3.7 Detektion

Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigeninreste der selbsthergestellten Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde das „Enhancer Detection Kit“ von Roche eingesetzt. Nach der Detektion wurden die Schnitte wieder im Dunkeln luftgetrocknet und dann mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI; H-1200 (Vector)) und einem 24×32mm Deckgläschen eingedeckelt.

Um eine schnelle Evaluierung des Arrays zu gewährleisten, wurde die Ratio ESR1-Signale/Zentromer 6-Signale in den einzelnen Krebszellen für jede Gewebeprobe geschätzt. Als Amplifikation wurde das Vorliegen von mindestens doppelt so vielen ESR1-Signalen wie Zentromer 6-Signalen ($\text{Ratio ESR1/Zen6} \geq 2,0$) definiert. Gewebeproben, die eine ESR1/Zen6-Ratio von über 1,0, aber unter 2,0 aufwiesen ($1,0 < \text{Ratio ESR1/Zen6} < 2,0$), wurden als „Gains“ bezeichnet. Alle anderen Gewebeproben ($\text{Ratio ESR1/Zen6} \leq 1,0$) wurden als normal definiert. Beispiele für ESR1-Amplifikationen sind in Abbildung 2 dargestellt.

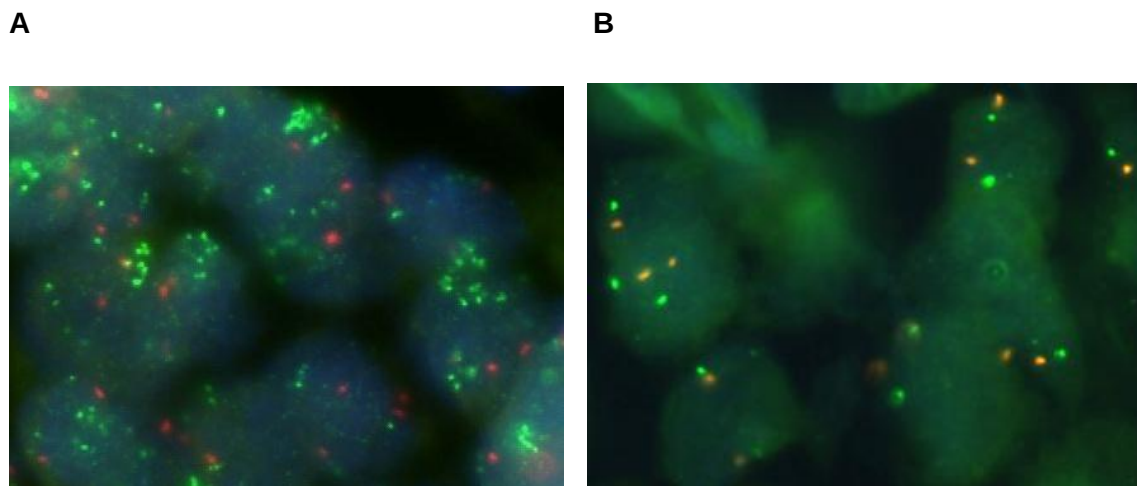


Abb. 2 Beispiele von ESR1-amplifizierten (2A) und nicht-amplifizierten (2B) Tumorzellen. Die grünen Signale markieren die ESR1-Gensequenz, die roten Signale das Zentromer 6.

2.4 Statistik

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, „Grading“ des Tumors, „Staging“ und Genamplifikationen darzustellen, wurde die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die Berechnung der Überlebenskurven erfolgte nach Kaplan-Meier. Der Log-rank-Test wurde angewandt, um den Zusammenhang zwischen Genamplifikationen und Patientenüberleben zu untersuchen. Mit Hilfe der Cox Regression wurden die Abhängigkeiten der analysierten Variablen untereinander in Relation zum Patientenüberleben gesetzt.

3. Resultate

3.1 ESR1 Amplifikation

Der ESR1-Status konnte für 1739 (79%) der 2197 Mammakarzinome erfolgreich bestimmt werden. Insgesamt 458 Fälle waren nicht analysierbar, da die Gewebespots entweder keine Tumorzellen enthielten oder ganze Gewebespots verloren gegangen waren. Gemäß den vorher definierten Kriterien zeigten sich in 358 (20,6%) von 1739 analysierbaren Gewebeproben Amplifikationen des ESR1-Gens. Weitere 266 (15,3%) Gewebeproben erfüllten die Kriterien eines ESR1-Gains. Abbildung 2 zeigt Beispiele amplifizierter und nicht-amplifizierter Tumorzellen. Die meisten amplifizierten Fälle zeigten eine wölkchenförmige Anordnung der zusätzlichen ESR1-Kopien. Das lässt darauf schließen, dass es sich um intrachromosomale Amplifikationen handelt (homogen gefärbte Regionen). „High level“-Amplifikationen (≥ 10 Signale pro Tumorzelle) wurden lediglich in 18% der amplifizierten Fälle gefunden. ESR1-Amplifikationen und „Gains“ waren signifikant mit „low grade“-Tumoren ($p < 0,0001$) und der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen ($p < 0,05$) assoziiert. Der Anteil an Amplifikationen war bei den medullären Karzinomen verhältnismäßig klein (2,0%) im Vergleich zu duktalen (21,5%, $p < 0,0001$), lobulären (19,3%, $p < 0,0001$) und tubulären (18,6%, $p < 0,0009$) Karzinomen. Auffällig war der hohe Anteil an Amplifikationen (35,6%, $p = 0,0337$) in muzinösen Karzinomen. Der Zusammenhang zwischen den Änderungen in der ESR1-Genkopiezahl und dem histologischen Subtyp des Mammakarzinoms ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab.1 Zusammenhang zwischen Änderungen der ESR1-Genkopiezahl und der Art des Mammakarzinoms

		Gesamt (n)	Analysierbar (n)	Amplifikation	Gain	P
Tumoren		2197	1739	20,6%	15,3%	
Histologie	Duktales Karzinom	1552	1207	21,5%	16,0%	0.0337* < 0,0001*
	Lobuläres Karzinom	312	207	19,3%	13,8%	
	Muzinöses Karzinom	69	37	35,6%	24,4%	
	Medulläres Karzinom	58	48	2,0%	2,0%	
	Tubuläres Karzinom	56	42	18,6%	14,0%	
	Cribriformes Karzinom	65	55	29,8%	12,3%	
	Papilläres Karzinom	30	27	19,2%	15,4%	
	Andere	79	56	4,9%	14,8%	
pT-Stadium	pT1	820	578	22,3%	15,6%	0,7295
	pT2	1023	811	19,7%	14,8%	
	pT3	124	92	18,8%	13,5%	
	pT4	242	189	17,8%	16,8%	
Nodalstatus	pN0	950	711	22,3%	14,4%	0,0422
	pN1	793	608	16,5%	16,5%	
	pN2	121	90	14,8%	12,5%	
Grading	G1	545	421	25,6%	15,2%	< 0,0001
	G2	844	685	21,6%	18,5%	
	G3	655	571	15,0%	11,7%	

* versus Duktales Karzinom

Überraschenderweise wurden Amplifikationen auch in nicht neoplastischen und präkanzerösen Läsionen gefunden. Die Amplifikationen waren bei diesen Geweben besonders häufig in Papillomen (8/22, 36%) und in duktalem Carcinoma in situ (DCIS) (14/40, 35%) zu beobachten. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tab.2 Prävalenz der ESR1-Genkopiezahlvermehrungen in normalem und prämaligmem Gewebe

Histologie	Gesamt (n)	Analysierbar (n)	Amplifikation (%)	Gain (%)
Normales Mammagewebe	50	21	0,0	0,0
Mastopathie	22	13	0,0	7,7
Apokrine Metaplasie	14	4	0,0	0,0
Intraduktale Hyperplasie	27	12	8,3	25,0
Atypische intraduktale Hyperplasie	5	1	0,0	100,0
Sklerosierende Adenosen	15	8	0,0	0,0
Papillome	31	22	36,4	4,5
DCIS	62	40	35,0	7,5
LCIS	10	3	33,3	33,3

3.2 Östrogen Rezeptor Expression

Die immunhistochemische Analyse der ER-Expression war in 2018 (92%) von 2197 Fällen erfolgreich. Insgesamt 179 Tumoren waren nicht analysierbar, da die Gewebespots entweder keine Tumorzellen enthielten oder ganze Gewebespots verloren gegangen waren. Mindestens eine schwache ER-Expression wurde in 1546/2018 (76,6%) der analysierbaren Tumoren gefunden. Die ER-Expression war mit gut differenzierten (G1, $p < 0,0001$) und frühen (pT1, $p = 0,0020$) Mammakarzinomen assoziiert. Der Zusammenhang zwischen ER-Expression und der Art des Mammakarzinoms ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab.3 Zusammenhang zwischen ER-Expression und der Art des Mammakarzinoms

		Gesamt (n)	Analysierbar (n)	Positiv [*]	P
Tumoren		2197	2018	76,6%	
Histologie	Duktales Karzinom	1552	1429	77,1%	< 0,0001**
	Lobuläres Karzinom	312	275	87,6%	
	Muzinöses Karzinom	69	61	93,4%	
	Medulläres Karzinom	58	52	17,3%	
	Tubuläres Karzinom	56	48	89,6%	
	Cribriformes Karzinom	65	56	91,1%	
	Papilläres Karzinom	30	28	67,9%	
	Andere	79	69	34,8%	
pT-Stadium	pT1	820	716	80,4%	0,0020
	pT2	1023	948	73,2%	
	pT3	124	114	72,8%	
	pT4	242	229	80,3%	
Nodalstatus	pN0	950	849	78,1%	0,1765
	pN1	793	726	75,6%	
	pN2	121	113	70,8%	
Grading	G1	545	522	92,9%	< 0,0001
	G2	844	833	86,3%	
	G3	655	661	51,9%	

* gemäß Allred

** versus Duktales Karzinom

Die ESR1-Amplifikation war signifikant mit der ER-Expression assoziiert ($p < 0,0001$). Der Vergleich von ER-Expression mit dem ESR1-Amplifikationsstatus ergab, dass fast alle amplifizierten Fälle eine starke ER-Protein Expression aufwiesen: Von 341 Mammakarzinomen mit ESR1-Amplifikation zeigten 339 (99%) eine ER-Expression (94% mit 7-8 Punkten nach Allred und 5% mit score 5-6 (Harvey et. al 1999)). Dies traf auch für Tumoren zu, die als „Gains“ eingeteilt wurden. Hierbei zeigten 96% aller Proben eine starke ER-Expression (5-8 Punkte nach Allred); siehe Tabelle 4.

Tab.4 Vergleich von ESR1-Amplifikation und ER-Immunhistochemie

ESR1-FISH Ergebnisse		ER-IHC Ergebnisse (gemäß Allred)			
	N	0-2 (%)	3-4 (%)	5-6 (%)	7-8 (%)
Normal	1056	33,3	8,2	14,1	44,3
Gain	255	2,4	1,6	7,5	88,6
Amplifiziert	341	0,6	0,3	4,7	94,4

3.3 Prognostische Relevanz der ESR1-Genkopiezahlvermehrungen

Um den potentiellen klinischen Einfluss der ESR1-Amplifikation auf das Ansprechen des Tumors auf eine anti-ER-Therapie aufzuzeigen, wurden für eine Gruppe von 261 Patientinnen, die nur eine adjuvante Monotherapie mit Tamoxifen erhalten haben, die Daten der FISH und der IHC kombiniert. Für diese Analyse wurden die Patientinnen in drei Gruppen unterteilt:

- I. ER-IHC negativ (0-1 nach Allred)
- II. ER-IHC positiv (2-8 nach Allred), aber keine ESR1-Amplifikation
- III. ESR1-Amplifikation

Wie erwartet war die Prognose für die IHC negativen Tumoren am schlechtesten. Bemerkenswerterweise zeigte sich aber, dass die Patientinnengruppe mit ESR1-Amplifikationen eine signifikant bessere Prognose hatte, als die Patientinnengruppe, die zwar ER-IHC positiv war, aber keine ESR1-Amplifikation zeigte ($p=0,0233$, ESR1-amplifiziert gegenüber ER-IHC positiv, siehe Abbildung 3a). Die bessere Prognose bestätigte sich zumindest tendenziell auch für Tumoren mit ESR1-Amplifikationen gegenüber den Tumoren mit den höchsten ER-Expressionsniveaus ($p=0,0889$, ESR1-Amplifikationen gegenüber ER-Expressionsniveaus von 7-8 nach Allred, siehe Abbildung 3b). Die Prognose der Patientinnen war außerdem abhängig von der absoluten ESR1-Genkopiezahlvermehrung (siehe Abbildung 3c).

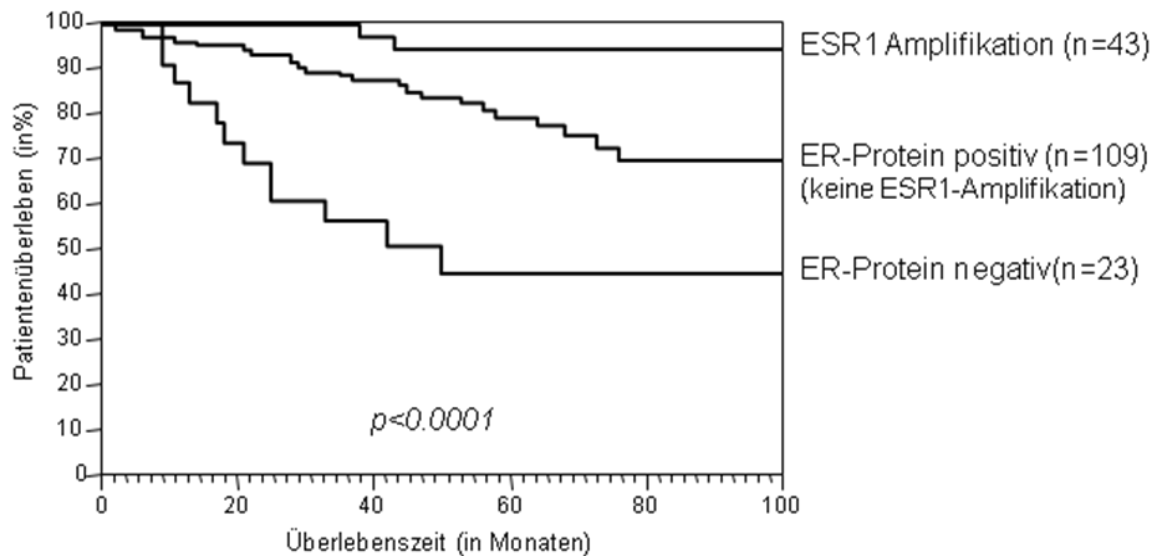


Abb.3a Einfluss des ESR1-Amplifikationsstatus und des ER-Expressionsstatus auf das Überleben bei Patientinnen mit Tamoxifen-Monotherapie

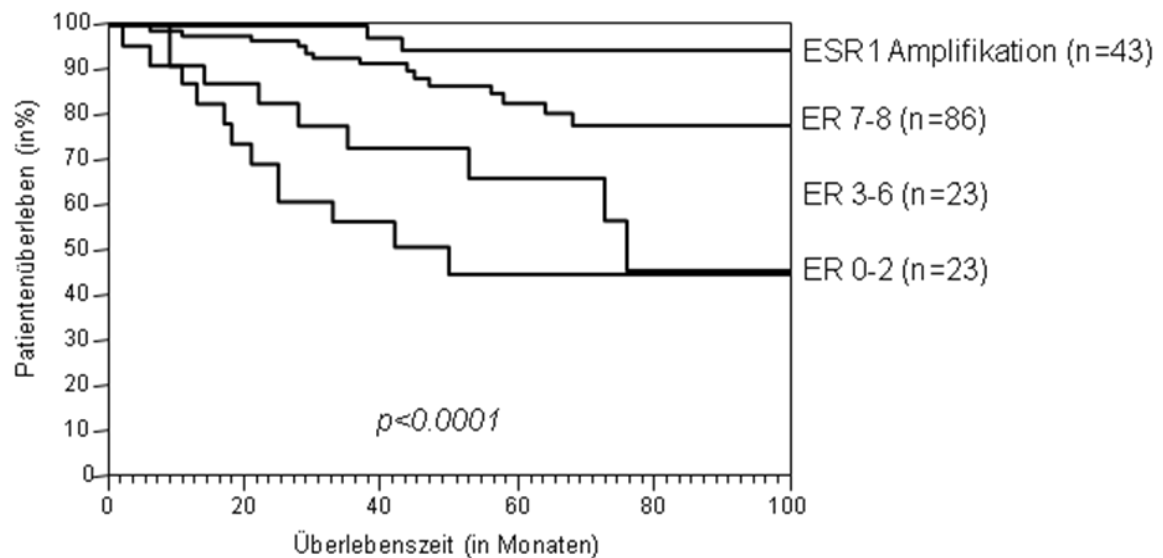


Abb.3b Einfluss der ESR1-Amplifikation auf das Patientinnenüberleben im Vergleich zu verschiedenen ER-Expressionsniveaus

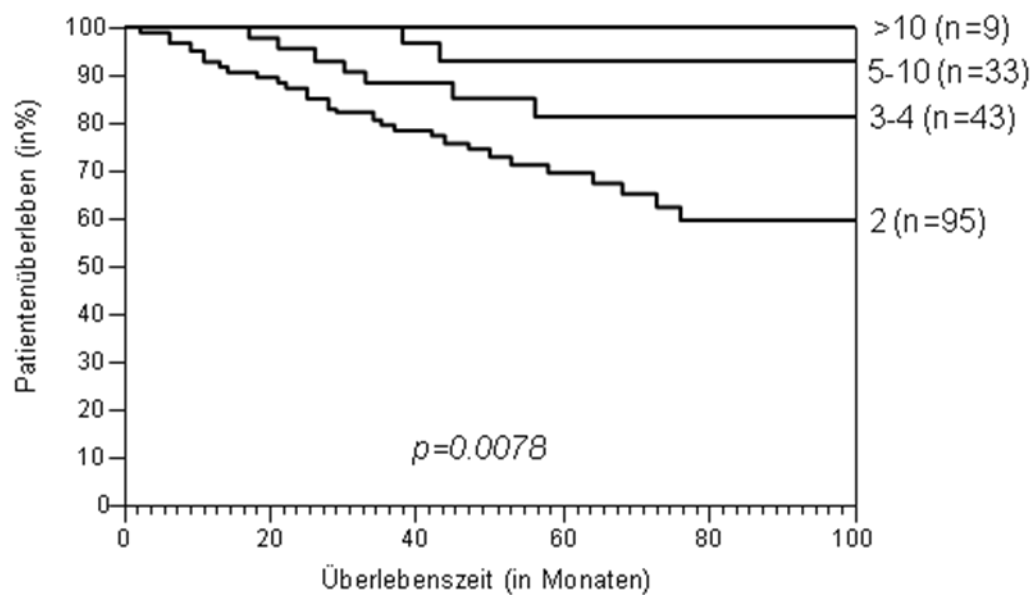


Abb.3c Einfluss der ESR1-Genkopiezahl auf das Patientinnenüberleben

Die ESR1-Amplifikation zeigte sich in einer multivarianten Analyse (Cox-Regression) als unabhängiger Prognosemarker (siehe Tabelle 5).

Tab.5 Einfluss verschiedener potentieller prognostischer Faktoren auf das Überleben von Brustkrebspatientinnen, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhielten (Cox-Regression)

Parameter		p-Wert
pT-Stadium	pT1-4	0,3867
Grading	G1-3	0,1568
Nodalstadium	pN0-pN2	< 0,0001
ER-Expressionsstatus	neg./pos. (gemäß Allred)	0,0003
ESR1-Amplifikationsstatus	Normal vs. Amplifikation/Gain	0,0080

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes zeigen, dass das ESR1-Gen zu den am häufigsten amplifizierten Genen beim Mammakarzinom zählt. Obwohl nur eine kleine Gewebeprobe (0,6mm im Durchmesser) pro Tumor analysiert wurde, haben wir in 20,6% aller Mammakarzinome ESR1-Amplifikationen gefunden. Mit demselben „Breast Prognosis“-TMA und unter Verwendung der gleichen Definition für Amplifikation, wie in dieser Arbeit, sind Amplifikationen für die Gene CCND1 in 20,1%, HER2 in 17,3%, MDM2 in 5,7%, CMYC in 5,3% und EGFR in 0,8% der Tumoren gefunden worden (Al-Kuraya et al. 2004). Führt man sich die große Bedeutung der ER-Expression für die Brustkrebstherapie und auch die wichtige Rolle, die Genamplifikationen durch den Mechanismus der Überexpression von Zielgenen spielen, vor Augen, so ist es bemerkenswert, dass die ESR1-Amplifikation nicht schon früher entdeckt wurde. Bisher wurde nur in zwei Studien eine Amplifikation des ESR1-Gens beschrieben. In einer ersten Studie konnte bereits 1990 (Nembrot et al. 1990) die Existenz von ESR1-Amplifikationen mittels Southern-Blot-Verfahren nachgewiesen werden. Allerdings fanden die Autoren keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Amplifikation und Überexpression - vermutlich aufgrund methodischer Schwächen – sodass die Entdeckung nicht entsprechend gewürdigt wurde. In einer weiteren Studie aus dem Jahr 2005 (Nessling et al. 2005) wurde mittels Matrix-CGH-Untersuchung, neben 30 anderen Amplicons, auch das Amplicon auf 6q25.1, welches das ESR1-Gen enthält, in 3 von 31 Fällen gefunden. Auch hier wurde dem Befund nicht die gebührende Aufmerksamkeit entgegengebracht, sodass die ESR1-Amplifikation erneut in Vergessenheit geriet.

Bemerkenswert ist, dass die ESR1-Amplifikation nicht in den zahlreichen klassischen CGH-Untersuchungen der letzten 10 Jahre entdeckt wurde. Die Schwierigkeit dieses Amplicon auf 6q25.1 zu detektieren liegt wahrscheinlich in der geringen Größe des Amplicons begründet. In der DNA-Chipanalyse wurde das Amplicon nur in zwei Tumoren gefunden, wobei es in einem der beiden Fälle nur etwa 500 Kilobasen groß war und ESR1 als einziges Gen enthielt. Diese Amplifikationen einzelner Gene sind selbst mit hochauflösenden „CGH-Arrays“ nur sehr schwer zu identifizieren. Aufgrund eines doch erheblichen „experimental noise“ bei Array-Untersuchungen treten oft „single spot peaks“ auf und es wird schwierig Artefakte von tatsächlichen Amplifikationen zu unterscheiden. Das Herstellen und Arbeiten mit einer FISH-Sonde gegen das ESR1-Gen erlaubte uns nicht nur die Validierung der ESR1-Amplifikation, sondern auch eine intensive epidemiologische Untersuchung dieser Amplifikation. Eine

weitere Validierung der Forschungsergebnisse ergab sich durch die deutliche Assoziation der ESR1-Amplifikation mit einer positiven ER-IHC (99% aller amplifizierten Fälle waren auch in der IHC positiv) und hierbei mit einem hohen ER-Expressionsniveau. Diese Untersuchung demonstrierte auch gleichzeitig die deutliche funktionelle Bedeutung der ESR1-Amplifikation. Offensichtlich finden sich ESR1-Amplifikationen vor allem in einer Untergruppe von ungefähr 30% aller stark ER-positiven Tumoren. Hier stellt sich die Frage, ob die ESR1-Amplifikation den Erfolg/Misserfolg einer anti-ER Therapie vorhersagen könnte. Beispiele hierfür sind Amplifikationen von HER2 und dem benachbarten TOP2A-Gen, die eine bessere Vorhersage für das Ansprechen auf die Therapie mit Herceptin (HER2-Amplifikation) oder Anthracyclinen (TOP2A-Amplifikation) zulassen, als die durch die IHC bestimmte Protein-Überexpression ((Jarvinen et al. 2000; Cappuzzo et al. 2005; Mass et al. 2005). Die überlegene Rolle des Amplifikationsstatus in der Vorhersage kommt zum einen wahrscheinlich auch durch der IHC als Methode innewohnende technische Schwierigkeiten zustande. So ist die Färbeintensität der IHC nicht linear zur Menge an exprimiertem Protein und außerdem abhängig von der Behandlung des Gewebes. Auf der anderen Seite sind Genamplifikationen das Resultat eines komplexen Selektionsprozesses. Es ist gut möglich, dass amplifizierte Gene eine besonders wichtige Rolle für das Zellwachstum und das Überleben eines Tumors spielen und dadurch so etwas wie die „Achillesferse“ des Tumors, die einer möglichen Therapie zugänglich ist, darstellen.

Die Verfügbarkeit der klinischen Daten von 261 Mammakarzinom-Patientinnen, die eine adjuvante anti-ER Monotherapie mit Tamoxifen erhalten hatten, erlaubte die Untersuchung des Einflusses der ESR1-Amplifikation auf das Ansprechen auf eine antihormonelle Therapie. Trotz der relativ geringen Anzahl an Patientinnen in dieser Kohorte, der retrospektiven Form der Datensammlung und der unterschiedlich langen Dauer der Tamoxifengabe, war es möglich einen deutlichen Überlebensunterschied zwischen Patientinnen mit ESR1-amplifizierten und Patientinnen mit nicht-amplifizierten IHC-positiven Tumoren festzustellen. Bemerkenswert ist hierbei, dass diese Assoziation in einer multivarianten Analyse unabhängig von Differenzierungsgrad, Tumorstadium und Nodalstatus war. Zusammengefasst lassen diese Daten vermuten, dass die ESR1-Amplifikation eine Gruppe von ER-positiven Mammakarzinomen definiert, die besonders gut auf eine anti-ER Therapie mit Tamoxifen anspricht. Dieses Ergebnis konnte nicht unbedingt erwartet werden, da beispielsweise vom Prostatakarzinom ein völlig gegenläufiger Mechanismus bekannt ist. Hier tritt eine Amplifikation des Androgenrezeptors in unbehandelten Primärtumoren nicht auf. Allerdings entwickeln 20-30% aller Tumoren unter der anti-

hormonellen Therapie eine Amplifikation des Androgenrezeptors, die dann eine Resistenz gegenüber der Therapie bewirkt (Visakorpi et al. 1995; Koivisto et al. 1997; Bubendorf et al. 1999).

Das häufige Vorkommen der ESR1-Amplifikation in frühen und gut differenzierten Mammakarzinomen, zusammen mit der zentralen Rolle des ER für die Wachstumsregulation des Brustepithels lässt vermuten, dass die ESR1-Amplifikation eine frühe, wenn nicht sogar initialisierende Rolle für eine signifikante Gruppe der Mammakarzinome spielen könnte. Um die Rolle der ESR1-Amplifikation in prämaligen proliferativen Mamma-Läsionen zu untersuchen wurde ein TMA, der nicht-neoplastisches und präkanzeröses Gewebe enthielt, analysiert. Dabei zeigte sich, dass die ESR1-Amplifikation auch in dieser Gruppe von Mamma-Läsionen häufig und oft als „high level“-Amplifikation zu finden war. So wurde die ESR1-Amplifikation nicht nur in Carcinoma in situ (35%), sondern auch in Papillomen (36%) und in intraduktalen Hyperplasien (8%) gesehen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die ESR1-Amplifikation weniger ein Charakteristikum für ein invasives Mammakarzinom ist, als vielmehr den Hauptmechanismus für die Entstehung von verschiedenen Typen von Mamma-Erkrankungen darstellen könnte. Es ist schon früher vermutet worden, dass eine hohe ER-Expression in gutartigem und prämaligen Brustgewebe zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms führen kann (Khan et al. 1998; Shoker et al. 1999).

Da davon ausgegangen wird, dass Genamplifikationen ein nicht-reversibles Ereignis sind, lässt sich spekulieren, dass die Amplifikation des ESR1-Gens einen entscheidenden Mechanismus für die Initiation einer neoplastischen (klonalen) Brusterkrankung darstellen könnte. Deshalb scheint es möglich, dass die ESR1-Amplifikation bei proliferativen Mamma-Erkrankungen ein Indikator für ein erhöhtes Potential zu einer malignen Entartung ist. Wäre dies der Fall, so könnte die Untersuchung des ESR1-Amplifikationsstatus als ein prognostischer Marker bei Patientinnen mit duktalem Hyperplasien, Papillomen oder anderen proliferativen Brusterkrankungen dienen.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die ESR1-Amplifikation ein häufiges Ereignis ist, welches Mammaepithelzellen ermöglicht der natürlichen Wachstumskontrolle zu entkommen. Außerdem definiert die ESR1-Amplifikation eine Gruppe von nicht behandelten Primärtumoren, die maximal von einer anti-hormonellen Therapie profitieren.

Seit Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit im Jahr 2007 (Holst et al. 2007) haben mehrere Gruppen das Phänomen der ESR1-Amplifikation untersucht und sind zu teilweise deutlich abweichenden Ergebnissen gekommen. Die Gruppen konnten zwar die Existenz der ESR1-Amplifikation bestätigen, allerdings mit einer viel geringeren Prävalenz, als bei den von uns veröffentlichten Resultaten (Brown et al. 2008; Horlings et al. 2008; Vincent-Salomon et al. 2008; Reis-Filho et al. 2008). Diese Arbeitsgruppen haben ihre Experimente mit unterschiedlichen Methoden durchgeführt (qPCR, aCGH, FISH u.a.). Hierin ist wahrscheinlich die Ursache für die Abweichungen der Ergebnisse zu suchen. So ist es gut vorstellbar, dass es aufgrund von Heterogenität der Brustkrebszellen (bzw. durch „Kontamination mit Zellen aus normalen Brustgewebe“) zu einer Verdünnung der Tumorzellpopulation mit Genkopiezahlvermehrungen kommt, verursacht durch Zellen, die diese Genkopiezahlvermehrungen nicht aufweisen. Dies würde bei Verfahren wie der aCGH und der qPCR zu einer Verminderung der durchschnittlichen Genkopiezahl führen. Eine Arbeitsgruppe um Saori Tomita aus Japan hat die von uns publizierten Daten in einer kürzlich veröffentlichten Studie bestätigen können (Tomita et al. 2009). Sie bedienten sich, ebenso wie wir, der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung als Methode zur Detektion der ESR1-Amplifikation und fanden eine praktisch identische Amplifikationsrate, wenn die besonders kleinen Amplicons durch eine digitale 3D-Bildanalyse detektiert wurden. Ohne diese Bildanalyse berichten auch Tomita et al. von „nur“ 13,5% Amplifikationen. Diese Daten zeigen, dass der Nachweis der ESR1-Amplifikation sowohl mit FISH, als auch mit anderen Methoden nicht einfach ist. Weitere Untersuchungen, möglicherweise mit optimierten FISH-Sonden, sind nötig um die klinische Relevanz und Häufigkeit der ESR1-Amplifikation abschließend beurteilen zu können.

5. Zusammenfassung

Der Mechanismus der Genamplifikation spielt eine große Rolle bei der Onkogenaktivierung. Ziel der Studie, in die diese Arbeit eingebettet war, war es nach Genamplifikationen zu suchen, die eine klinische Relevanz beim Mammakarzinom aufweisen. Methodisch wurde hierfür ein drei Schritte umfassender Ansatz gewählt. In einem ersten Schritt wurden 30 ausgewählte Mammakarzinome (high grade, G3) mittels DNA-Chipanalyse auf Genkopiezahlveränderungen untersucht. In einem zweiten Schritt wurden die Daten dieser Analyse nach kleinen Amplicons potentiell relevanter Gengruppen durchsucht. Mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung sollten identifizierte Amplifikationen validiert werden. Um deren mögliche klinische Bedeutung erkennen zu können, wurde mit Tissue Microarrays (TMA) gearbeitet, die es erlauben, ein großes Gewebekollektiv in relativ kurzer Zeit zu untersuchen. In dieser Arbeit bestand das Gewebekollektiv aus einigen gutartigen und präkanzerösen Mammaläsionen und über 2000 Mammakarzinomen mit zugehörigen Follow-up-Daten. Bei zwei, der in der Chip-Analyse untersuchten Tumoren, wurden Amplicons, die das für den Östrogenrezeptor kodierende Gen (ESR1) enthielten, identifiziert. Die Untersuchung an den TMAs mit einer selbst hergestellten genspezifischen Sonde (6q25.1, BAC RP11-450E24) zeigte in 20,6% der Fälle eine Amplifikation ($\text{Ratio ESR1/Zen6} \geq 2,0$) für das ESR1-Gen, in weiteren 15% der Fälle zeigten sich „Gains“ ($\text{Ratio ESR1/Zen6} > 1,0$, aber $< 2,0$) für ESR1. Sowohl die ESR1-Amplifikation, als auch die Gains waren deutlich mit einer hohen Östrogenrezeptor-Protein Expression (7-8 nach Allred) und einem hohen Differenzierungsgrad (G1) der Tumoren assoziiert ($p < 0,0001$). In einer Gruppe von 261 Patientinnen, die eine Tamoxifen-Monotherapie erhalten hatten, zeigte sich ein signifikant längeres Überleben für die Tumorpatientinnen mit ESR1-Amplifikation im Vergleich zu den Patientinnen, die zwar eine ER-Expression aufwiesen, aber keine ESR1-Amplifikation zeigten. Diese Korrelation war unabhängig vom pathologischen Grading, vom Tumorstadium und vom Nodalstatus der Tumoren. Erstaunlicherweise wurde die ESR1-Amplifikation auch in gutartigen und präkanzerösen Läsionen des Mammagewebes gefunden. Hierzu gehörten Hyperplasien, Papillome, DCIS und LCIS. Diese Arbeit identifiziert das ESR1-Gen als das am häufigsten (bisher bekannte) amplifizierte Gen beim Mammakarzinom. Darüber hinaus ist die Amplifikation auch schon in gutartigem und prämaligmem Mammagewebe zu sehen. Desweiteren definiert sie eine Gruppe von Patientinnen, die maximal von einer anti-hormonellen Therapie profitieren.

6. Literatur

- Al-Kuraya, K., et al. (2004). "Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer." Cancer Res 64(23): 8534-40.
- Albanell, J. and Baselga, J. (1999). "Trastuzumab, a humanized anti-HER2 monoclonal antibody, for the treatment of breast cancer." Drugs Today (Barc) 35(12): 931-46.
- Allred, D. C. and Swanson, P. E. (2000). "Testing for erbB-2 by immunohistochemistry in breast cancer." Am J Clin Pathol 113(2): 171-5.
- Allred, D. C., Mohsin, S. K., Fuqua, S. A. (2001). "Histological and biological evolution of human premalignant breast disease." Endocr Relat Cancer 8(1): 47-61.
- Andersen, J. and Poulsen, H. S. (1989). "Immunohistochemical estrogen receptor determination in paraffin-embedded tissue. Prediction of response to hormonal treatment in advanced breast cancer." Cancer 64(9): 1901-8.
- Anzick, S. L., et al. (1997). "AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer." Science 277(5328): 965-8.
- Bentz, M., et al. (1998). "Minimal sizes of deletions detected by comparative genomic hybridization." Genes Chromosomes Cancer 21(2): 172-5.
- Brown, L.A., et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" Nat Genet 40(7): 806-7; author reply 810-2.
- Bubendorf, L., et al. (1999). "Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays." Cancer Res 59(4): 803-6.
- Butturini, A. and Gale, R. P. (1990). "Oncogenes and leukemia." Leukemia 4(2): 138-60.
- Cappuzzo, F., et al. (2005). "Increased HER2 gene copy number is associated with response to gefitinib therapy in epidermal growth factor receptor-positive non-small-cell lung cancer patients." J Clin Oncol 23(22): 5007-18.
- Cho, K. R. and Vogelstein, B. (1992). "Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence." Cancer 70(6 Suppl): 1727-31.
- Cornolti G., et al. (2007). "Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland." Arch Otolaryngol Head Neck Surg 133(10):1031-6.
- Cowley, S. M. and Parker, M. G. (1999). "A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta." J Steroid Biochem Mol Biol 69(1-6): 165-75.
- Crone, S. A., et al. (2002). "ErbB2 is essential in the prevention of dilated cardiomyopathy." Nat Med 8(5): 459-65.
- du Manoir, S., et al. (1995). "Quantitative analysis of comparative genomic hybridization." Cytometry 19(1): 27-41.

Elston, C. W. and Ellis, I. O. (1991). "Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up." Histopathology 19(5): 403-10.

Ferlay, J., Bray, F., Pisani, P., Parkin, D. M. (2000). GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Lyon, IARCPress.

Garratt, A. N., Ozcelik, C., Birchmeier, C. (2003). "ErbB2 pathways in heart and neural diseases." Trends Cardiovasc Med 13(2): 80-6.

Gentleman, R. C., et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol 5, R80 (2004).

Giordano, A. and Kaiser, H. E. (1996). "The retinoblastoma gene: its role in cell cycle and cancer." In Vivo 10(2): 223-7.

Goyette, M. C., et al. (1992). "Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer." Mol Cell Biol 12(3): 1387-95.

Harvey, J. M., Clark, G. M., Osborne, C. K., Allred, D. C. (1999). "Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer." J Clin Oncol 17(5): 1474-81.

Hollstein, M., et al. (1991). "p53 mutations in human cancers." Science 253(5015): 49-53.

Holst, F., et al. (2007). "Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer." Nat Genet 39(5): 655-60.

Horlings, H. M., et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" Nat Genet 40(7): 807-8; author reply 810-2.

Jarvinen, T. A., et al. (2000). "Amplification and deletion of topoisomerase IIalpha associate with ErbB-2 amplification and affect sensitivity to topoisomerase II inhibitor doxorubicin in breast cancer." Am J Pathol 156(3): 839-47.

Kallioniemi, A., et al. (1992). "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." Science 258(5083): 818-21.

Kallioniemi, O. P., et al. (1994). "Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors." Genes Chromosomes Cancer 10(4): 231-43.

Khan, S. A., et al. (1998). "Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk." J Natl Cancer Inst 90(1): 37-42.

Knudsen, E. S. and Knudsen, K. E. (2006). "Retinoblastoma tumor suppressor: where cancer meets the cell cycle." Exp Biol Med (Maywood) 231(7): 1271-81.

Koivisto, P., et al. (1997). "Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer." Cancer Res 57(2): 314-9.

- Kramer, M. H., et al. (1998). "Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma." Blood 92(9): 3152-62.
- Li, C. and Wong, W. H. (2001). "Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection." Proc Natl Acad Sci USA 98, 31-6.
- Mass, R. D., et al. (2005). "Evaluation of clinical outcomes according to HER2 detection by fluorescence in situ hybridization in women with metastatic breast cancer treated with trastuzumab." Clin Breast Cancer 6(3): 240-6.
- Mayr, D., et al. (2006). "Analysis of gene amplification and prognostic markers in ovarian cancer using comparative genomic hybridization for microarrays and immunohistochemical analysis for tissue microarrays." Am J Clin Pathol 126(1):101-9.
- Mischel, P. S., et al. (2003). "Identification of molecular subtypes of glioblastoma by gene expression profiling." Oncogene 22(15): 2361-73.
- Nembrot, M., Quintana, B., Mordoh, J. (1990). "Estrogen receptor gene amplification is found in some estrogen receptor-positive human breast tumors." Biochem Biophys Res Commun 166(2): 601-7.
- Nessling, M., et al. (2005). "Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue." Cancer Res 65(2): 439-47.
- Omoto, Y., Eguchi, H., Yamamoto-Yamaguchi, Y., Hayashi, S. (2003). "Estrogen receptor (ER) beta1 and ERbeta2/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF7." Oncogene 22(32): 5011-20.
- Parker, M. G., et al. (1993). "Structure and function of the estrogen receptor." Ann N Y Acad Sci 684: 119-26.
- Pauletti, G., Godolphin, W., Press, M. F., Slamon, D. J. (1996). "Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization." Oncogene 13(1): 63-72.
- Pegram, M. D., et al. (1998). "Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment." J Clin Oncol 16(8): 2659-71.
- Pegram, M. and Slamon, D. (2000). "Biological rationale for HER2/neu (c-erbB2) as a target for monoclonal antibody therapy." Semin Oncol 27(5 Suppl 9): 13-9.
- Pellegrini, C., et al. (2003). "HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry." Clin Cancer Res 9(10 Pt 1): 3645-52.
- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, (2005).
- Reis-Filho, J. S., et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" Nat Genet 40(7): 809-10; author reply 810-2.
- Risio, M., et al. (2003). "HER2 testing in gastric cancer: molecular morphology and storage time-related changes in archival samples." Int J Oncol 23(5): 1381-7.

- Rubin, I. and Yarden, Y. (2001). "The basic biology of HER2." Ann Oncol 12 Suppl 1: S3-8.
- Ruiz, C., et al. (2006). "Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer." Int J Cancer 118(9): 2190-4.
- Shinojima, N., et al. (2003). "Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme." Cancer Res 63(20): 6962-70.
- Shoker, B. S., et al. (1999). "Oestrogen receptor expression in the normal and pre-cancerous breast." J Pathol 188(3): 237-44.
- Simpson, J. F., et al. (1997). "Amplification of CCND1 and expression of its protein product, cyclin D1, in ductal carcinoma in situ of the breast." Am J Pathol 151(1): 161-8.
- Slamon, D. J., et al. (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science 235(4785): 177-82.
- Stierer, M., et al. (1993). "Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. Correlation of histopathology and prognostic factors." Ann Surg 218(1): 13-21.
- Sunderland, M. C. and Osborne, C. K. (1991). "Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: a review." J Clin Oncol 9(7): 1283-97.
- Taylor, R., Heard G., Boyages, J. (2001). "Estimating a woman's risk of breast cancer: The effects of age and family history." N S W Public Health Bull 12(2): 36-40.
- Tomita, S., et al. (2009). "Estrogen receptor α gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients." Cancer Sci 100(6): 1012-17.
- Venkatraman, E.S. and Olshen, A. (2004). "DNAcopy: DNA copy number data analysis. R package version 1.4.0."
- Vincent-Salomon, A., et al. (2008). "ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon?" Nat Genet 40(7): 809; author reply 810-2.
- Visakorpi, T., et al. (1995). "In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer." Nat Genet 9(4): 401-6.
- Visscher, D. W., et al. (1997). "Evaluation of MYC and chromosome 8 copy number in breast carcinoma by interphase cytogenetics." Genes Chromosomes Cancer 18(1): 1-7.
- Wolmark, N. and Dunn, B. K. (2001). "The role of tamoxifen in breast cancer prevention: issues sparked by the NSABP Breast Cancer Prevention Trial (P-1)." Ann N Y Acad Sci 949: 99-108.
- Yarden, Y. (2001). "Biology of HER2 and its importance in breast cancer." Oncology 61 Suppl 2: 1-13.

7. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Guido Sauter, PD Dr. rer. nat. Ronald Simon und Dipl. Biol. Frederik Holst für die exzellente Betreuung während meiner Doktorarbeit. Sowohl was die Anleitung der praktischen Arbeit im Labor und das Erlernen von Methoden anbelangt, als auch bezüglich der Vermittlung des theoretischen Hintergrunds und der Anregung von eigenen Denkansätzen fand ich hier ein tolles Arbeitsumfeld vor.

Danken möchte ich auch Frau Silvia Schnöger für ihre Hilfe und die gute Zusammenarbeit im FISH-Labor und Frau Marlies Sachs für ihre Unterstützung bei jeglicher Fragestellung im Laboralltag.

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern.

9. 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 oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: