

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Pathologie: Molekularpathologie

Direktor: Professor Dr. med. Guido Sauter

**Feinkartierung des Östrogen-Rezeptor alpha (ESR1) -Amplicons  
beim Mammakarzinom**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Marc Wendland  
aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 23.09.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Rune

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Rolle von Amplifikationen für die Genetik des Mammakarzinom .....	5
1.1.1	HER2 Amplifikation .....	6
1.1.2	ER Expression und ESR1 Amplifikation .....	7
1.2	Entstehung von Genamplifikationen .....	9
1.2.1	Breakage-Fusion-Bridge Modell .....	11
1.2.2	Onion-Skin .....	13
1.3	Nachweis von Genamplifikationen .....	14
1.4	Ziel dieser Arbeit .....	16
2	Materialien und Methoden .....	17
2.1	Gewebe .....	17
2.2	TMA Herstellung .....	18
2.3	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) .....	19
2.3.1	BAC-Kultivierung .....	20
2.3.2	DNA-Extraktion .....	22
2.3.3	DNA-Markierung mittels Nick-Translation .....	23
2.3.4	Verwendete Materialien .....	23
2.3.5	Laborprotokoll: DNA-Markierung mittels Nick-Translation .....	24
2.4	Hybridisierung .....	24
2.4.1	Verwendete Materialien und Reagenzien .....	24
2.4.2	Detektion ( Fluoreszenzmarkierung) .....	26
2.4.3	Auswertung .....	26
3	Ergebnisse .....	27
3.1	Häufigkeit von ESR1 Veränderungen am Amplifikations-Test-TMA .....	27
3.2	Kartierung des ESR1-Amplicons .....	27
3.2.1	Auswertbarkeit und Reproduzierbarkeit .....	27
3.2.2	Ausdehnung des 6q25Amplikons .....	29
3.2.3	ESR1 Kopiezahl in Kontrollgeweben .....	33
4	Diskussion .....	34
5	Zusammenfassung .....	38
6	Literatur .....	39
7	Danksagung .....	43
8	Eidesstattliche Versicherung .....	44

# 1 Einleitung

Brustkrebs stellt mit mehr als 350.000 Todesfällen weltweit nach wie vor die bei Frauen am häufigsten zum Tode führende maligne Tumorerkrankung dar (1) . Durchschnittlich erkrankt etwa jede zehnte Frau in der BRD im Laufe ihres Lebens. Laut dem Bundesministerium für Gesundheit entfallen 27,8 % aller Krebserkrankungen bei Frauen auf Brustkrebs und führen allein in Deutschland zu 57.000 Neuerkrankungen jährlich. Insbesondere in den industrialisierten Ländern zeigt sich eine weiterhin steigende Inzidenz des Mammakarzinoms (2). Durch stetige Verbesserungen der Diagnostik, insbesondere durch Einführung von Vorsorgeprogrammen wie der Mammografie, wird Brustkrebs häufig bereits in frühen Stadien entdeckt. Dementsprechend hat sich auch die Prognose für die Erkrankung generell verbessert. Die Therapie von Brustkrebs stützt sich dabei auf drei Säulen: Die Operation, die Bestrahlung und Behandlung mit Medikamenten, z.B. Chemotherapie, Hormontherapie und neuerdings auch die sogenannte „genspezifische“ Therapie. Die genspezifische Therapie beruht auf der Annahme, dass Tumoren durch bestimmte genetische Defekte angreifbar werden. So stellen insbesondere solche Proteine, die vor allem im Tumor, aber nicht oder nur gering im normalen Gewebe exprimiert werden, optimale Ziele für einen „molekularen Angriff“ dar. Daher ist innerhalb des letzten Jahrzehnts die Suche nach neuen Markerproteinen für die Tumorthherapie (3, 4) zu einer zentrale Aufgabe der Tumorforschung geworden.

## ***1.1 Rolle von Amplifikationen für die Genetik des Mammakarzinom***

Brustkrebs ist wie alle Tumorarten eine Erkrankung, die auf Mutationen und Deregulierung von bestimmten Genen zurückgeht. Zumindest für einige Gene konnte ein Zusammenhang mit der Entstehung und Progression des Mammakarzinoms nachgewiesen werden, z.B. Mutationen des Tumorsuppressorgenes p53 (5), Amplifikationen des HER2 Genes (6) (7), Überexpression des Östrogen- und Progesteron-Rezeptors (8), oder der Inaktivierung des Zellzyklus-Kontrollgenes p16 (9). Vor allem die HER2-Amplifikation ist von immenser klinischer Bedeutung für die Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms (10). Hierbei handelt es sich um eine unnatürliche Vermehrung der Genkopiezahl, die zu einer massiven Überexpression des Her2 Proteins führt. In neueren Studien, die mit Hilfe der sogenannten „Genchips“ umfassende Expressionsprofile von Mammakarzinomen erstellten, konnte gezeigt werden, dass HER2 amplifizierte und überexprimierende Mammakarzinome eine distinkte genetische Subgruppe des Brustkrebses darstellen (11). Neben diesem sogenannten Her2-Typus werden Mammakarzinome

genetisch anhand der Überexpression des Östrogen/Progesteron-Rezeptor (luminaler Typus) charakterisiert. Eine weitere Gruppe der Mammakarzinome umfasst den sog. basal-like Typus, der in der Regel weder HER2 noch Estrogen/Progesteron Expression zeigt (12) und daher auch als „Triple-negativ“ bezeichnet wird (13) (14).

### **1.1.1 HER2 Amplifikation**

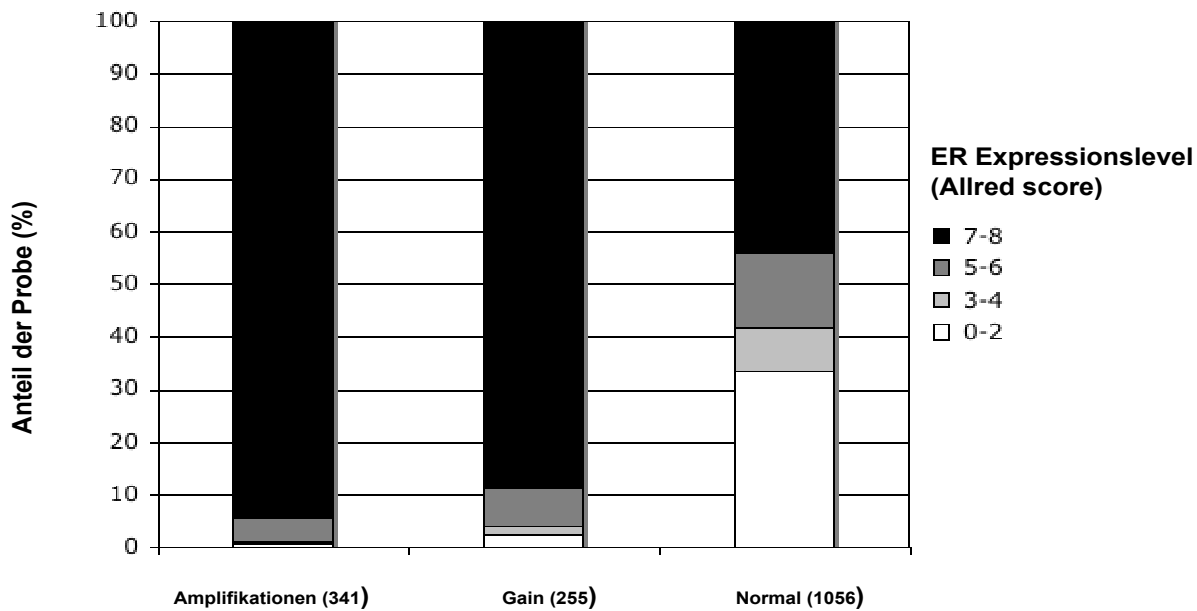
HER2 (Human epidermal growth factor receptor-2) gehört zu einer Familie von vier Transmembranrezeptoren, die in Signaltransduktionskaskaden involviert sind, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung regulieren. HER2 wird in vielen verschiedenen Zell- und Gewebetypen exprimiert. Der Rezeptor besteht aus einer Cystein- reichen extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einem lipophilen transmembranen Segment und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase-Domäne. Generell formen die Rezeptoren der HER-Familie nach Ligandenbindung Dimere und über die Aktivierung der Tyrosin-Kinase erfolgt die Signaltransduktion zum Zellkern. Dieses führt zur Genaktivierung und Zellteilung. Der Her2 Rezeptor bildet hier eine Ausnahme, da offensichtlich kein HER2-spezifischer, aktivierender Ligand existiert bzw. identifiziert werden konnte. HER2 wird daher entweder durch Homodimerisierung autokatalytisch aktiviert, oder durch Heterodimerisierung mit HER1, HER3, oder HER4 (15). Charakteristisches Merkmal des aus Basalzellen hervorgehenden HER2-Subtyps ist eine massive Her2- Überexpression (12), die durch eine Amplifikation des Her2 Genes verursacht wird. Durch die hohe Proteindichte des Rezeptors auf der Zelloberfläche, die aufgrund der Genamplifikation erreicht wird, wird der HER2-Signalweg somit permanent autokatalytisch aktiviert. Die Amplifikation resultiert meist in einem deutlich verlängerten Chromosom, da ein bis zu mehrere Millionen Basenpaare (Megabasen) großer Bereich bis zu 100-fach kopiert und aneinandergereicht wird, der entsprechend viele HER2 Genkopiezahlen enthält (16). All diese Genkopien werden abgelesen und in Proteine translatiert, das wiederum führt zur erneuten Aktivierung des HER2 Signalweges. Die permanente Aktivierung des Signalweges durch die HER2-Genamplifikation verursacht schließlich überproportionales und unkontrolliertes (Tumor-) Wachstum. Am Beispiel von HER2 lässt sich sehr schön 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 Mamma-Karzinomen (17). Da der HER2 Rezeptor in gesunden Geweben (mit einer Ausnahme) nicht exprimiert wird, gilt die Therapie mit Herceptin als ausgesprochen nebenwirkungsarm. Die Ausnahme ist eine physiologische Expression im Herzmuskel, die erklärt, warum in seltenen Fällen Kardiomyopathien auftreten können, die dann den Abbruch der Therapie erfordern (19). Amplifikationen/Überexpressionen

von HER2 sind nicht spezifisch für Mammatumoren, sondern werden häufig auch z.B. in Tumoren der Harnblase (20), der Gallenwege (21) und des Ösophagus (22) gefunden. Klinische Studien zur Wirksamkeit einer Anti-HER2 Therapie werden zur Zeit daher auch in diesen Tumortypen unternommen.

### **1.1.2 ER Expression und ESR1 Amplifikation**

Der Östrogenrezeptor alpha (ER) ist ein nuklearer Rezeptor für das Hormon Östrogen. Er wird in einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben exprimiert, in cerebralen Geweben (23) (24) in der Vagina (25), Hepatozyten (26), Uterus (27) und Endometrium (28), verschiedenen Knochengeweben (29), Ovar (29) und Pancreaszellen (28). Eine wachstumsstimulierende Wirkung des Östrogens ist in der Mamma, dem Endometrium und Ovar bekannt. Dagegen spielt beispielsweise der ER alpha im Gehirn nicht nur eine wichtige Rolle in der Koordination von neuroendokrinen Ereignissen, sondern hat auch Einfluss auf Lernprozesse und das emotionale Verhalten (23).

Eine besondere klinische Bedeutung kommt dem ER beim Mammakarzinom zu. Etwa 2/3 aller Brustkrebsfälle zeigen bei der Diagnose eine starke Expression des ER (30). Nach der ER Expression und dem Ursprungsgewebe wurde ein eigener Typus des Mamma-Ca benannt, nämlich der sog. Luminal-B Typus des Mamma-Ca. ER wird durch das ESR1-Gen kodiert. Aufgrund der häufigen Expression im Mammakarzinom gilt der ER heute als das wichtigste Therapieziel dieses Tumortypes. So sind eine Vielzahl von Medikamenten erhältlich, die direkt oder indirekt auf den ER (Östrogenrezeptor) wirken und mit großem Erfolg für die Therapie des Mamma-Ca eingesetzt werden. Je nach Angriffsort werden hierbei drei Stoffklassen unterschieden: Die sog. SERM's (Selektive ER Modulatoren), die direkt am ER angreifen und die Bindungsstelle für Östrogen blockieren (z.B. Tamoxifen, Raloxifen), SERD's (Selektive ER Destabilisatoren), welche das Expressionsniveau des ER herabregulieren und zugleich bestehende Rezeptorproteine destabilisieren, sowie die sogenannten Aromatase-Inhibitoren, welche indirekt wirken indem sie die Östrogen-Synthese hemmen (z.B. Anastrozole und Exemestan). Solche anti-ER-Therapien führen bei 30-50% aller Patienten zu einer signifikanten Abnahme des Tumorwachstums (31). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Gen ESR1 welches für den Östrogenrezeptor kodiert, in bis zu 20% der Mammakarzinome amplifiziert vorliegt (32) (33) (34). Wie beim HER2 führt auch die ESR1 Amplifikation praktisch immer zu einer massiven Überexpression des Proteins. Der entscheidende Unterschied zum HER2 liegt allerdings darin, dass die Amplifikation nur eine Ursache für die Überexpression darstellt, da immerhin etwa die Hälfte der Tumoren ohne ESR1 Amplifikation ebenfalls eine starke Überexpression des ER zeigten (Abb. 1).



### Anzahl der ESR1 Kopien

Abb. 1: Relation der ESR 1 Amplifikation zur Östrogen-Überexpression (Abb. erstellt nach Daten aus Tabelle 3 von Holst et al. (33)).

Die bisherigen Daten lassen weiterhin vermuten, dass sich die ESR1-Amplifikation auch strukturell von der HER2 Amplifikation unterscheidet. Während das HER2 Amplikon in der FISH-Analyse in der Regel als eine ausgedehnte „Wolke“ von weit über 20 Gensignalen erscheint (Abb. 2), ist das ESR1 Amplikon meist durch nur weniger als zehn eng beieinander liegende Gensignale charakterisiert, die oft nur sehr schwer zu zählen sind (Abb. 3).

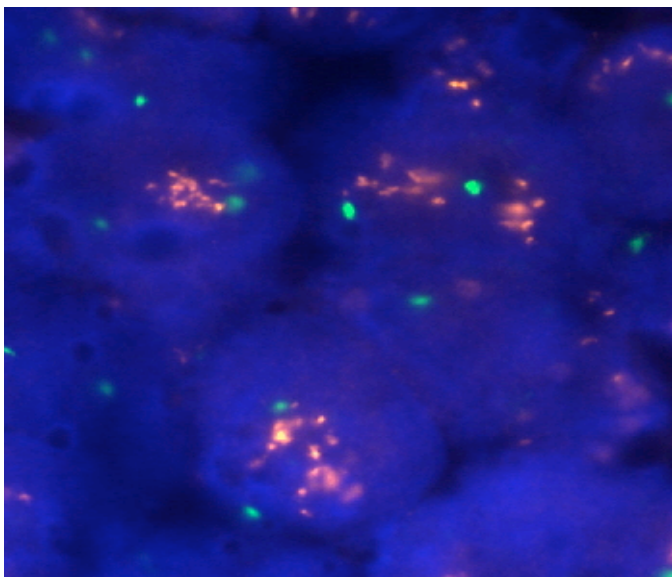


Abb. 2: Typisches Bild einer HER2 Amplifikation in der FISH-Analyse. Die Amplifikation erscheint als eine große Wolke von meist mehr als 20 roten HER2-Gensignalen. Die grünen Signale zeigen die Kopiezahl des Centromer 7.



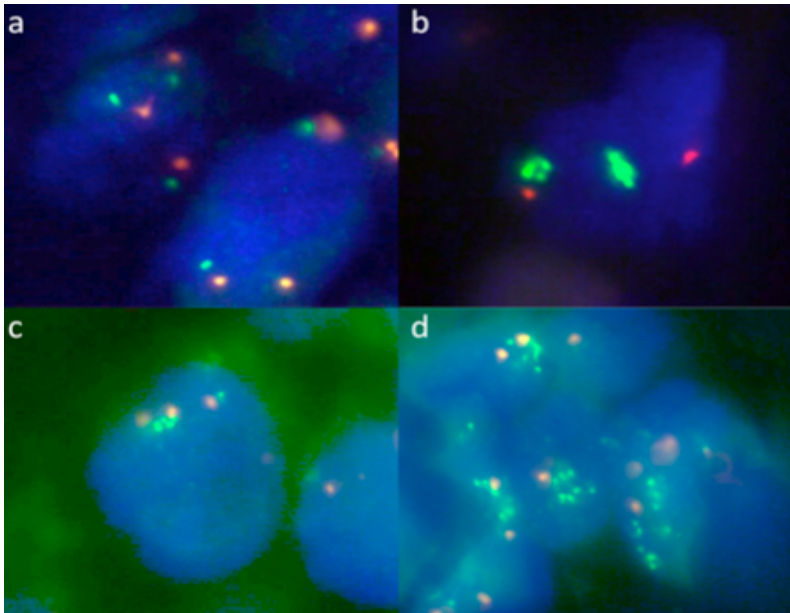


Abb. 3: Typische Bilder einer ESR1 FISH-Analyse. a) normales Mammaepithel mit zwei ESR1-Kopien (grüne Signale) und zwei Centromer 6-Signalen (rote Signale) b) kleine konfluente Gencluster mit ca. 3-5 ESR1 Kopien c) kleine Gencluster mit fünf gut unterscheidbaren Signalen und d) große Cluster mit 8-10 ESR1 Kopien.

Zudem ist die HER2 Amplifikation mit genetisch instabilen, entdifferenzierten Tumoren im fortgeschrittenen Stadium assoziiert, während ESR1 amplifizierte Tumoren in der Regel frühe und gut differenzierte, genetisch stabile Karzinome sind (33). Es ist daher denkbar, dass diese Besonderheiten des ESR1 Amplikons einem anderen Entstehungsmechanismus zugrunde liegen könnten.

## **1.2 Entstehung von Genamplifikationen**

Amplifikationen sind Vermehrungen von Abschnitten chromosomaler DNA, deren Ausdehnung auf einzelne Gene beschränkt sein kann, aber auch mehrere Megabasen mit Dutzenden von Genen betragen kann. Bei Säugetieren sind Amplifikationen ausschließlich bei Tumorzellen beobachtet worden und gelten daher als Ausdruck von massiven Störungen der Kontrolle der genetischen Integrität. Im Gegensatz dazu sind Amplifikationen von Bakterien, Protozoen und sogar Insekten bekannt, die darauf hinweisen, dass die Amplifikation nicht zwingend ein pathologischer, deregulierter Prozess ist, sondern vielmehr

ein gezielter Mechanismus zur Steigerung der Expressionsrate, die physiologisch auftreten und zu einem koordinierten Entwicklungsprogramm beitragen.

Die grundlegenden Mechanismen der **physiologischen** Amplifikation basieren auf der normalen DNA-Replikation. Amplifikationen resultieren aus wiederholten DNA-Replikation mittels Aktivierung einzelner, initiiender Zonen sowie durch Einzelstrangbildung, was dann die Produktion von Amplicons ermöglicht. Besonders ist dabei, dass nicht wie bei einem normalen Zellzyklus üblich, in der S-Phase alle Anteile des Genoms gleichermaßen, sondern nur vermehrt speziell die Amplicons repliziert werden. Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* z.B. konnten mit Hilfe von Microarray Studien natürliche Amplicons nachgewiesen werden. Diese Amplicons werden während der Kokon und Eizellproduktionsphase benötigt und sollen den nur in dieser Phase stark erhöhten Proteinbedarf decken (35). Die Studien an den Fliegenarten lieferten wichtige Erkenntnisse in Bezug auf Mechanismen, regulierende Einheiten und Replikationen die zu Amplifikationen führen können. Eine wichtige Erkenntnis dabei war, dass bei der *Drosophila* die Eientwicklung in den Ovarien von über einen regulären Zellzyklus und dann erst über eine sich anschließende Amplifikation abläuft, also die Phase in der die Zellproliferation am höchsten ist. Bei *Tetrahymena thermophila*, eine Spezies der Protozoen, die sowohl zytologisch als auch genetisch untersucht wurden und als modellhafter Organismus für eukaryotische DNA-Replikation und Amplifikation angesehen wird, stellte sich heraus, dass eine einzigen Zelle zwei Nuclei besitzt und somit zwei verschiedene Zell-Zyklus kontrollierte Replikationen und lokal spezifische Amplifikationen aufweist. Dadurch können Teile des Chromosomens während einer einzigen S-Phase einige tausend Mal amplifiziert werden (36).

Der genaue Mechanismus, wie Amplifikationen in Tumorzellen entstehen ist nicht bekannt. Allerdings haben sich zwei bedeutende, nicht exklusive Theorien zur Erklärung von Amplifikationen etabliert, nämlich das Breakage-Fusion-Bridge Modell und das Onion-Skin Modell, die im Folgenden detailliert beschrieben werden.

### 1.2.1 Breakage-Fusion-Bridge Modell

Das Breakage-Fusion-Bridge Modell führt immer zu intrachromosomalen Amplifikationen, d.h. zu einer linearen Aneinanderreihung identischer DNA-Abschnitte innerhalb eines Chromosoms. Das betroffene Chromosom wird dabei verlängert (37). In klassischen zytogenetischen Metaphase-Chromosomenpräparationen erscheint der amplifizierte Bereich als eine vergrößerte, gleichmässig angefärbte Chromosomenbande. Daher wurden diese Bereiche als (engl.) „Homogenous staining regions (HSR) bezeichnet (Abb. 4a).

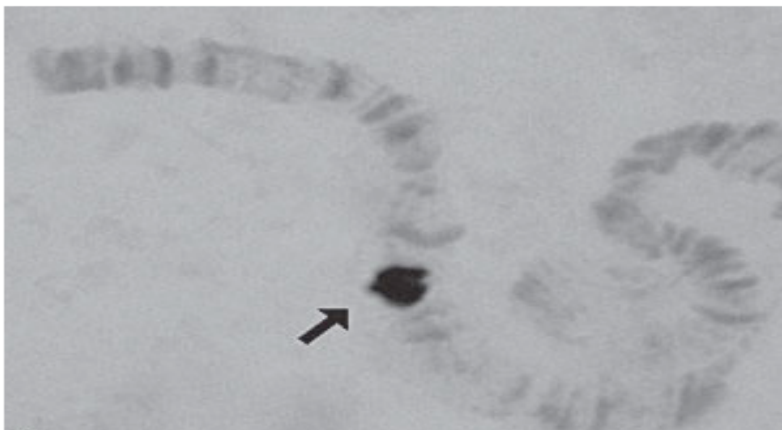


Abb. 4a: Homogenous staining regions (HSR)

Nach dem Breakage-Fusion-Bridge Modell entstehen diese HSR's auf der molekularen Ebene als Folge einer fehlerhaften Reparatur von Chromosomenbrüchen (37). Wird das Genom repliziert, bilden sich DNA-Brücken zwischen den Tochterchromatiden an den freien Bruchstellen des Chromosoms. Bei der Zellteilung werden die Chromatiden vom Spindelapparat in die Tochterzellen gezogen. Dabei kommt es zum Zerreißen der verbundenen Chromatiden. Der Bruchpunkt ist vermutlich eher zufällig. Es wird also ein Stück DNA des einen Tochterchromatids mit in die andere Zelle gezogen und ist dort zuviel vorhanden (Abb. 4b). Dieser Vorgang wiederholt sich bei jedem Zellzyklus, so dass sich eine Vielzahl von Kopien eines DNA-Abschnittes ansammeln.

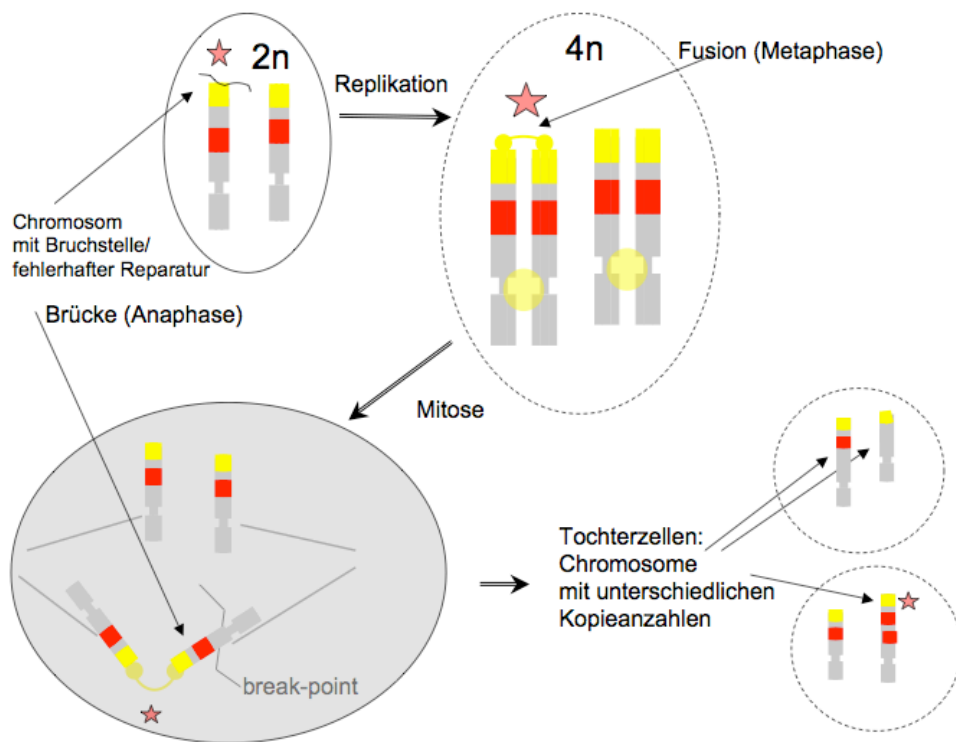


Abb. 4b: Schematische Darstellung der Genamplifikation durch das Breakage-Fusion-Bridge Modell. Als rot dargestellt sind amplifizierte chromosomale Abschnitte, als gelb dargestellt die telomerischen Regionen.

## 1.2.2 Onion-Skin

Das Onion-Skin (engl. Zwiebelhaut) Modell erklärt die Entstehung sowohl von intra- als auch extrachromosomalen Amplifikationen. Im Gegensatz zu intrachromosomalen Amplifikationen wird der amplifizierte Chromosomenabschnitt vom Ursprungschromosom abgetrennt und liegt frei im Zellkern vor. Nach ihrer Form wurden die amplifizierten Bereiche in der klassischen Zytogenetik als (engl.) „double minutes“ (doppelte Kommas) bezeichnet (38). Da diese Bereiche einen eigenen Replikationsursprung besitzen, können sie sich eigenständig replizieren. Da sie jedoch in der Regel kein Zentromer besitzen, werden sie bei der Zellteilung nicht gleichmäßig, sondern in zufälliger Zahl auf die Tochterzellen verteilt (Abb. 5)

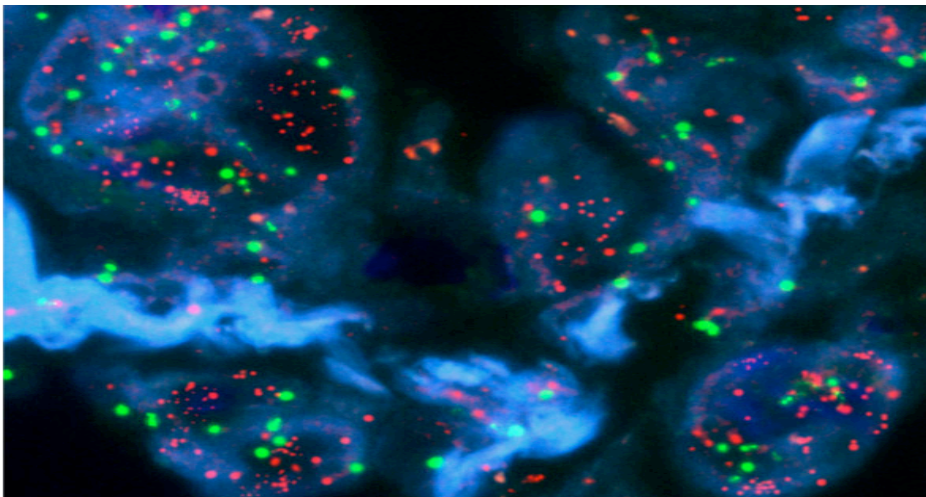


Abb. 5: extrachromosomale Amplifikationen (Quelle: University of Colorado Health Sciences Center, Cancer Center, Aurora, CO, USA)

Das Onion Skin Modell besagt, dass die Amplifikation aufgrund einer fehlerhaften Replikationsgabel entsteht. Die zweiseitige Replikationsgabel mit seiner typischen Struktur ist in Abb. 6 beschrieben.

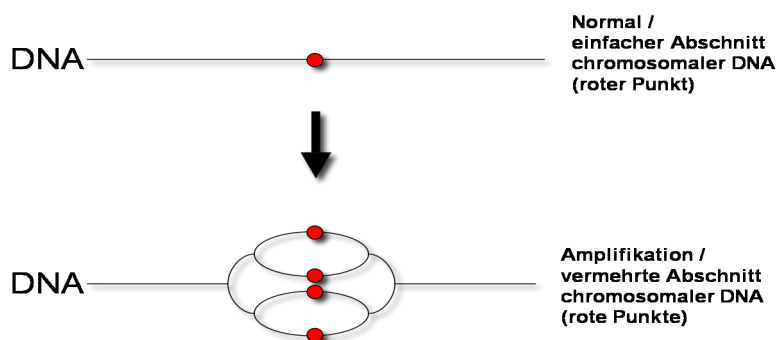


Abb. 6: Onion Skin Model

### 1.3 Nachweis von Genamplifikationen

Die erste Technik mit der in einem Ansatz Genkopiezahlveränderungen des gesamten Genoms eines Individuums analysiert werden konnten war die „**comparative genomic hybridization**“ (CGH), die 1992 von Kallioniemi et al. vorgestellt wurde. 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 Farbmarkierung 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.

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

Den größten Nachteil der konventionellen CGH stellt allerdings auch das limitierte Auflösungsvermögen dar. DNA-Veränderungen, die kleiner als 5-10 MB sind, können nicht detektiert werden (39) (40) .

Mit der Entwicklung der sogenannten **Array-CGH (aCGH)** wurde die Auflösung von CGH Analysen dramatisch verbessert. Die aCGH bedient sich des Prinzips der konventionellen CGH, wobei allerdings die Metaphase-Chromosomen durch geklonte DNA-Fragmente ersetzt werden, die in einem Koordinatensystem (Array) auf Objektträger aufgebracht werden. Die Auflösung der aCGH orientiert sich an der Grösse der klonierten Fragmente, so dass DNA-Veränderungen bis zu 100-200 Kilobasen (Kb) Ausdehnung detektiert werden können. Die modernste Weiterentwicklung der CGH Technik sind sogenannte Oligonucleotid-Arrays (Gene Chips), die sich durch ein noch höheres Auflösungsvermögen auszeichnen (ca. 40 Kb). Sie haben sich in den letzten 1-2 Jahren bis zur Marktreife entwickelt und ermöglichen die kombinierte Analyse von DNA-Kopiezahl und RNA-Expressionsniveau von praktisch allen humanen Genen aus derselben Gewebeprobe.

Die sensitivste Methode zur Bestimmung der Genkopiezahl ist die **Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)**. Im Gegensatz zur CGH und aCGH kann mit der FISH kein unbekanntes Amplikon entdeckt werden. Für die FISH Analyse muss eine DNA-Sonde mit bekannter DNA Sequenz hergestellt werden, die spezifisch für ein Gen ausgewählt wird.

Die FISH Analyse kann in-situ, d.h. direkt im histologischen Schnittpräparat durchgeführt werden. Die Genkopiezahl wird so in jedem Zellkern einzeln bestimmt. Eine eventuelle Heterogenität der Kopiezahl in verschiedenen Tumorzellen, oder die Anwesenheit von normalen Zellen (z.B. Lymphozyten oder Fibroblasten) wird daher sicher erkannt. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber der CGH oder aCGH, die mit isolierter DNA arbeiten. Schon ein geringer Prozentsatz an kontaminierten normalen Zellen im Tumorgewebe kann bei diesen Methoden zu einer Verfälschung der Kopiezahlbestimmung führen.

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Bisher liegen nur wenige Arbeiten vor, welche die ESR1 Amplifikation im Mammakarzinom untersucht haben. Allerdings variieren die Ergebnisse dieser Studien stark. So wurden zwischen 1% (41) und 23% (32) ESR1 Amplifikationen mit verschiedenen Methoden beschrieben. Eine mögliche Erklärung dafür liegt darin, dass die ESR1 Amplifikation nur sehr klein und/oder geringfügig ist, sodass sie mit weniger sensitiven Methoden (Abb. 7) als der FISH Analyse nur schlecht detektiert werden kann. Diese Hypothese wird durch eine vorhergehende Array-CGH Analyse bestärkt, in der das ESR1 Amplikon nur auf einen ca. 500kb großen Bereich beschränkt war, der nur das ESR1 Gen enthält (Abb. 7).

Das Ziel dieser Studie war es daher, die Ausdehnung und die durchschnittliche Kopiezahl des ESR1-Amplikons beim Mammakarzinom unter standardisierten Bedingungen möglichst genau zu bestimmen. Dazu wurde ein Gewebe-Mikroarray von ESR1 amplifizierten Tumoren erstellt, um alle Tumoren gleichzeitig untersuchen zu können. Ausgehend vom ESR1-Locus wurden sowohl in 5' als auch in 3' Richtung überlappende FISH-Sonden hybridisiert, um den Start- und Endpunkt des Amplikons zu bestimmen.

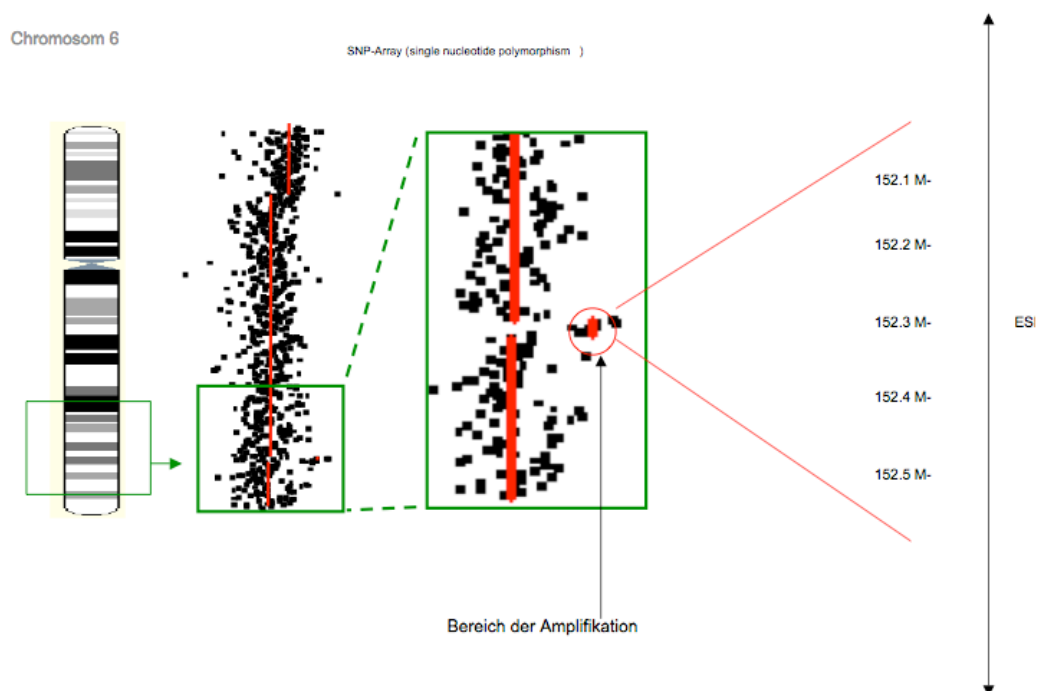


Abb. 7: hochauflösendes Gene Chip-Screening (Oligonucleotid-Arrays )



## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Gewebe

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei verschiedene Gewebemikroarrays (TMAs) untersucht. Der erste TMA (AMP-Test-TMA) bestand aus 171 Mammakarzinomen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie Hamburg-Eppendorf und wurde lediglich zum Screening nach ESR1 amplifizierten Tumoren eingesetzt. Die so identifizierten Tumoren wurden für einen zweiten TMA erneut gestanzt. Dieser sog. „ESR1-Mapping TMA“ bestand aus 26 ESR1-amplifizierten Mammatumoren und 12 Kontrollgeweben (normales Brustgewebe).

In Abb. 8 ist eine Übersicht über diesen TMA und in Abb. 9 eines einzelnen Gewebespots dargestellt. Die Herstellung des TMAs wird im folgenden Kapitel beschrieben.

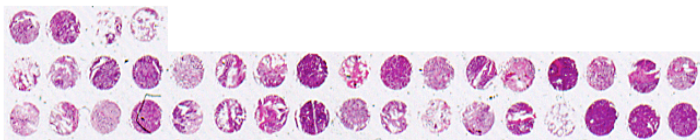


Abb. 8: Übersicht des Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitts des ESR1-Mapping-TMA's. Der Durchmesser eines einzelnen Gewebespots ist 0,6mm

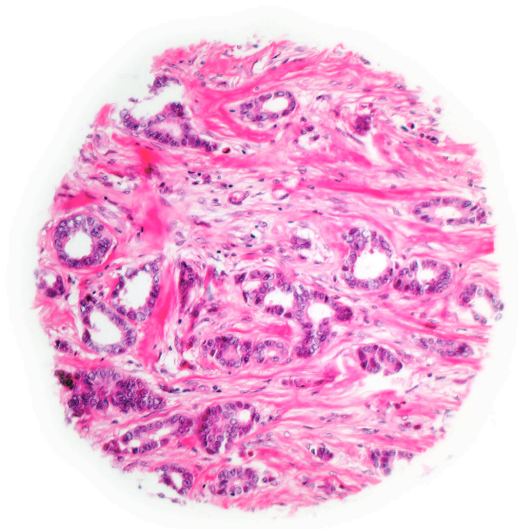


Abb. 9: Vergrößerung eines Gewebespots des ESR1-Mapping TMA, Durchmesser 0,6 mm.

## 2.2 TMA Herstellung

Das Tumorarray-Verfahren erlaubt das Einbringen von bis zu tausend Gewebezylindern (Durchmesser 0.6mm) von histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren in einen einzigen Paraffinblock. Die Funktionsweise des „Arrayers“ ist in Abb. 10 dargestellt.

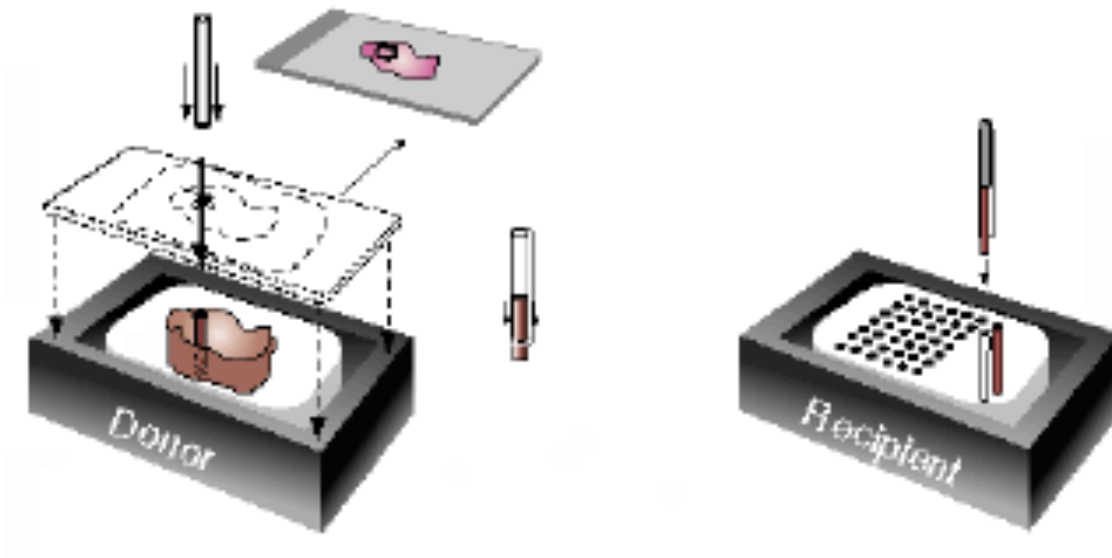


Abb. 10: Tumor-Array-Herstellung

Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600  $\mu\text{m}$ ), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstossen von Gewebestücken in mit einem Bohrer (äusserer Durchmesser ca. 600  $\mu\text{m}$ ) vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock. Bis zu tausend Gewebezylinder können in einen 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden.

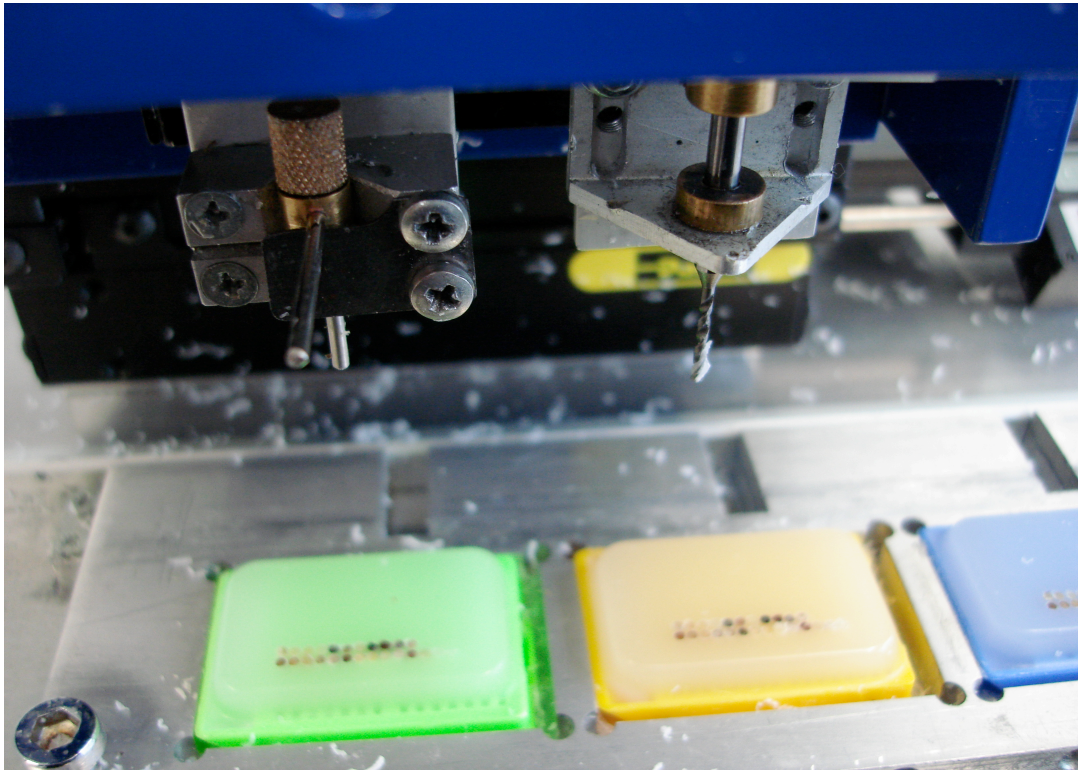


Abb. 11: Gewebe-Array-Bohrer ( Tissue-micro-arrayer)  
Oben: Bohreinheit Unten: einzelne TMA

## 2.3 Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)

Alle in dieser Studie verwendeten FISH-Sonden wurden selbst hergestellt. Dazu wurden überlappende BAC (Bacterial Artificial Chromosomes) Klone, die den Bereich von ca 1 Mb centromerisch bis eine Megabasis telomerisch vom ESR1-Gen abdeckten vom RZPD (Deutsches Resourcezentrum für Genomforschung GmbH) bezogen. Im Folgenden wird beschrieben, wie diese Klone kultiviert werden (2.3.1.), DNA extrahiert (2.3.2.), mittels Nick-Translation markiert (2.3.3) und letztendlich hybridisiert (2.3.4) werden um sie dann für die FISH Analyse zu detektieren (Fluoreszenzmarkierung) (2.3.5). Die FISH-Auswertung selbst wird in Kapitel (2.3.6) beschrieben.

## 2.3.1 BAC-Kultivierung

### Verwendete Materialien

pBac-E.coli-Klone: RZPD-Nr.: siehe Tabelle 1

*Tabelle 1: Verwendete BAC-Klone*

Sanger Name	RZPD-Name	Länge	Entfernung Von ESR 1
RP11-450E24	RZPDB737 C122127D6	140kb	Sonde im ESR1
RP1-63I5	RZPDB737 HO34D6	87kb	Sonde im ESR1
RP3-443C4	RZPDB737 F0416D6	67kb	ESR1-Rand 5´
RP3-404G5	RZPDB737 D0115D6	119kb	49 kb 5´
RP11-282P11	RZPDB737 H062082D	114kb	169 kb 5´
RP11-108N8	RZPDB737 G032039D6	84,216 kb	281 kb 5´
RP11-351K16	F082101D6	105kb	363 kb 5´
RP3-403M6	RZPDB737 C1115D6	86kb	466 kb 5´
RP11-613F7	RZPDB737 C042160D6	51kb	553 kb 5´
RP1-236H13	RZPDB737 E1210D	4kb	604 kb 5´
RP1-297M16	RZPDB737 C0812D6	65kb	608 kb 5´
RP1-292B18	RZPDB737 BO612D	109kb	674 kb 5´
RP1-99E18	RZPDB737 CO86D	100kb	783 kb 5´
RP1-44A20	RZPDB737 B104D	165kb	883 kb 5´
RP11-25C17	RZPDB737 B102012D	63kb	904 kb 5´
RP11-136K14	RZPDB737 FO92047D	150kb	1111 kb 5´
RP1-130E4	RZPDB737 D027D6	109kb	ESR-Rand 3´
RP11-434E7	RZPDB737 D072123D6	9kb	54 kb 3´
RP3-445H2	RZPDB737 FO816D6	139kb	63kb3´/ SYNE
RP11-809I23	RZPDB737 E1222186D	70kb	202 kb 3´
RP3-398G3	RZPDB737 BO215D	86kb	273 kb 3´

<b>Sanger Name</b>	<b>RZPD-Name</b>	<b>Länge</b>	<b>Entfernung Von ESR 1</b>
RP11-289C14	RZPDB737 BO72083D	17kb	353 kb 3'
RP11-133I21	RZPDB737 D052046D	87kb	373 kb 3'
RP3-358E10	RZPDB737 BO714D	97kb	457 kb 3'
RP1-9B16	RZPDB737 H112D	87kb	553 kb 3'
RP4-546K19	RZPDB737 EO419D	26kb	639 kb 3'
RP1-200K18	RZPDB737 GO99D	82kb	665 kb 3'
RP3-468K3	RZPDB737 DO117D	90kb	747 kb 3'
RP1-101K10	RZPDB737 DO46D	112kb	838 kb 3'
RP11-398I24	RZPDB737 EO82113D	45kb	950 kb 3'
RP11-535A9	RZPDB737 BO62147D	91kb	994 kb 3'
RP1-193H23	RZPDB737 E109D	92kb	1086 kb 3'
RP11-289C14	RZPDB737 BO72083D	17kb	353 kb 3'
RP11-133I21	RZPDB737 D052046D	87kb	373 kb 3'
RP3-358E10	RZPDB737 BO714D	97kb	457 kb 3'
RP1-9B16	RZPDB737 H112D	87kb	553 kb 3'
RP4-546K19	RZPDB737 EO419D	26kb	639 kb 3'
RP1-200K18	RZPDB737 GO99D	82kb	665 kb 3'
RP3-468K3	RZPDB737 DO117D	90kb	747 kb 3'
RP1-101K10	RZPDB737 DO46D	112kb	838 kb 3'
RP11-398I24	RZPDB737 EO82113D	45kb	950 kb 3'
RP11-535A9	RZPDB737 BO62147D	91kb	994 kb 3'
RP1-193H23	RZPDB737 E109D	92kb	1086 kb 3'

## **Laborprotokoll: pBac-E.coli-Klon-Kultivierung**

- (1) 10 ml Medium in einen 100ml-Erlenmeyerkolben füllen
- (2) Zugabe von 30µl Chloramphenicol
- (3) Mit abgeflammter Pinzette einen autoklavierten Zahnstocher fassen und 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 und 30µl 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 mithilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ von Qiagen mit leicht modifiziertem Protokoll extrahiert. Alle verwendeten Reagenzien und die „QIAprep spin-Säulen“ waren im Extraktions-Kit enthalten.

#### **Laborprotokoll: DNA-Extraktion aus pBac-E.coli-Klon-Flüssigkultur**

- (1) 3ml (2 + 1ml) der Flüssigkultur im 2ml-tube in einer Tischzentrifuge (~17.900 ×g) für 90 sek. bei 13.000 rpm pelletieren
- (2) Pellet in 250 µl Puffer P1 vollständig resuspendieren
- (3) Zugabe von 250µl Puffer P2 und vorsichtiges Mischen durch 4-6 mal invertieren
- (4) Zugabe von 350µl Puffer N3 und sofortiges, vorsichtiges Mischen durch 4-6 mal invertieren
- (5) 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- (6) Überstand in eine „QIAprep spin-Säule“ überführen
- (7) 1 min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
- (8) Zentrifugat/Durchfluß/Abfluß verwerfen
- (9) „QIAprep spin-Säule“ mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000

- rpm in einer Tischzentrifuge
- (10) Zentrifugat/Durchfluß/Abfluß verwerfen
  - (11) „QIAprep spin-Säule“ erneut mit 500µl Puffer PE beladen und 1min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
  - (12) Zenrifugat verwerfen
  - (13) „QIAprep spin –Säule“ erneut 1min bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugieren
  - (14) Zentrifugat 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 inkubieren (bei Raumtemperatur)
  - (17) 1min Zentrifugation bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge
  - (18) 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. Diese wird durch Agarosegelelektrophorese kontrolliert.

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

### **2.3.4 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 Enzyme Mix I 5µl
- DNA Polymerase 1µl

### **2.3.5 Laborprotokoll: DNA-Markierung mittels Nick-Translation**

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

## **2.4 Hybridisierung**

Für die zweifarbige FISH-Analyse wurden 4µm dicke TMA-Schnitte eingesetzt. Diese wurden vor der Hybridisierung entparaffiniert und proteolytisch vorbehandelt. Zur Hybridisierung wurden selbst hergestellte genspezifische Sonden (6q25.1; RZPD Nr. siehe Tabelle 1 der Klone unter 2.3.1) und eine kommerzielle Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum orange Vysis, CEP 6) eingesetzt. Die kommerzielle Centromersonde wurde nicht in dem mitgelieferten Hybridisierungsmix verdünnt. Beide Sonden wurden gemeinsam in einem Gemisch mit humaner Cot-DNA (zum Abblocken unspezifischer Bindungsstellen/repetitiver DNA-Sequenzen) und einem Hybridisierungsmix (Master-Mix 1.0) auf die TMA-Schnitte gegeben, mit diesen für 10 min bei 72°C co-denaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert.

Sowohl Denaturierung, als auch Hybridisierung wurden im Hybrite-Gerät durchgeführt.

Im Anschluß an die Hybridisierung über Nacht wurden die TMA-Schnitte stringent gewaschen, um unspezifische Hybridisierungen zu entfernen. Um möglichst deutliche Fluoreszenzsignale zu erhalten, wurden die Digoxigeninreste der selbsthergestellten Sonden über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluorezenzgekoppelt war. Hierzu wurde das „Enhancer Detection Kit“ von Roche eingesetzt.

### **2.4.1 Verwendete Materialien und Reagenzien**

- (1) 2×SSC
- (2) 20×SSC
- (3) Cot-DNA
- (4) Dextransulfat
- (5) Enhancer Detection Kit (Roche)
- (6) Ethanol



- (7) Formamid (deionisiert)
- (8) Hybrite (Vysis)
- (9) NP40
- (10) Tween 20 Vectashield Mounting Medium for Fluorescenc with DAPI; H-1200 (Vector)
- (11) VP 2000 Pretreatment Reagent (Vysis)
- (12) VP 2000 Protease Buffer (0,01N HCL) (Vysis)
- (13) Xylol

### **Laborprotokoll: Paraffinpretreatment und proteolytische Vorbehandlung**

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

### **Laborprotokoll: Herstellen des Basis-Hybridierungsmix**

- (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 pH 7 einstellen
- (4) mit H2O auf 7ml auffüllen
- (5) bei 4°C aufbewahren

### **Hybridisierungsmix (20µl)**

- (1) 14µl Basis-Hybridisierungsmix
- (2) 2µl Cot-DNA
- (3) 4µl Sonden-DNA

### **Laborprotokoll: Hybridisierung**

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

### **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 H<sub>2</sub>O waschen
- (5) Schnitte im Dunkeln lufttrocknen

## **2.4.2 Detektion ( Fluoreszenzmarkierung)**

Die Detektion wurde mit dem „Fluorescent Antibody Enhancer Set“ von Roche durchgeführt. Nach der Detektion wurden die Schnitte wieder im Dunkeln luftgetrocknet und dann mit DAPI (Vectashield Mounting Medium for Fluorescenc with DAPI; H-1200 (Vector) und einem 24×32 mm Deckgläschen eingedeckt.

## **2.4.3 Auswertung**

Für jede Sonde wurde die Kopiezahl in jedem einzelnen Spot bestimmt, indem die Signalzahlen für die Gen- und Zentromersonden (Cen6) in mindestens 20 verschiedenen Zellkernen geschätzt wurden. Die Daten wurden für jeden Gewebspot in tabellarischer Form gesammelt.

Eine Amplifikation wurde dann angenommen, wenn mindestens 2 mal so viele Gen- wie Zentromersignale gezählt wurden ( $\text{Ratio Gen:Cen6} \geq 2.0$ ), oder wenn Cluster von mehreren Fish-Signalen sichtbar waren. Wenn mehr Gen- als Zentromersignale vorhanden waren, jedoch weniger als 2 mal so viele, wurde die Genkopiezahl des entsprechenden Tumors als „Zugewinn“ (Gain,  $\text{Ratio} > 1.0$  aber  $< 2.0$ ) klassifiziert. Alle anderen Gewebe ( $\text{Ratio} \leq 1.0$ ) wurden als „nicht amplifiziert“ gewertet.

### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Häufigkeit von ESR1 Veränderungen am Amplifikations-Test-TMA**

In einem ersten Experiment wurde der Amplifikations-Test-TMA mit einer FISH-Sonde analysiert, die innerhalb des ESR1-Genes lokalisiert ist (RP11-450E24). Von den 171 Mamma-Karzinomen konnten 151 erfolgreich analysiert werden. Die übrigen 20 Gewebeproben waren nicht auswertbar, weil entweder der Gewebespot während der Hybridisierung abgeschwommen war, oder weil kein Hybridisierungssignal in den Zellkernen zu erkennen war. Insgesamt 34 der 151 (22.5%) analysierbaren Gewebeproben zeigten eine ESR1-Amplifikation und wurden für die Herstellung des Amplifikation-Mapping TMA ausgewählt. Von diesen 34 Gewebeproben konnten 26 für die Herstellung des TMAs genutzt werden. Die restlichen 8 Gewebe waren nicht mehr für die TMA-Herstellung geeignet, weil nicht mehr ausreichend Tumormaterial im Gewebeblock vorhanden war.

#### **3.2 Kartierung des ESR1-Amplicons**

##### **3.2.1 Auswertbarkeit und Reproduzierbarkeit**

Von den insgesamt 26 bekanntermaßen ESR1 amplifizierten Gewebeproben des Arrays konnten 24 Gewebe mit allen 28 FISH-Sonden ausgewertet werden. Nur zwei Gewebe wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, da sie mechanisch so zerstört waren, dass weitere Analysen nicht mehr möglich gewesen wären. Alle 12 Kontrollgewebe konnten mit

allen 28 FISH Sonden erfolgreich analysiert werden. Für 2 Sonden wurde die FISH-Analyse wiederholt, um die Reproduzierbarkeit des Hybridisierungsergebnisses zu überprüfen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der detektierten Kopiezahl-Kategorien (Normal, Gain, Amplifikation). Die Ergebnisse dieser Mehrfachuntersuchungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Bis auf vier Regionen konnten alle chromosomalen Bereiche durch Sonden hybridisiert und analysiert werden. Aus den BAC-Klonen RP1-236H13, RP3-404G5, RP11-133I21 and RP1-200K18 konnten keine qualitativ hochwertigen Sonden gewonnen werden.

Die FISH-Analyse bestätigte, dass das Amplikon in der Mehrzahl der Fälle sehr klein ist. Es reicht oft nur über einen Bereich von ca. 600 kb (RP3-443C3–RP1-130E4) inklusive des ESR1 und einem weiteren Bereich von ca. 100- 200 kb aufwärts in dem keine proteinkodierenden Gene enthalten sind.

Sonde	Analyse 1	Analyse 2
RP11-434E7	33 Normal 1 Gain 3 Amplifikation	33 Normal 1 Gain 3 Amplifikation
RP11-130E4	20 Normal 2 Gain 15 Amplifikation	18 Normal 1 Gain 18 Amplifikation

Tab. 2: Reproduzierbarkeit der FISH-Analyse

### 3.2.2 Ausdehnung des 6q25Amplikons

Die Ausdehnung des 6q25 Amplicons in den 24 Tumoren des Mapping- Arrays ist in Abb. 12 dargestellt. Es zeigte sich, dass in 17 von 24 Tumoren der amplifizierte Bereich nicht wesentlich über das ESR1 Gen hinausging. Die Sonde RP3-443C4 zeigte nicht in allen Fällen eine Amplifikation. Dies ist insofern von Interesse, als das die Sonde einen kleinen Teil des ESR1 Genes (ca. 16kb 5') abdeckt.

16kb sind jedoch zu klein, um ein sichtbares Fish-Signal zu produzieren. Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch dieser Bereich amplifiziert sein muss, jedoch die Amplifikation nicht mit der verwendeten Fish-Sonde nachweisbar ist. Beispiele für Sonden mit einer Amplifikation, einem Gain und mit normalen Kopiezahl sind exemplarisch für einen der Tumoren des TMA's in Abb. 13 gezeigt.

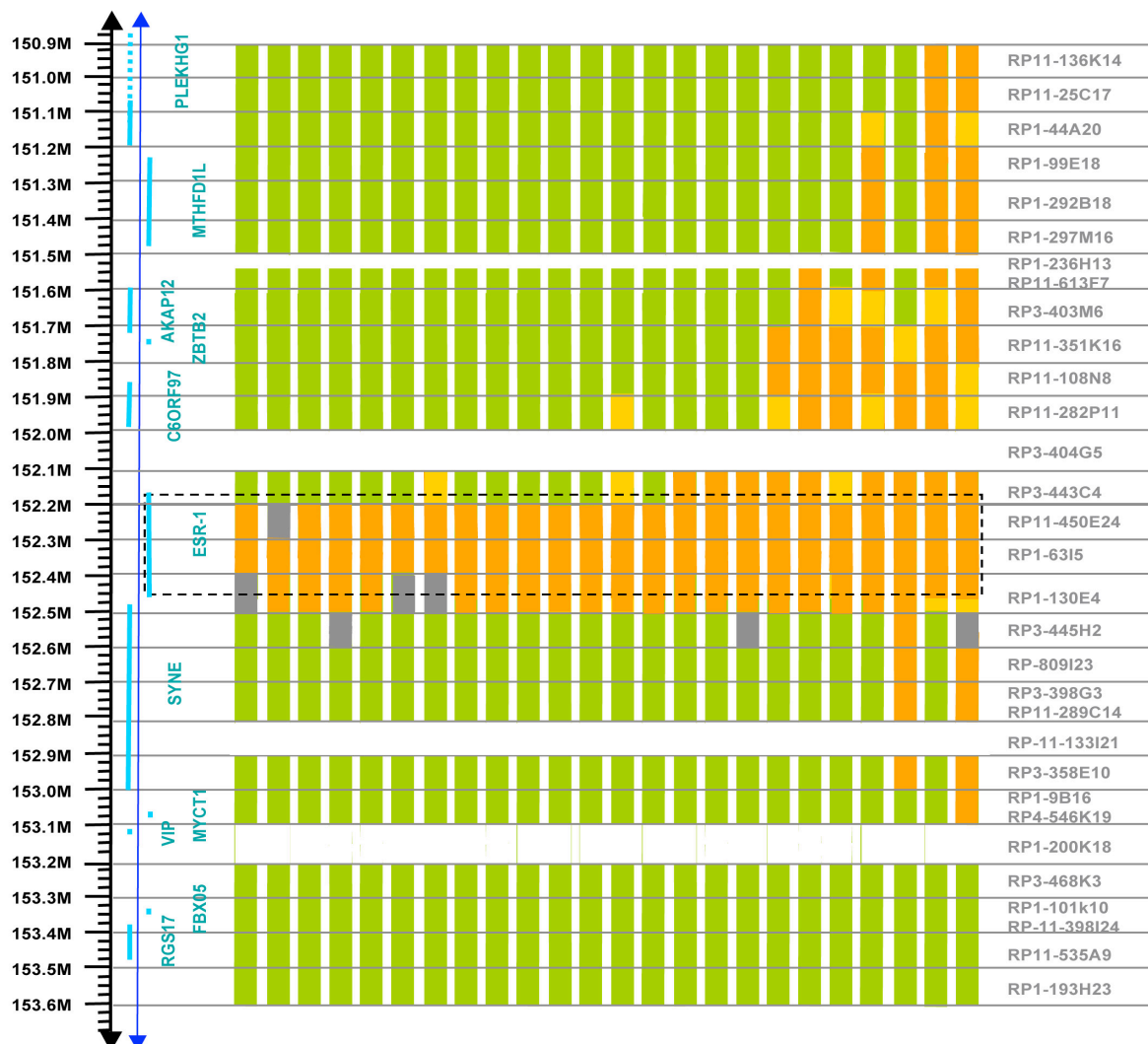


Abb. 12: (Beschreibung siehe nächste Seite)

Abb. 12: Ausdehnung des 6q25 Amplicons in den 24 Tumoren des Mapping- Arrays. Die vertikalen Balken stellen jeweils einen Tumor dar.



Legende der Abb. 12

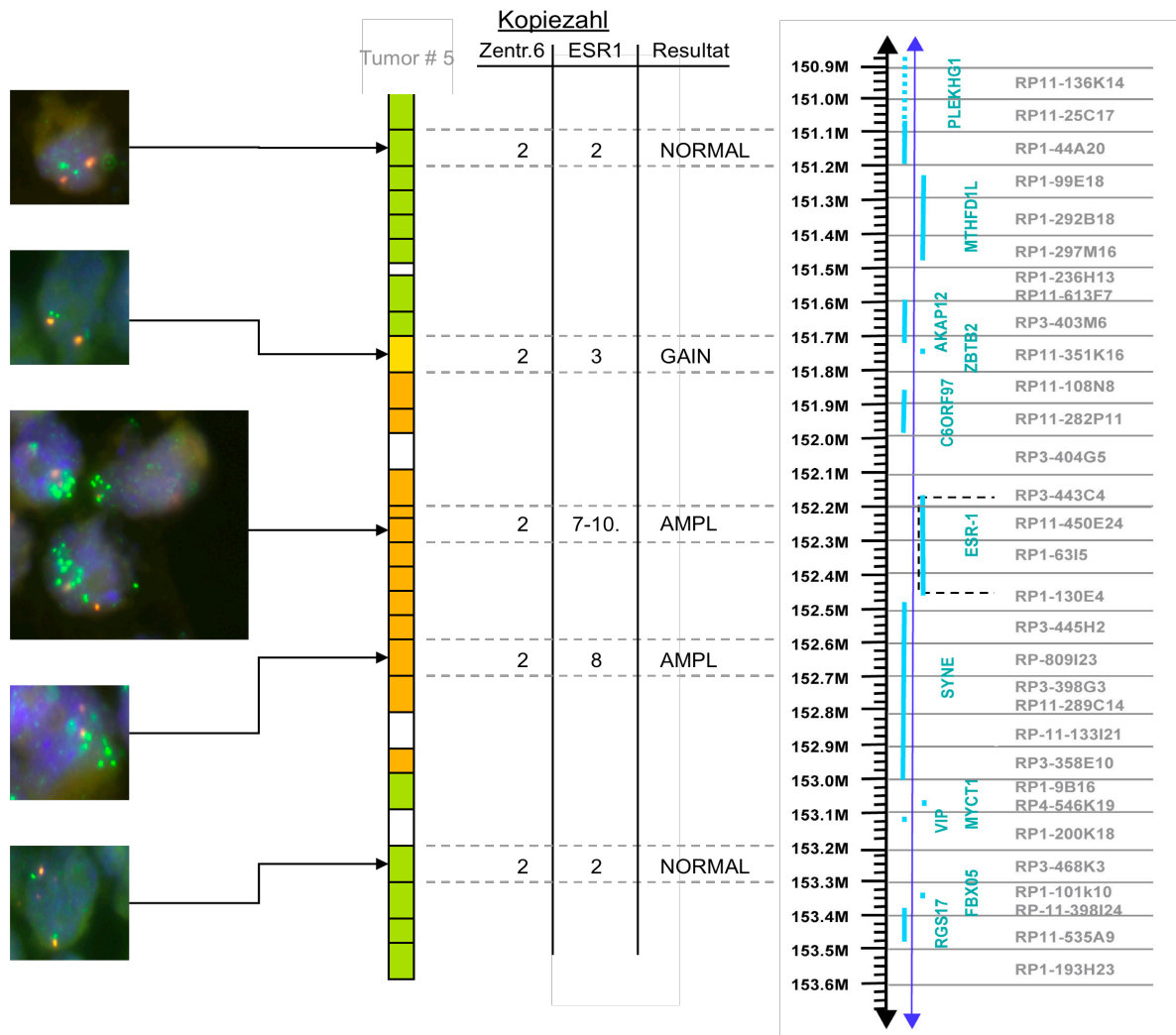


Abb. 13: Tumor # 5 mit einer Ausdehnung des ESR1-Amplikons (Amplifikation=orange, Gain=gelb, normale Kopiezahlen=grün) von RP11-351K16 bis RP3-358E10, was 1,3 Mb entspricht. Die Fotos stellen die jeweilige Analyse im Mikroskop dar.

- Amplifikation
- normale Kopiezahl
- gain
- nicht auswertbar
- Name, Position und Ausdehnung eines Gens
- Sondenname
- Positionsangabe auf 6q25
- Position des ESR1

Legende der Abb. 13

Dabei fanden sich die höchsten Kopiezahl (min:2, max:8, median 4.5) nur bei den 3 Sonden (RP11-450E24, RP1-63I5, RPI-130E4), die innerhalb des ESR1-Genes lokalisiert waren. Besonders hohe Schwankungen wurden für die Sonde RPI-130E4 festgestellt, die nur zur Hälfte (ca. 67kb) innerhalb der 3'-Region des ESR1-Genes liegt. Außerhalb des ESR1 Genes (ca.54 kb lang) wurden zumeist nur etwa normale Genkopiezahl (min:2; max=6, median: 2.2) gefunden.

Die durchschnittliche Genkopiezahl über den räumlichen Verlauf des Amplicons ist in Abb. 14 dargestellt.

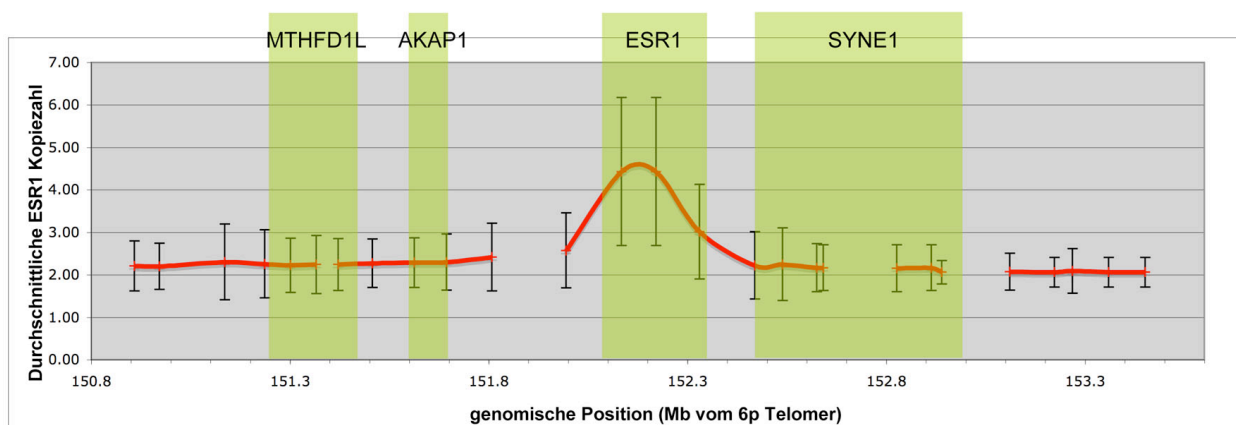


Abb. 14: ESR1-Kopiezahl im Amplicon. Die grünen Balken geben die genomischen Bereiche des jeweiligen Gens an. Die rote Linie ist der Mittelwert der ESR1-Kopiezahl bei 24 Tumoren mit ESR1-Amplifikation. Die schwarzen senkrechten Balken geben die Standardabweichung an. Die Lücken stellen nicht analysierte Bereiche dar.



### 3.2.3 ESR1 Kopiezahl in Kontrollgeweben

Die Kontrollgewebe zeigten ausnahmslos normale ESR1-Kopiezahlen (n=2).

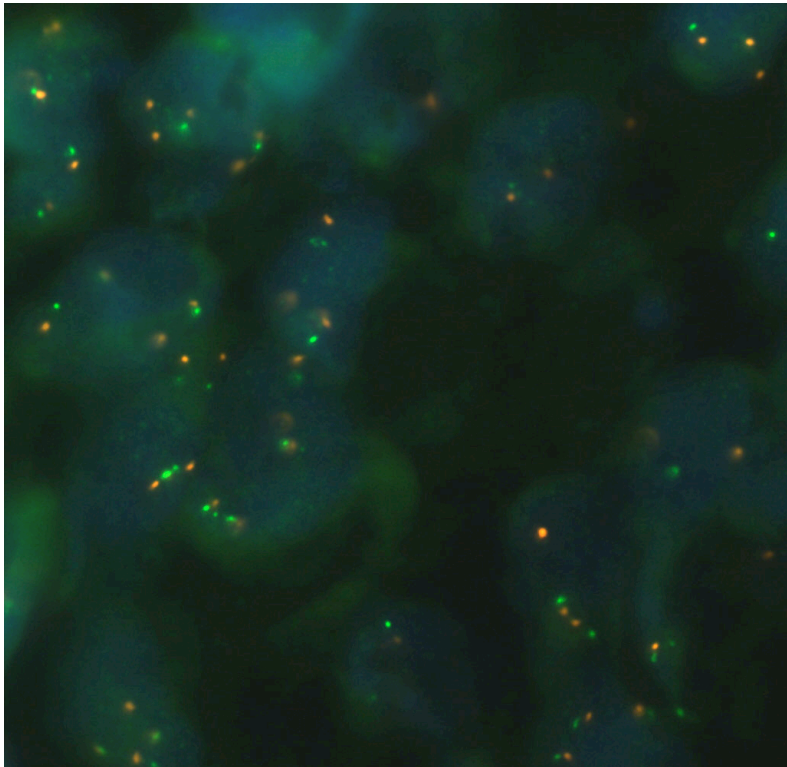


Abb.15: Fish-Analyse mit normaler (n=2) Kopiezahl des ESR1-Gens. Jeweils zwei rote (Zentromer/ Cen6) und zwei grüne (ESR1) Signale.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gewebemikroarray (engl. tissue microarray, TMA) aus 24 Brust-Tumoren hergestellt, bei denen in einer vorhergehenden Studie eine Amplifikation des ESR1 Genes auf Chromosom 6q25 festgestellt worden war. An diesem TMA wurden die Kopiezahl des ESR1 Genes und benachbarter Gene im Umkreis von etwa 1Mb bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das 6q25 Amplicon in der Mehrzahl der Fälle auf das ESR1 Gen beschränkt ist, und dass die Amplifikation meist nur zu einer vergleichsweise geringen Erhöhung der ESR1 Kopiezahl führt.

Diese Daten bestätigen zudem die Vermutung, dass ESR1 das Zielgen des 6q25 Amplicons sein muss, da es als einziges der Gene in der 6q25 Region in allen 24 Tumoren im amplifizierten Bereich liegt. Allerdings ist dieses Resultat nicht überraschend, da ESR1 (und das Östrogen-Rezeptor Protein) als eines der wichtigsten Gene für das Mammakarzinom gelten. Im Gegensatz dazu ist die Entdeckung, dass das Amplicon in etwa zwei Dritteln der Fälle auf das ESR1-Gen – und damit einen nur etwa 500kb großen genomischen Bereich - beschränkt ist, mehr als unerwartet. Alle bisher bekannten Amplifikationen sind typischerweise deutlich größer, und schließen in der Regel eine Vielzahl von Genen ein. So umfasst z.B. das HER2 Amplicon auf Chromosom 17q12 in den meisten Fällen etwa mindestens 2.5 Megabasen DNA und schließt meist über 60 verschiedenen Gene ein (z.B. PLXDC1, CACNB1, RPL19, STAC2, FBXL20, MED1, CRKRS, NEUROD2, PPP1R1B, STARD3, TCAP, PNMT, PERLD1, ERBB2, C17orf37, GRB7, TOP2A, IKZF3, ZPBP2, GSDML, ORMDL3, GSDM1, PSMD3, CSF3, MED24, THRA, NR1D1, NP\_001012241.1, CASC3, RAPGEFL1, WIPF2, CDC6, RARA, Q6ZWH6\_HUMAN, GJC1, P11388-2, IGFBP4, TNS4, CCR7, SMARCE1, KRT222P, KRT24, KRT25, KRT26, KRT27, KRT28, KRT10, TMEM99, KRT12, KRT20, KRT23, KRT39, KRT40, KRTAP3-3, KRTAP3-2, KRTAP3-1, KRTAP1-5, KRTAP1-1, KRTAP2-2, KRTAP2-4, KRTAP2-1, KRTAP4-8, KRTAP4-9, NM\_033059.2, KRTAP4-12, KRTAP4-7, KRTAP4-5, KRTAP4-4, KRTAP4-3). Innerhalb dieser Region werden alle Gene mit amplifiziert, und viele auch durch die Amplifikation überexprimiert. Die zufällige Ko-Amplifikation von Genen in der Nähe der eigentlichen Zielgene kann zu biologischen Konsequenzen führen. Oft umschließt so die HER2 Amplifikation auch das ca. 700kb entfernte TOP2A-Gen (42). In frühen Studien hat diese Koamplifikation zu der Vermutung geführt, dass Her2-amplifizierte Tumoren besonders gut auf Anthracycline ansprechen. Allerdings konnte dieser Zusammenhang in späteren Studien nicht bestätigt werden (43) (44). Das Rätsel löste sich erst als bekannt wurde, dass TOP2A für die Topoisomerase 2A kodiert, das Zielprotein von Anthracyclinen (45). Offensichtlich sprachen Patientinnen mit Mammakarzinomen immer dann gut auf die Anthracyclingabe an, wenn

zufälligerweise das TOP2A-Gen zusammen mit dem HER2 koamplifiziert war (46).

Im Falle des ESR1 Amplikons scheint eine Koamplifikation mit anderen Genen eher die Ausnahme zu sein. Es scheint eher, dass die Amplifikation fast zielgerichtet auf das ESR1 Gen beschränkt ist. Zwar erlaubt die Studie nicht, das Amplikon genau auf den Start- und Endpunkt des ESR1 einzugrenzen, weil durch die Größe und Lage der verwendeten BAC-Sequenzen die räumliche Auflösung der Kartierung begrenzt ist. Die am nächsten an der 5' Seite des ESR1 Genes liegende, nicht amplifizierte Sonde RP3-443C4 hat eine Länge von 67 Kb und reicht mit über 20 Kb in das ESR1 Gen hinein. Es ist zu vermuten, dass diese ca. 20 Kb ebenfalls amplifiziert sind, da anderenfalls kein funktionelles Protein entstehen könnte. Vermutlich ist der über 20 Kb große Teil der FISH-Sonde innerhalb des ESR1 Genes nicht groß und leuchtstark genug, um als amplifiziert erkannt zu werden. Gezählt werden können nur die zwei hellen und deutlichen Signale der Sonde außerhalb des ESR1 Genes. Der Startpunkt der Amplifikation dürfte also innerhalb der Sequenz des Clones RP3-443C4 liegen, allerdings kann mit den vorhandenen Fish-Sonden nicht bestimmt werden, wo genau. Eine feinere Kartierung müsste z.B. mit quantitativer PCR durchgeführt werden. Durch Auswahl geeigneter Primerpaare könnte so die Genkopiezahl in einem Fragment von unter 100bp bestimmt werden.

Durch die Technik der Fish-Analyse konnte die Kopiezahl des ESR1-Genes relativ genau bestimmt werden. Allerdings erlauben kleinere Sonden nur eine geringere Signalstärke, da die Fluorochrome gleichmäßig über die DNA verteilt sind und daher die Gesamtmenge an Fluoreszenz mit der Sondenlänge korreliert. Größere Sonden ermöglichen zwar eine höhere Signalstärke, aber der Abstand zwischen den Signalen wird geringer. Wäre die Sonde z.B. genau so lang wie das ESR1 Gen selbst, wäre selbst bei einer ESR1-Amplifikation mit 5 Genkopien theoretisch nur ein einziges, großes Signal zu erkennen. Dieses würde aber vermutlich nicht als Gencluster (und somit als Amplifikation) erkannt. Dieses Problem besteht bei großen Amplikons nicht. Tatsächlich werden in der Diagnostik heute FISH Sonden mit 200-400 Kb Größe eingesetzt, die oftmals aus mehreren Einzelsonden zusammengesetzt sind. Eine solche große Sonde würde im Falle von ESR1 vermutlich leicht zu falschen Ergebnissen führen. Tatsächlich wurde in Studien, die große Sonden (ca. 400 kb) benutzten, ESR1- Amplifikationen in nur weniger als zwei Prozent der Mammakarzinome gefunden (34). Eine weitere Studie (32) konnte allerdings auch mit einer großen ESR1 Sonde ( ESR1/ CEN6 der Fa. ZitoVision GmbH, Bremerhaven) eine Amplifikationsrate von 22% in 133 Mammakarzinomen finden. Allerdings nur, wenn die ESR1 Signale mit einer digitalen Bildanalyse in mehreren Ebenen des Zellkerns gezählt wurden.

Die geringe Größe des ESR1 Amplikons und die fast zielgenau scheinende Begrenzung auf das ESR1 Gen weisen darauf hin, dass das Amplikon auch anders entstehen könnte als die typischen großen Amplikons des „HER2-Typus“. Die langstreckigen Amplifikationen entstehen vermutlich meist als Folge von Chromosomenbrüchen und Reparaturversuchen der Zelle nach dem Breakage-Fusion-Bridge Modell. Die variable Größe des Amplikons ist hierbei gut durch die Zufälligkeit der Chromosomenbrüche während jeder Zellteilung erklärbar. Die offenbar konstante Größe des ESR1 Amplikons kann jedoch nicht durch einen solchen Mechanismus erklärt werden. Hier wäre der „Onion-Skin“ Mechanismus eher geeignet, um diese Art der sehr begrenzten und hochgradig geordneten Amplifikation zu erhalten. Diese Art der Amplifikation wird interessanterweise auch für die Entstehung von physiologischen Amplifikationen bei Vertebraten vermutet. So wird z.B. das Gen, welches für das Chorionprotein der Eihüllen bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* codiert, auf physiologischem Wege ca. 60 mal amplifiziert (47) (36). Der Sinn dieses Mechanismus liegt darin, einer kurzfristigen hohen Nachfrage an Genprodukten während der Eientwicklung gerecht werden zu können. Die Amplifikation ist hier also ein Weg, um in kurzer Zeit eine sehr hohe Proteinmenge bereit zu stellen. In ähnlicher Weise dient auch die ESR1-Amplifikation dem Zweck, eine große Proteinmenge zu produzieren. Schließlich ist die ESR1 Amplifikation hochgradig mit der ER Expression assoziiert (48). Es wäre also denkbar, dass auch die ESR1-Amplifikation nicht aufgrund einer allgemeinen genetischen Instabilität mit zahlreichen und zufälligen Chromosomenbrüchen entsteht, sondern aufgrund eines Mechanismus zur erhöhten Expression des ER Proteins, der vielleicht entartet ist und so als Genamplifikation klinisch in Erscheinung tritt.

Diese Theorie wird indirekt auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die ESR1 Amplifikation häufiger in low grade (Grad1) und nicht-metastasierten Tumoren auftritt (49). Im Gegensatz dazu werden praktisch alle anderen Amplifikationen (HER2, CMYC, EGFR) vor allem in den high grade, fortgeschrittenen und metastatischen Tumoren gefunden (50) (51). Die einzige Ausnahme von dieser Regel ist bisher das CCND1 Gen, das auch häufig in low-grade Tumoren vorkommt (52).

Eine weitere Auffälligkeit des ESR1 Amplikons ist die nur relativ geringe Kopiezahlerhöhung. Im Schnitt zeigten sich in den ESR1 amplifizierten Tumoren nur etwa 4.5 Genkopien. Die höchste Kopiezahl in dieser Studie betrug 8 Kopien. Dies ist im Vergleich zu anderen amplifizierten (Onko-) Genen ungewöhnlich gering. So werden für HER2, CMYC (53), oder CCND1 (54) in der Regel weit mehr als 20 Genkopien pro Amplikon gefunden. Diese geringgradige Amplifikationsrate ist auch eine mögliche Erklärung dafür, dass die ESR1 Amplifikation mit nicht in-situ Methoden, wie z.B. quantitativer PCR oder Array-CGH, nur sehr schwer zu finden sind (55) . Vor allem wenn die Tumorzellen nicht gezielt durch Mikrodissektion aus dem Gewebeverband isoliert werden, besteht die Gefahr, dass die

ESR1-Genkopiezahl durch einen „Verdünnungseffekt“ der Tumor-DNA durch Normal-DNA (z.B. aus Stromazellen oder Lymphozyten) unterschätzt wird. Zum Beispiel resultiert bei einer durchschnittlichen Kopiezahl von 4.5 (siehe Abb. 14, Balken des ESR1) in amplifizierten Zellen eine Ratio von 2.25, die sich aus der Kopiezahl der Gene (4.5) geteilt durch die Anzahl der Zentromere (Cen6) ergibt. Bei einer Kontaminationsrate von 30% Normalzellen, die bei Gewebeuntersuchungen als durchaus akzeptabel angesehen wird, sinkt diese Ratio aber bereits auf 1.86 und somit unter den Schwellenwert für eine Amplifikation in der PCR Analyse. In einer anderen Studie (Dissertation Eva Leipner, Uni-Hamburg) wurde die ESR-1 Amplifikation mit qPCR lasermikrodissoziierte Tumorzellen nachgewiesen. Selbst unter diesen Bedingungen (optimalen zwischen 60-70% Tumorzellen) konnten jedoch nur gut 40% der Fish-Amplifikationen mit der qPCR gefunden werden. Diese Studie zeigt, dass die qPCR nicht optimal für den ESR-1 Nachweis geeignet ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die ESR1 Amplifikation sich von anderen, bekannten Amplifikationen in mehrer Hinsicht unterscheidet. Zum einen ist das Amplikon in der Regel nur sehr klein und auf das ESR1 Gen beschränkt und zum anderen ist die Amplifikationsrate nur relativ gering. Außerdem legt die ungewöhnliche Assoziation der Amplifikation mit gut differenzierten und frühen Karzinomen die Hypothese nahe, dass hier vielleicht ein anderer Mechanismus zur Amplifikation führt als eine generelle genetische Instabilität. Vor allem die geringe Amplifikationsrate dürfte eine besondere Herausforderung für PCR-basierende Testsysteme darstellen, während die geringe Ausdehnung des Amplikons die Konstruktion von grossen und gut sichtbaren FISH-Sonden kompliziert.

## 5 Zusammenfassung

In einer vorherigen Arbeit wurde eine Amplifikation des ESR1-Genes, welches für den Östrogen-Rezeptor alpha kodiert, in etwa 20% der Mammakarzinome gefunden. Angesichts einer Vielzahl von Studien, die mittels hochauflösender Array komparativer Genomhybridisierung ( aCGH ) nach neuen Genamplifikationen beim Mamma-Ca gesucht haben, ist es jedoch verwunderlich, dass die Amplifikation nicht schon seit langem bekannt ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass das Amplikon nur sehr klein und/oder die Kopiezahlveränderungen nur geringfügig ist, so daß das Amplikon mit der wenig sensitiven aCGH nur schwer detektierbar ist.

In Anbetracht der immensen klinischen Bedeutung des ER für die Diagnose und Therapie des Mammakarzinoms ist es jedoch verwunderlich, dass die ESR1-Amplifikation noch nicht eher entdeckt bzw. näher untersucht wurde.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die räumliche Ausdehnung des Amplikons auf Chromosom 6q25 sowie das Ausmaß der Kopiezahlerhöhung möglichst exakt zu bestimmen.

Dazu wurde im ersten Schritt ein Gewebemikroarray aus 24 ESR1 Tumoren und 12 nicht ESR-1 amplifizierten Geweben hergestellt. Im zweiten Schritt wurde an diesem TMA die DNA-Kopiezahl mit über 30 FISH Sonden für den genomischen Bereich ca 1 Megabase 5' (zentromerisch) und 1 Megabase 3' (telomerisch) des ESR1 Genes bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das 6q25 Amplicon in 17 von 24 auswertbaren Fällen auf das ESR1 Gen beschränkt ist. Eine weitere Auffälligkeit des ESR1 Amplifikons ist die nur relativ geringe Kopiezahlerhöhung (min: 2, max.: 8, median: 4.5). Außerhalb des ESR1 Genes wurden zumeist nur etwa normale Genkopiezahlen (min: 2; max.: 6, median: 2.2) gefunden.

Diese Ergebnisse bestätigen zunächst, dass das ESR1 das Zielgen des 6q25 Amplicons sein muss, da es als einziges der Gene in der 6q25 Region in allen 24 Tumoren im amplifizierten Bereich liegt.

Die Entdeckung, dass das Amplikon in etwa zwei Dritteln der Fälle auf das ESR1-Gen - und damit einen nur etwa 500kb großen genomischen Bereich - beschränkt ist, ist ungewöhnlich. Alle bisher bekannten Amplifikationen sind typischerweise deutlich größer, und schließen in der Regel eine Vielzahl von Genen ein. Es ist somit zu erwarten, dass es noch weitere solcher „Mikroamplifikationen“ im Genom von Tumoren geben könnte, die mit den zur Zeit verfügbaren Screeningmethoden (aCGH, SNP-Array) nur sehr schwer gefunden werden können. Die Fish-Analyse ist die aktuell sensitivste Methode zum Nachweis von Genamplifikationen.

## 6 Literatur

1. Pisani, P., Parkin, D. M., Bray, F., and Ferlay, J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer*, 83: 18-29, 1999.
2. Taylor, R. and Boyages, J. Estimating risk of breast cancer from population incidence affected by widespread mammographic screening. *J Med Screen*, 8: 73-76, 2001.
3. Milanezi, F., Carvalho, S., and Schmitt, F. C. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Rev Mol Diagn*, 8: 417-434, 2008.
4. Toyama, T., Yamashita, H., Kondo, N., Okuda, K., Takahashi, S., Sasaki, H., Sugiura, H., Iwase, H., and Fujii, Y. Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA1 mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC Cancer*, 8: 309, 2008.
5. Guerra, E., Vacca, G., Palombo, B., and Alberti, S. Prognostic value of mutations in TP53 and RAS genes in breast cancer. *Int J Biol Markers*, 18: 49-53, 2003.
6. Mano, M. S., Rosa, D. D., De Azambuja, E., Ismael, G. F., and Durbecq, V. The 17q12-q21 amplicon: Her2 and topoisomerase-IIalpha and their importance to the biology of solid tumours. *Cancer Treat Rev*, 33: 64-77, 2007.
7. Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. The role of overexpressed HER2 in transformation. *Ann Oncol*, 12 *Suppl 1*: S9-13, 2001.
8. Speiser, P., Sliutz, G., Zeillinger, R., Czerwenka, K., Jakesz, R., Knogler, W., Kury, F., Reiner, A., Sevelde, P., Schneeberger, C., and et al. [Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with steroid receptors, tumor stage, grading and menopausal status]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 52: 355-359, 1992.
9. Soler, D., Genesca, A., Arnedo, G., Egozcue, J., and Tusell, L. Telomere dysfunction drives chromosomal instability in human mammary epithelial cells. *Genes Chromosomes Cancer*, 44: 339-350, 2005.
10. Viani, G. A., Afonso, S. L., Stefano, E. J., De Fendi, L. I., and Soares, F. V. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*, 7: 153, 2007.
11. Perou, C. M., Sorlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lonning, P. E., Borresen-Dale, A. L., Brown, P. O., and Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406: 747-752, 2000.
12. Miyoshi, Y., Murase, K., and Oh, K. Basal-like subtype and BRCA1 dysfunction in breast cancers. *Int J Clin Oncol*, 13: 395-400, 2008.
13. Sato, K., Rajendra, E., and Ohta, T. The UPS: a promising target for breast cancer treatment. *BMC Biochem*, 9 *Suppl 1*: S2, 2008.
14. Anders, C. and Carey, L. A. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*, 22: 1233-1239; discussion 1239-1240, 1243, 2008.
15. Sarup, J., Jin, P., Turin, L., Bai, X., Beryt, M., Brdlik, C., Higaki, J. N., Jorgensen, B., Lau, F. W., Lindley, P., Liu, J., Ni, I., Rozzelle, J., Kumari, R., Watson, S. A., Zhang, J., and Shepard, H. M. Human epidermal growth factor receptor (HER-1:HER-3) Fc-mediated heterodimer has broad antiproliferative activity in vitro and in human tumor xenografts. *Mol Cancer Ther*, 7: 3223-3236, 2008.

16. Zeng, X., Wang, P., Wu, S. F., Gao, J., Liang, Z. Y., and Liu, T. H. [Protein overexpression and gene copy number of EGFR and HER2 in colorectal carcinoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, *36*: 447-452, 2007.
17. Pegram, M. D., Lipton, A., Hayes, D. F., Weber, B. L., Baselga, J. M., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, S. A., Twaddell, T., Glaspy, J. A., and Slamon, D. J. 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*: 2659-2671, 1998.
18. Funkhouser, W. K. and Kaiser-Rogers, K. Review: significance of, and optimal screening for, HER-2 gene amplification and protein overexpression in breast carcinoma. *Ann Clin Lab Sci*, *31*: 349-358, 2001.
19. Singer, C. F., Kostler, W. J., and Hudelist, G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: Current standards and future strategies. *Biochim Biophys Acta*, *1786*: 105-113, 2008.
20. Wang, X., Zhang, S., MacLennan, G. T., Eble, J. N., Lopez-Beltran, A., Yang, X. J., Pan, C. X., Zhou, H., Montironi, R., and Cheng, L. Epidermal growth factor receptor protein expression and gene amplification in small cell carcinoma of the urinary bladder. *Clin Cancer Res*, *13*: 953-957, 2007.
21. Nakazawa, K., Dobashi, Y., Suzuki, S., Fujii, H., Takeda, Y., and Ooi, A. Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers. *J Pathol*, *206*: 356-365, 2005.
22. Reichelt, U., Duesedau, P., Tsourlakis, M., Quaas, A., Link, B. C., Schurr, P. G., Kaifi, J. T., Gros, S. J., Yekebas, E. F., Marx, A., Simon, R., Izbicki, J. R., and Sauter, G. Frequent homogeneous HER-2 amplification in primary and metastatic adenocarcinoma of the esophagus. *Mod Pathol*, *20*: 120-129, 2007.
23. Wilson, M. E., Westberry, J. M., and Prewitt, A. K. Dynamic regulation of estrogen receptor-alpha gene expression in the brain: a role for promoter methylation? *Front Neuroendocrinol*, *29*: 375-385, 2008.
24. Killer, N., Hock, M., Gehlhaus, M., Capetian, P., Knoth, R., Pantazis, G., Volk, B., and Meyer, R. P. Modulation of androgen and estrogen receptor expression by antiepileptic drugs and steroids in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, *50*: 1875-1890, 2009.
25. Taylor, A. H., Guzail, M., and Al-Azzawi, F. Differential expression of oestrogen receptor isoforms and androgen receptor in the normal vulva and vagina compared with vulval lichen sclerosus and chronic vaginitis. *Br J Dermatol*, *158*: 319-328, 2008.
26. Liu, W. H., Yeh, S. H., Lu, C. C., Yu, S. L., Chen, H. Y., Lin, C. Y., Chen, D. S., and Chen, P. J. MicroRNA-18a prevents estrogen receptor-alpha expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, *136*: 683-693, 2009.
27. Knapczyk-Stwora, K., Durlej, M., Duda, M., Czernichowska-Ferreira, K., Tabecka-Lonczynska, A., and Slomczynska, M. Expression of Oestrogen Receptor alpha and Oestrogen Receptor beta in the Uterus of the Pregnant Swine. *Reprod Domest Anim*, 2009.
28. Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., and Ropero, A. B. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol*, *304*: 63-68, 2009.
29. Wang, W., Hayami, T., and Kapila, S. Female hormone receptors are differentially expressed in mouse fibrocartilages. *Osteoarthritis Cartilage*, *17*: 646-654, 2009.
30. Al-Kuraya, K., Schraml, P., Torhorst, J., Tapia, C., Zaharieva, B., Novotny, H., Spichtin, H., Maurer, R., Mirlacher, M., Kochli, O., Zuber, M., Dieterich, H., Mross,



- F., Wilber, K., Simon, R., and Sauter, G. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res*, *64*: 8534-8540, 2004.
31. Levine, M. N., Bramwell, V. H., Pritchard, K. I., Norris, B. D., Shepherd, L. E., Abu-Zahra, H., Findlay, B., Warr, D., Bowman, D., Myles, J., Arnold, A., Vandenberg, T., MacKenzie, R., Robert, J., Ottaway, J., Burnell, M., Williams, C. K., and Tu, D. Randomized trial of intensive cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil chemotherapy compared with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in premenopausal women with node-positive breast cancer. National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, *16*: 2651-2658, 1998.
  32. Tomita, S., Zhang, Z., Nakano, M., Ibusuki, M., Kawazoe, T., Yamamoto, Y., and Iwase, H. Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients. *Cancer Sci*, *100*: 1012-1017, 2009.
  33. Holst, F., Stahl, P. R., Ruiz, C., Hellwinkel, O., Jehan, Z., Wendland, M., Lebeau, A., Terracciano, L., Al-Kuraya, K., Janicke, F., Sauter, G., and Simon, R. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. *Nat Genet*, *39*: 655-660, 2007.
  34. Brown, L. A., Hoog, J., Chin, S. F., Tao, Y., Zayed, A. A., Chin, K., Teschendorff, A. E., Quackenbush, J. F., Marioni, J. C., Leung, S., Perou, C. M., Neilsen, T. O., Ellis, M., Gray, J. W., Bernard, P. S., Huntsman, D. G., and Caldas, C. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet*, *40*: 806-807; author reply 810-802, 2008.
  35. Claycomb, J. M. and Orr-Weaver, T. L. Developmental gene amplification: insights into DNA replication and gene expression. *Trends Genet*, *21*: 149-162, 2005.
  36. Tower, J. Developmental gene amplification and origin regulation. *Annu Rev Genet*, *38*: 273-304, 2004.
  37. Narayanan, V. and Lobachev, K. S. Intrachromosomal gene amplification triggered by hairpin-capped breaks requires homologous recombination and is independent of nonhomologous end-joining. *Cell Cycle*, *6*: 1814-1818, 2007.
  38. Narayanan, V., Mieczkowski, P. A., Kim, H. M., Petes, T. D., and Lobachev, K. S. The pattern of gene amplification is determined by the chromosomal location of hairpin-capped breaks. *Cell*, *125*: 1283-1296, 2006.
  39. Speicher, M. R., Prescher, G., du Manoir, S., Jauch, A., Horsthemke, B., Bornfeld, N., Becher, R., and Cremer, T. Chromosomal gains and losses in uveal melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res*, *54*: 3817-3823, 1994.
  40. Chen, J. and Wang, Y. P. A statistical change point model approach for the detection of DNA copy number variations in array CGH data. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*, *6*: 529-541, 2009.
  41. Vincent-Salomon, A., Raynal, V., Lucchesi, C., Gruel, N., and Delattre, O. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet*, *40*: 809; author reply 810-802, 2008.
  42. Konecny, G. E., Pauletti, G., Untch, M., Wang, H. J., Mobus, V., Kuhn, W., Thomssen, C., Harbeck, N., Wang, L., Apple, S., Janicke, F., and Slamon, D. J. Association between HER2, TOP2A, and response to anthracycline-based preoperative chemotherapy in high-risk primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*.
  43. Miyoshi, Y., Kurosumi, M., Kurebayashi, J., Matsuura, N., Takahashi, M., Tokunaga, E., Egawa, C., Masuda, N., Kono, S., Morimoto, K., Kim, S. J., Okishiro, M., Yanagisawa, T., Ueda, S., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. Predictive factors for anthracycline-based chemotherapy for human breast cancer. *Breast Cancer*, 2009.

44. Slamon, D. J. and Press, M. F. Alterations in the TOP2A and HER2 genes: association with adjuvant anthracycline sensitivity in human breast cancers. *J Natl Cancer Inst*, *101*: 615-618, 2009.
45. Hicks, D. G., Yoder, B. J., Pettay, J., Swain, E., Tarr, S., Hartke, M., Skacel, M., Crowe, J. P., Budd, G. T., and Tubbs, R. R. The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study. *Hum Pathol*, *36*: 348-356, 2005.
46. Jarvinen, T. A. and Liu, E. T. Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, *6*: 579-602, 2006.
47. Zhang, H. and Tower, J. Sequence requirements for function of the Drosophila chorion gene locus ACE3 replicator and ori-beta origin elements. *Development*, *131*: 2089-2099, 2004.
48. Lebeau, A., Grob, T., Holst, F., Seyedi-Fazlollahi, N., Moch, H., Terracciano, L., Turzynski, A., Choschzick, M., Sauter, G., and Simon, R. Oestrogen receptor gene (ESR1) amplification is frequent in endometrial carcinoma and its precursor lesions. *J Pathol*, *216*: 151-157, 2008.
49. Issa, R. M., Lebeau, A., Grob, T., Holst, F., Moch, H., Terracciano, L., Choschzick, M., Sauter, G., and Simon, R. Estrogen receptor gene amplification occurs rarely in ovarian cancer. *Mod Pathol*, *22*: 191-196, 2009.
50. Aulmann, S., Bentz, M., and Sinn, H. P. C-myc oncogene amplification in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat*, *74*: 25-31, 2002.
51. Roy, P. G., Pratt, N., Purdie, C. A., Baker, L., Ashfield, A., Quinlan, P., and Thompson, A. M. High CCND1 amplification identifies a group of poor prognosis women with estrogen receptor positive breast cancer. *Int J Cancer*, 2009.
52. Aaltonen, K., Amini, R. M., Landberg, G., Eerola, H., Aittomaki, K., Heikkila, P., Nevanlinna, H., and Blomqvist, C. Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, *113*: 75-82, 2009.
53. Zaharieva, B., Simon, R., Ruiz, C., Oeggerli, M., Mihatsch, M. J., Gasser, T., Sauter, G., and Toncheva, D. High-throughput tissue microarray analysis of CMYC amplification in urinary bladder cancer. *Int J Cancer*, *117*: 952-956, 2005.
54. Kaltz-Wittmer, C., Klenk, U., Glaessgen, A., Aust, D. E., Diebold, J., Lohrs, U., and Baretton, G. B. FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy. *Lab Invest*, *80*: 1455-1464, 2000.
55. Vincent-Salomon, A., Lucchesi, C., Gruel, N., Raynal, V., Pierron, G., Goudefroye, R., Reyal, F., Radvanyi, F., Salmon, R., Thiery, J. P., Sastre-Garau, X., Sigal-Zafrani, B., Fourquet, A., and Delattre, O. Integrated genomic and transcriptomic analysis of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res*, *14*: 1956-1965, 2008.

## 7 Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich vielen Menschen einen herzlichen Dank. Ins Besondere möchte ich mich bei meinem Doktorvater Ronald Simon bedanken. Schon zu Beginn hat er mir die Möglichkeit gegeben, mich zwischen verschiedenen Themen zu entscheiden. So habe ich ein Thema wählen können, das mich von Anfang an sehr interessiert hat und mir durchweg große Freude bereitet. Ich möchte mich darüber hinaus für die zahlreichen anregenden Diskussionen die meine Begeisterung immer wieder aufs Neue entfacht haben und die wertvollen Ratschläge die maßgeblich für das Gelingen der Arbeit verantwortlich waren, bedanken. Ich weiß die intensive Betreuung seinerseits, die trotz eines mehr als gut gefüllten Terminkalenders immer gegeben war, außerordentlich zu schätzen.

Ein großer Dank geht aber auch an Frederik Holst, der mir während meiner experimentellen Phase im Labor jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mit seiner praktischen Erfahrung maßgeblich zum Gelingen der Experimente beitrug.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern für Ihre Unterstützung bedanken.

## **8 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir verwendeten 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.