

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Pathologie

Prof. Dr. med. G. Sauter

Arbeit unter der Leitung von Dr. Volker SCOTLAND, PD Dr. rer. nat. R. SIMON und
Dr. med. K. FRIEDRICHS

Messung des Östrogenrezeptorstatus mit FISH und Immunhistochemie Eine vergleichende TMA Studie an 814 Mammakarzinomen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität

vorgelegt von

Stephanie Hofmann
aus Buchholz i.d.N.

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 5.11.2010

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. R. Simon

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof Dr. F. Jänicke

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Mammakarzinom	1
1.2	Östrogenrezeptor	1
1.3	Therapie	3
1.4	Antiöstrogene Therapie des Mammakarzinoms	3
1.5	Untersuchungsverfahren	6
1.6	Aufgabenstellung	7
2	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1	Gewebekollektiv	7
2.2	TMA-Herstellung	8
2.3	Immunhistochemie	9
2.4	FISH	11
2.5	Hybridisierung und Detektion	11
2.5.1	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)	11
3	RESULTATE DER ESR1-AMPLIFIKATIONEN	13
3.1	Reproduzierbarkeit der FISH-Ergebnisse	13
3.2	Reproduzierbarkeit der IHC-Ergebnisse	17
3.2.1	Initiale Analyse mit dem Novocastra-Antikörper an Grossschnitten	17
3.2.2	Reanalyse mit dem DAKO-Antikörper am TMA	18
3.3	Vergleich der beiden immunhistochemischen Untersuchungen	19
3.4	Beziehung zwischen den FISH-Analysen zu den IHC-Daten der beiden Antikörper	19
4	DISKUSSION	20
5	ZUSAMMENFASSUNG	26
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
7	LITERATURVERZEICHNIS	VI
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	X

9	TABELLENVERZEICHNIS	X
10	DANKSAGUNG	28
11	LEBENS LAUF	29
12	EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG	30

1 Einleitung

1.1 Mammakarzinom

Brustkrebs stellt mit 25% der Krebsneuerkrankungen weltweit die häufigste bösartige Neubildung bei Frauen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr dar. Bei jungen Frauen zwischen 35 und 59 gehen 40% der Neuerkrankungen und 30% der Todesfälle an Krebs auf das Konto des Mammakarzinoms. Das mittlere Lebenszeitrisko in Deutschland beträgt 9.2%, d.h. jede 11. Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an diesem malignen Tumor der Brustdrüse. Im Jahre 2002 wurden in der Bundesrepublik Deutschland (BRD) 55.150 Neuerkrankungen gemeldet, davon 23.250 unter 60. Die Inzidenz steigt seit 1970 stetig an, allerdings ist die Brustkrebsmortalität seit Ende der 90er Jahre rückläufig. So verstarben 2002 in der BRD insgesamt 17.780 Patientinnen, davon 4.303 der unter 60-Jährigen. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt etwas über 62 Jahre, knapp sieben Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter bei Frauen an Krebs (Robert-Koch-Institut (RKI) Hamburg, 2006).

Der Entstehung von Tumoren liegen meist eine oder mehrere genetische Veränderungen in den Epithelzellen des Brustgewebes zugrunde. Die Mehrheit der Brusttumore (90-95%) tritt nicht familiär sondern sporadisch auf. Diese Mutationen können auf DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Ebene durch bestimmte Mechanismen hervorgerufen werden, wobei der Ort der Mutation auf der DNA-Ebene den Grad der Kanzerogenität bestimmt. So spielen vor allen Dingen der Austausch zweier Basen (Punktmutationen), der Einbau von Basen (Insertion), der Verlust von Basen (Deletion), die Verdopplung eines Gens oder dessen Sequenz (Duplikation) oder die Vermehrung eines bestimmten Gens bis hin zu einem gesamten Genabschnitt (Amplifikation) eine entscheidende Rolle. Mutationen können durch exogene als auch durch endogene Faktoren verursacht werden. So können z.B. ionisierende oder UV-Strahlung, Tabak und Farbstoffe diese Genveränderungen hervorrufen. Eine einzige Mutation reicht jedoch meist nicht aus, um die jeweilige Zelle entarten zu lassen. Durch das vermehrte Wachstum des Tumors entsteht eine vergrößerte Zielpopulation für weitere Mutationen und die Summe aus diesen genetischen Veränderungen begünstigt die Entstehung einer malignen Entartung.

1.2 Östrogenrezeptor

Bei der speziellen Entwicklung von Brustkrebs und dessen Progression sind mehrere Mechanismen bekannt, die auf molekularer Ebene eine große Rolle spielen, wobei den weiblichen Geschlechtshormonen, den Östrogenen, eine entscheidende Bedeutung

zukommt. Östradiol, Östron und Östriol, die zur Gruppe der Steroidhormone gehören und die drei wichtigsten weiblichen Geschlechtshormone darstellen, werden von der Pubertät bis zur Menopause in den Eierstöcken gebildet. Da die Ovarien die Östrogenherstellung nach der Menopause einstellen, übernimmt das Fettgewebe ab diesem Zeitpunkt den Hauptproduktionsort dieser Hormone.

Östrogen entfaltet seine Wirkung durch Bindung an Östrogenrezeptoren, welche sich im Inneren der Zellen des östrogenregulierenden Gewebes befinden. Durch das Andocken des Hormons an die Bindungsstelle des Rezeptors, verändert dieser seine Gestalt, wird dadurch aktiviert und lagert sich mit einem weiteren Rezeptor, der ebenfalls hormonegebunden ist, zu einem Dimer zusammen. Dieses Rezeptorpaar wandert nun aus dem Zellinneren in den Zellkern und bindet an bestimmte Gene des sich dort befindenden Erbguts. Durch Aktivierungsprozesse werden die Teilung bestimmter Zellen bzw. Tumorzellen ausgelöst und damit das Wachstum des Karzinoms veranlasst. Östrogenrezeptoren besitzen eine bausteinartige Struktur, die bestimmte Domänen enthalten, welche für die transkriptionale Aktivierung, die Kernlokalisation, die Dimerisierung und die Bindung für DNA und Liganden verantwortlich sind (Peters und Khan, 2003). Die Rezeptoren verfügen über zwei besondere Bindungsstellen, die man aufgrund ihrer Aufgaben „activation functions (AF)“ nennt. In menschlichen Zellen existieren zwei unterschiedliche Isoformen des Östrogenrezeptors, die auf unterschiedlichen Genen, ESR1 und ESR2, codiert werden (Deroo und Korach, 2006).

Das ER- Protein wurde 1950 von Elwood V. Jensen an der University of Chicago identifiziert. Mit der Entdeckung der neuen Form des ER im Jahre 1996, bekannt als ER- β , wird der originale Östrogenrezeptor seither als ER- α bezeichnet. Cowley konnte zeigen, dass ER α und ER β in den Domänen für die Bindung von Liganden und DNA (AF2) übereinstimmen, jedoch in der Domäne AF1 Unterschiede aufweisen (Cowley et al., 1999).

Holst und Stahl entdeckten 2007 eine Amplifikation eines Gens auf dem ESR1 Gen, lokalisiert auf 6q25 des Chromosoms 6, welches den ER α verschlüsselt. In der Studie wurden 2000 Frauen mit Mammakarzinomen untersucht. Bei 20,6% der Tumore wurde diese Amplifikation gefunden. 99% dieser Karzinome zeigten eine Überexpression des ER-Proteins. Diese bestimmte Amplifikation konnte sogar zu 36% (8/22) bei benignen Papillomen und zu 8,3% (1/12) in duktalem Hyperplasien nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass die ESR1-Amplifikation eine wichtige Rolle in proliferativen Ereignissen der weiblichen Brustdrüse spielt. Diese Tatsache lässt vermuten, dass es sich hierbei um eine sehr frühe genetische Veränderung in einem langen Entstehungsprozess einer Teilmenge des Brustkrebses handelt (Holst et al., 2007).

1.3 Therapie

In den letzten Jahren hat sich die Behandlung von Brustkrebs stark weiterentwickelt. Lokale Maßnahmen an der Brust bestehen aus Strahlentherapie oder einer Operation, wobei systemisch mehrere medikamentöse Verfahren, wie z.B. die Chemo- oder Hormontherapie als Behandlungsmaßnahmen bei Brustkrebs zur Verfügung stehen. Noch heute steht die operative Therapie im Mittelpunkt mit dem erstrangigen Ziel, den Tumor schnellstmöglich zu entfernen. Ergänzend dazu kann man eine systemische Therapie in Abhängigkeit von dem jeweiligen Tumorstadium und dessen Biologie anschließen. Allgemein wird die Wahl der individuellen Therapie jeder Brustkrebspatientin nach Tumorgröße, Befall von axialen Lymphknoten, Grad der Malignität der Tumorzellen, Menopausalstatus, Alter und dem Vorhandensein von Hormonrezeptoren in den Tumorzellen entschieden (RKI Hamburg, ohne Jahr). Es gilt hierbei abzuwägen, ob der Patientin mit einer Operation, einer Radio-, einer Chemo- oder einer Hormontherapie am meisten geholfen ist. Bei fortgeschrittenem Stadium des Mammakarzinoms stellt die systemische, medikamentöse Behandlung die erste Wahl dar. Chemotherapie alleine, oder bei positivem Hormonrezeptorstatus in Kombination mit einer endokrinen Therapie, kann in allen Altersgruppen unter 70 Jahren (besonders unter 50 Jahren) das Gesamtüberleben verbessern (Breastcancer org., ohne Jahr).

1.4 Antiöstrogene Therapie des Mammakarzinoms

Viele Patientinnen leiden heutzutage an einem hormonrezeptorpositiven Mammakarzinom. Zweidrittel der Brustkrebspatientinnen zeigen eine Überexpression des ER α zum Zeitpunkt der Diagnose. Diese Arten von Mammakarzinomen werden erfolgreich durch Antiöstrogen-Therapie mit sogenannten selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) und /oder Aromatasehemmern behandelt. Eine Tamoxifen-behandlung ist möglichst nach operativer Tumorentfernung indiziert (Stierer et al., 1993). Der geringe Anteil an Frauen, dessen Tumor einen Mangel an Hormonrezeptorprotein aufweist, jedoch Progesteronrezeptoren enthält, kann durchaus von einer Hormontherapie profitieren (National Institutes of Health, 2000). Da hormonabhängige Brustkrebszellen Östrogen zum Wachstum benötigen, ist das Ziel der Hormontherapie, diese Krebszellen vor der Stimulation durch das weibliche Geschlechtshormon zu bewahren. Östrogenentzug der Zellen, kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden (Jonat, 2001).

1896 entdeckte Beatson erstmals die Hemmung des Brustkrebswachstums bei primär inoperablen, prämenopausalen Patientinnen durch Ovariectomie (Beatson, 1896). Die Alternative zur radiologischen oder chirurgischen ovariellen Ablation bestand später in der medikamentösen Ausschaltung der Eierstockfunktion.

Tamoxifen (Nolvadex®) ein orales, nicht steroidales Antiöstrogen, welches 1973 auf den Markt kam, wirkt durch Blockierung des Östrogenrezeptors. Es gehört zu den SERMs. Toremifen und Droloxifen, die eine ähnliche Struktur wie Tamoxifen aufweisen, gehören ebenfalls zu den SERMs, genauso wie Raloxifen, welches sich hingegen in der Struktur von Tamoxifen unterscheidet. Diese drei Arzneimittel stellen eine neue Medikamentengruppe zur Anti-ER-Therapie dar.

Die Einnahme von Aromatasehemmern, wie z.B. Anastrozol (Arimidex®), welches 1995 in Deutschland zugelassen wurde und das erste Präparat dieser neuen Arzneimittelklasse darstellte, bewirkt eine Blockade der Östrogensynthese durch Hemmung des Enzyms Aromatase bei postmenopausalen Frauen.

LHRH-Agonisten werden zur Therapie von fortgeschrittenem Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen mit hormonsensibler Erkrankung verwendet. Goserelin (Zoladex®) gehört zur Gruppe der Regulatorprotein-Agonisten der Hirnanhangsdrüse und erhielt 1990 seine Erstzulassung in der EU (Osborne et al., 2002).

Da Tumorzellen jedoch über längere Behandlungszeiträume eine Resistenz gegen diese Hormontherapien entwickeln können und die Therapie mit Antiöstrogenen oft starke Nebenwirkungen mit sich bringen, ergibt sich der Bedarf an neuen Arzneimitteln, gegen die der Tumor noch nicht resistent ist (Boccardo et al., 2006).

Fulvestrant (Faslodex®) wurde im Jahr 2002 in den USA und Brasilien zugelassen und 2004 konnte der reine steroidale Östrogen-Antagonist auch in Europa seine Zulassung erlangen, wodurch tausenden Frauen mit östrogenrezeptorpositivem Brustkrebs geholfen werden kann. Fulvestrant gehört zu der Substanzgruppe der SERDs (ER-destabilisierender „selective downregulator“). Durch Bindung an dem Östrogenrezeptor der Brustkrebszelle und somit verursachter Downregulation wirkt Fulvestrant ähnlich wie Tamoxifen. Allerdings liegt der Unterschied dieser beiden Medikamente in der genauen Wirkungsweise des Östrogens. Da Tamoxifen die Östrogenwirkung nachahmt und somit zu unerwünschten Nebenwirkungen führen kann, basiert die Wirkungsweise von Fulvestrant hingegen auf der Blockade und dem Ausschalten der Östrogenrezeptoren in den Mammakarzinomzellen und ahmt die Wirkung von Östrogen somit nicht nach. Durch dieses Wirkungsphänomen besteht unter seiner Anwendung auch keine erhöhte Gefahr, einen Tumor der Gebärmutter Schleimhaut zu entwickeln. In einer Studie von Steger et al., die auf dem ASCO 2003 vorgestellt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Verträglichkeit von Fulvestrant sehr gut ist und nur geringe Nebenwirkungen beobachtet werden (Howell et al., 2002).

Bei der antihormonellen Therapie darf man nicht die Nebenwirkungen dieser Medikamente außer Acht lassen, denn Antiöstrogene können zu ausgeprägten unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen. So kommt es häufig zu Hitzewallungen, verstärkt

unter Tamoxifeneinnahme. Die Patientinnen klagen oft über Übelkeit, Erbrechen, Schlaflosigkeit, Hautveränderungen und Vaginalblutungen. Zwar steigt bei Langzeittherapie die Knochendichte der behandelten Frauen an und Knochenbrüchen wird somit vorgebeugt, jedoch besteht außerdem die Gefahr von Thromboembolien und das Risiko für die Entwicklung einer Endometriumhyperplasie bis zum Endometriumkarzinom steigt an, was die Notwendigkeit zu regelmäßigen Vaginaluntersuchungen mit sich zieht (Weed, ohne Jahr). Aromataseinhibitoren haben im Gegensatz zu Tamoxifen geringere Nebenwirkungen. Sie haben keinen Einfluss auf die Gebärmutterschleimhaut, jedoch können auch sie zu Übelkeit und Ausdünnung der Haare führen (Ludwig, 2008). Allerdings ist zu beachten, dass Aromatasehemmer den Östrogengehalt in allen Körperzellen vermindern, so dass die Knochendichte abnehmen kann und manche Patienten unter Gelenkschmerzen leiden. Die Patientinnen, die Aromatasehemmer einnehmen, müssen regelmäßige Kontrollen der Knochendichte durchführen lassen (Eisen et al., 2007).

Laut der Breast International Group (BIG) 1-98 Studie haben Brustkrebspatientinnen unter Aromatasehemmern ein geringeres Risiko kardiale Problemen zu entwickeln, als unter Antiöstrogenen. Trotzdem empfiehlt es sich regelmäßig die Herzaktivität zu prüfen (Mouridsen et al., 2007).

In der noch laufenden ATAC-Studie (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) wird seit Ende 1998 die adjuvante Therapie mit dem Aromatasehemmer Anastrozol gegenüber der Behandlung mit Tamoxifen und der Kombination aus beiden Medikamenten verglichen. Nach einem Beobachtungszeitraum von vier Jahren traten in der Anastrozol-Gruppe relativ zur Tamoxifen-Gruppe 17% weniger Rezidive auf, bei gesicherten hormonrezeptorpositiven Patientinnen waren es sogar 22% weniger. Der absolute Unterschied bezüglich Krankheitsfreiheit betrug nach 47 Monaten bei rezeptorpositiven Frauen 2.9%. Die Intensität der Nebenwirkungen zeigte, dass Anastrozol wesentlich besser vertragen wird, als Tamoxifen. Vaginalblutungen, Thromboembolien und zerebrovaskuläre Ereignisse traten nur halb so oft auf. Auch konnte belegt werden, dass Endometriumkarzinome unter Anastrozolbehandlung ca. 85% seltener auftraten.

Das Resultat dieser Ergebnisse war die Zulassung von Anastrozol in Deutschland als erster Aromatasehemmer für die adjuvante Therapie bei Frauen in der Postmenopause im Dezember 2002 (Budzar et al., 2000).

Exemestan (Aromasin®) kam 2000 auf den pharmazeutischen Markt in Deutschland. Dieser steroidale Aromatasehemmer kann oral eingenommen werden und zeigt in der Studie von Dirix et al. einen deutlichen Wirksamkeitsvorteil gegenüber Tamoxifen.

Exemestan ist bisher für die Behandlung metastasierter, hormonpositiver Mammakarzinome nach Therapieversagen zugelassen (Dirix et al., 2001).

Sechs Jahre später konnte sich Letrozol unter dem Handelsnamen Femara® zur endokrinen Erstlinientherapie bei metastasiertem, hormonrezeptorpositivem Brustkrebs in Deutschland durchsetzen. In der Studie von Mouridsen et al. konnte ein signifikanter Wirksamkeitsvorteil gegenüber Tamoxifen aufgezeigt werden (Mouridsen et al., 2001). Paepke untersuchte in seiner Studie auch die neoadjuvante Situation, wobei bewiesen wurde, dass durch die präoperative Einnahme von Letrozol wesentlich mehr Frauen brusterhaltend operiert werden konnten, als dies in der Tamoxifen-Gruppe der Fall war (Paepke et al., 2000).

1.5 Untersuchungsverfahren

Die Immunhistochemie (IHC), deren Verfahren bereits in den 40er Jahren angewendet wurde, gehört heute zu der Routinediagnostik bei Tumorerkrankungen.

Die Immunhistochemie stellt den Sammelbegriff für verschiedene Methoden, die zur Darstellung von zell- und gewebespezifischen Antigenen verwendet werden. Mit Hilfe von Antikörpern werden die Antigene in situ markiert und visualisiert. Durch den spezifischen Nachweis von Proteinen erlaubt die IHC die Darstellung von Zellen mit gleichen funktionellen Eigenschaften oder Zellen mit gleicher Histogenese, welches einen entscheidenden Aspekt für die Anwendung in der Tumordiagnostik erfüllt (Daabs et al., 2001). Albert H. Coons und seine Mitarbeiter waren die ersten Forscher, die Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten und diesen zur Identifikation von Antigenen in Geweben nutzten (Coons et al., 1941).

Im Laufe der Entwicklung der IHC-Techniken wurden Enzymmarkierungen wie Peroxidase (Nakane and Pierce 1966) und alkalische Phosphatase (Mason and Sammons 1978) eingeführt.

Seitdem die Immunhistochemie mit speziellen Antigen-Antikörper-Reaktionen einhergeht, zeigt sich ein ersichtlicher Nutzen der besonderen Färbetechniken von Enzymen, die eine bestimmte Anzahl an Proteinen und Gewebestrukturen identifizieren können (Javois, ohne Jahr).

Mehr Information zur Technik und Durchführung der IHC wird im Teil „Material und Methoden“ aufgeführt.

1.6 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Östrogenrezeptorstatus in einem Kollektiv von 814 Mammakarzinomen zu bestimmen. Zur Detektion von Veränderungen der ESR1-Genkopiezahl wird die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Das Niveau der ER- Proteinexpression wird immunhistochemisch bestimmt. Die erhaltenen Daten sollen hinsichtlich folgender Fragestellungen ausgewertet werden:

- Wie reproduzierbar ist die Bestimmung der ESR1-Genkopiezahl mittels FISH?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen der ESR1-Genkopiezahl und der ER-Proteinexpression?
- Gibt es einen Unterschied zwischen dem bekannten ER-Status der Patienten und den Ergebnissen vom TMA?

2 Material und Methoden

2.1 Gewebekollektiv

Insgesamt 814 östrogenrezeptor-positive Mammakarzinome wurden aus der Pathologiepraxis Altonaer Strasse (UKE MVZ) zur Herstellung eines TMA verwendet. Die Tumoren wurden aufgrund des ER-Status aus den Patientenakten ausgewählt. Das mittlere Alter der Patientinnen beträgt 56 (27-91) Jahre. Klinische Follow-up-Daten wurden aus den Patientenakten ermittelt oder durch gezieltes Nachfragen bei den behandelnden Ärzten erhoben. Insgesamt lag von allen 814 Patientinnen der Überlebensstatus vor. Das mittlere Follow-up-Intervall betrug 52.87 (0.00- 130.69) Monate. Daten zu einer möglichen Rezidivierung konnten von 803 Patientinnen erhoben werden. Die histologischen Schnitte eines jeden Tumors wurden von einem Pathologen (Dr. Volker Scotland) begutachtet, um den histologischen Tumortyp zu definieren und den histologischen Grad festzustellen.

Daten zur Östrogenrezeptorexpression konnten bei 812 der 814 Patienten aus den Patientenakten entnommen werden. Der ER-Status war immunhistochemisch mit dem Antikörper anti-ER (Novocastra 6F11) zur initialen Diagnostik untersucht worden. Die histopathologischen Daten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Histologisch-pathologische Daten von 814 Mammakarzinomen

Insgesamt		n= 814
Histologie	duktal	ca. 501
	lobulär	ca. 249
	medullär	ca. 13
	muzinös	ca. 12
	papillär	ca. 4
	tubulär	ca. 33
	platteneithelial	2
Tumorstadium	pT1	464
	pT2	286
	pT3	44
	pT4	20
Grading	G1	166
	G2	524
	G3	123
Lymphknotenbefall	pN0	544
	pN1	244
	pN2	26
ER-Status		n= 812
	positiv	695
	negativ	117

2.2 TMA-Herstellung

Mit Hilfe des Tumorarray-Verfahren konnte das Einbringen von zahlreichen Gewebeylindern (Durchmesser 0.6 mm) von histologisch definierten Regionen verschiedener Tumoren in einen einzigen Paraffinblock gewährleistet werden. Aus jedem der 814 Gewebelöcke wurden bestimmte Areale gekennzeichnet und mit Hilfe einer Stanze auf einem Objektträger untergebracht. Diese Methode ermöglichte es, mit einmaliger Applikation eines Antikörpers zahlreiche Proben zu analysieren. Der geringe Materialverbrauch stellt einen wesentlichen Vorteil dar. Die Funktionsweise des „Arrayers“ ist in Abb. 1 dargestellt.

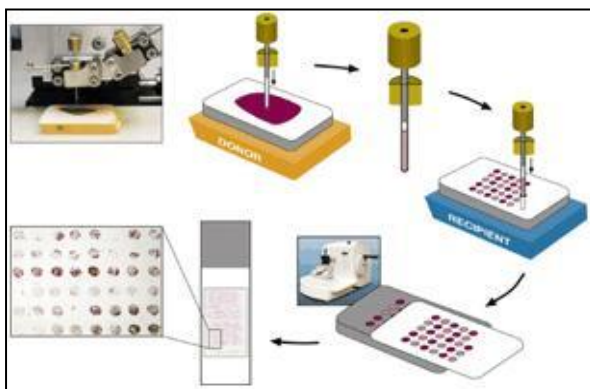


Abb. 1: Tumorarray-Herstellung

Die Abbildung 1 zeigt den Ablauf der Tumorarray-Herstellung. Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600 µm), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender

Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen der Gewebestücke in mit einem analogen Instrument (äußerer Durchmesser ca. 600 µm) vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumorarray). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock.

Teil **a** Abbildung 2 zeigt das Array-Stanzgerät. Kernstück der Konstruktion sind zwei an der Spitze geschärfte Hohlzylinder. Die kleinere "Nadel" hat einen äußeren Durchmesser von 0.6 mm. Diese Nadel wird ausschließlich zum Stanzen von Löchern in die Empfängerblöcke verwendet. Die dickere Nadel dient dem Ausstanzen von Tumorgewebestücken aus Spenderblöcken und das Einbringen dieser Zylinder in den Empfängerblock. Der innere Durchmesser dieser zweiten Nadel entspricht dem äußeren Durchmesser der dünneren Nadel. Teil **b** der Abbildung zeigt einen Block des TMAs, wobei **c** einen Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitt eines TMAs darstellt.

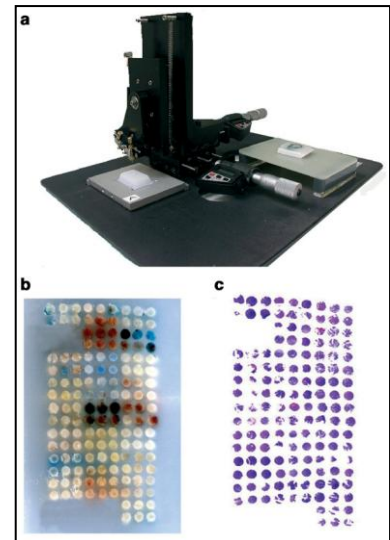


Abb. 2: Tissue-Microarray (TMA)

2.3 Immunhistochemie

Um das ER α -Protein am TMA immunhistochemisch zu detektieren wurden zwei verschiedene monoklonale Antikörper verwendet:

- 1) NCL-L-ER-6F11 (Novocastra, Newcastle, UK),
- 2) Anti human estrogen receptor alpha, clone ID5 (DAKO #M7047).

Die Schnitte wurden entparaffiniert und für 12 Minuten bei 120°C unter Druck in einem pH6-Citratpuffer (Retrievit #BS-1006-00, BioGenex, San Ramon, CA) inkubiert. Nach Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte im verdünnten Primäantikörper bei 4°C über Nacht inkubiert (NCL-L-6F11, 1:1000; anti ER DAKO, 1:250). Um die Antikörperbindung nachzuweisen wurde das „DAB (3,3-Diaminobenzidin)-System“ benutzt. Das detaillierte Protokoll ist nachfolgend dargestellt.

I. Vorbereitung der Objektträger

- TMAs mindestens 1Std. in Xylol entparaffinieren
- durch eine absteigende Alkoholreihe (96%, 90%, 80%, 70%, Aqua dest.) entwässern

II. Vorbehandlung

- Objektträger in Citratpuffer pH6 für 12min bei 120°C autoklavieren
- Objektträger in TBS-Puffer (Tris-gepufferte Salzlösung: 3g Tris, 8g NaCl, 0.2g KCl, 2ml Tween, 20 je 1000ml, pH auf 7.6 einstellen) für 5min spülen

III. Peroxidase-Block

- Objektträger in 1% H₂O₂ in Methanol für 10min bei Raumtemperatur spülen
- Objektträger in TBS-Puffer 2x5min spülen

IV. Antikörper-Inkubation

- den Primär-Antikörper in TBS-Puffer verdünnen (NCL-L-6F11 1:1000, DAKO 1:250) und für 2Std. in einer feuchten Kammer bei 30°C inkubieren
- Objektträger in TBS-Puffer 2x5min spülen
- Objektträger in EnVision Polymer-HRP Maus – Lösung (Dako K4001) für 30min bei 30°C inkubieren
- Objektträger in TBS-Puffer 2x5min spülen

V. Chromogen

- Objektträger in DAB-Chromogen (Liquid DAB DAKO K3468) für 10min bei Raumtemperatur inkubieren
- Objektträger in Aqua dest. für 1min spülen
- Objektträger in Haemalaun-Lösung für 1min gegenfärben und anschließend für eine weitere Minute unter Leitungswasser spülen
- Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 96%) und in Xylol entwässern
- mit Eukitt eindeckeln

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 (0-5) unterteilt. Die Kombination beider Parameter resultierte in einer 8-Punkte-Skala (score), wobei alle Proben mit einer Punktzahl über zwei als ER-positiv gewertet wurden. Für den Vergleich mit dem bekannten ER-Status aus den Patientenakten wurden die Tumoren in drei Gruppen eingeteilt: negativ (score 0-2), schwach (score 3-5) und stark (6-8).

2.4 FISH

Zur Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde eine selbst hergestellte Sonde gegen ESR1 benutzt. Die Sonde war aus klonierter DNA (BAC, bacterial artificial chromosome) hergestellt worden (Holst et al., 2007)

2.5 Hybridisierung und Detektion

2.5.1 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. Zur Hybridisierung wurden eine selbst hergestellte genspezifische Sonde (6q25.1; RP11-450E24) und eine kommerzielle Sonde als Referenz für das Zentromer des Chromosoms 6 (Spectrum orange Vysis) eingesetzt. Die kommerzielle Zentromersonde 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 codenaturiert und über Nacht bei 37°C hybridisiert. Sowohl Denaturierung als auch Hybridisierung wurden im Hybrite (Vysis) 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 Sonde über einen Komplex von drei Antikörpern detektiert, wobei der Tertiärantikörper fluoreszenzgekoppelt war. Hierzu wurde das „Enhancer Detection Kit“ von Roche eingesetzt.

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 ($\text{Ratio ESR1/Zen } 6 \geq 2$) definiert. Gewebeprobe, die eine ESR1/Zentromer 6-Ratio von über 1.0, aber unter 2.0 aufwies (> 1.0 Ratio ESR1/Zen6 < 2.0), wurden als „Gains“ bezeichnet. Alle anderen Gewebeprobe (Ratio ESR1/Zen6 ≤ 1.0) wurden als normal definiert. Beispiele für ESR1-Amplifikationen sind in Abbildung 3 a-d dargestellt.

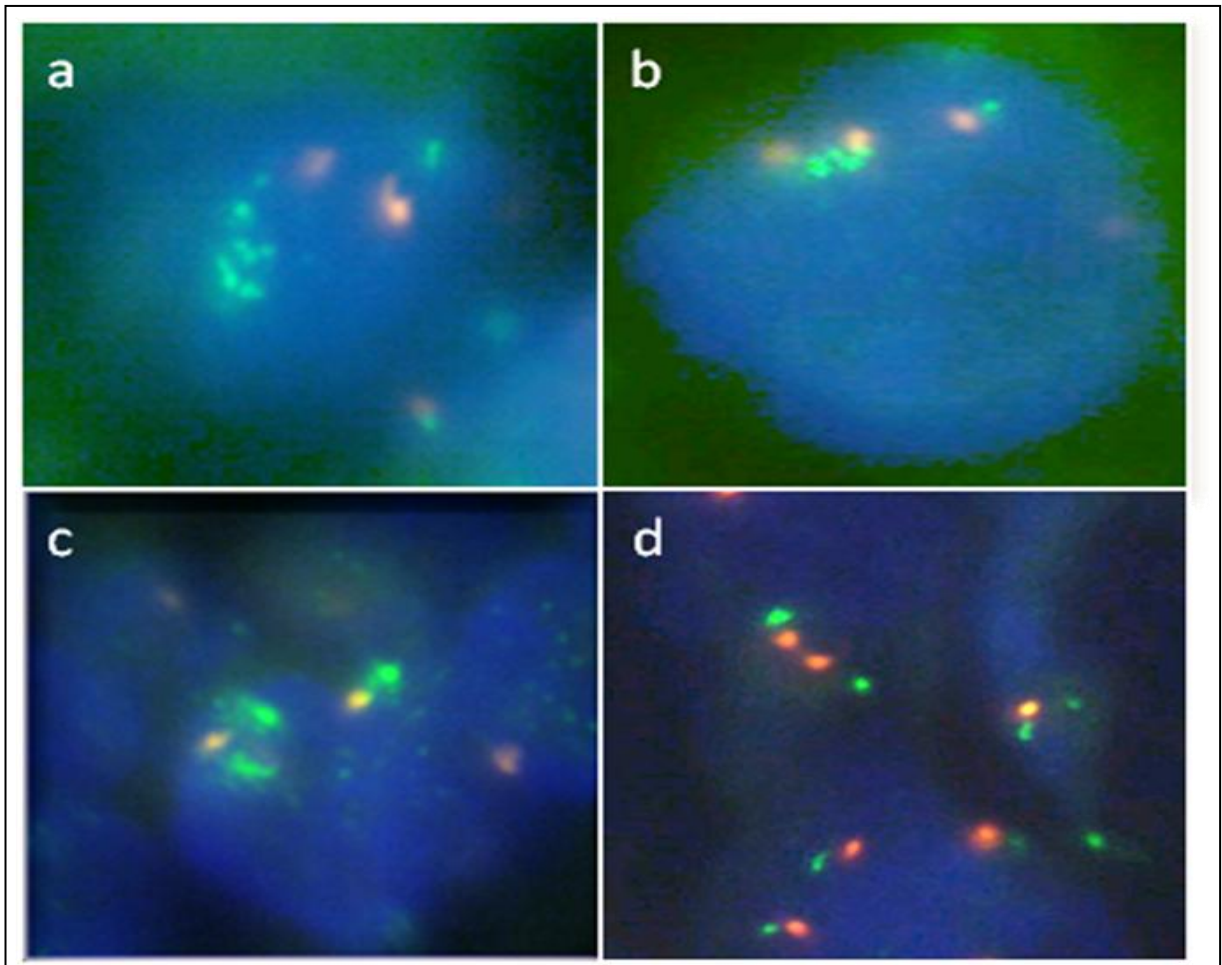


Abb. 3: Beispiele von ESR1-amplifizierten Tumorzellen (3 a-d). Die grünen Signale markieren die ESR1-Gensequenz, die roten Signale das Zentromer 6. 3 a) Große Gruppe mit 8-9 grünen ESR1-Signalen, b) Kleine Gruppe von 4-5 Signalen, c) Winzige Gruppen mit zusammenfließenden Signalen, d) Normale Zellen mit 2 ESR1-Signalen

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 24x32mm Deckgläschen eingedeckt.

Um den Zusammenhang zwischen histologischem Tumortyp, Grad des Tumors, „Staging“ und Genamplifikationen darzustellen, wurden die „Contingency table analysis“ und der Chi-Quadrat-Test angewandt.

3 Resultate der ESR1-Amplifikationen

3.1 Reproduzierbarkeit der FISH-Ergebnisse

Die FISH wurde zweimal an verschiedenen Tagen durchgeführt und von zwei verschiedenen Personen (Frederik Holst, Franziska Reining) ausgewertet. Frederik Holst ist ein Experte in dem Themengebiet der ESR1-Amplifikationen, wohingegen Franziska Reining eine Medizinstudentin ist, die in FISH-Auswertungen angelernt wurde.

Bei der FISH-Analyse I (Frederik Holst) konnten 689 (84.6%) der 814 Tumoren erfolgreich ausgewertet werden. Für die restlichen 125 Tumoren konnte der ESR1-Status nicht bestimmt werden, weil entweder keine Signale in der FISH-Analyse zu sehen waren, oder weil der Gewebespot während des Hybridisierungsexperimentes abgeschwommen ist. Eine ESR1-Amplifikation wurde in 165/689 Tumoren (23.9%) gefunden. Ein geringgradiger Zugewinn (Gain) der ESR1-Kopiezahl wurde in weiteren 28 (4%) Tumoren gefunden.

Bei der FISH-Analyse II (Franziska Reining) konnten 579 (71.1%) Tumoren ausgewertet werden. In dieser Analyse waren 22 Spots nicht auswertbar, weil das Gewebe während der Analyse zerstört wurde. Alle anderen nichtauswertbaren Spots zeigten keine deutlichen Hybridisierungssignale. In dieser Analyse wurde eine Amplifikation in 179/579 (30.9%) und ein Gain in 69/579 (11.9%) der Gewebeproben diagnostiziert.

Von insgesamt 523 Gewebespots konnten Daten in beiden Analysen erhoben werden. Es zeigte sich, dass die Reproduzierbarkeit am besten bei den Tumoren war, die in der ersten Analyse ein „klares“ Ergebnis, d.h. entweder eine normale Kopiezahl oder eine Amplifikation, zeigten. In beiden Fällen zeigten 77% der Tumoren in der zweiten Analyse ein identisches Ergebnis. Im Gegensatz dazu fand sich eine deutlich geringere Übereinstimmung bei den Tumoren, die in der ersten Analyse als „Gain“ beurteilt worden waren. Dieses Ergebnis konnte nur in 27% der Fälle reproduziert werden. Die Mehrzahl dieser Proben wurde in der zweiten Analyse als amplifiziert gewertet. Die direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Analysen ist in Abbildung 4 gezeigt.

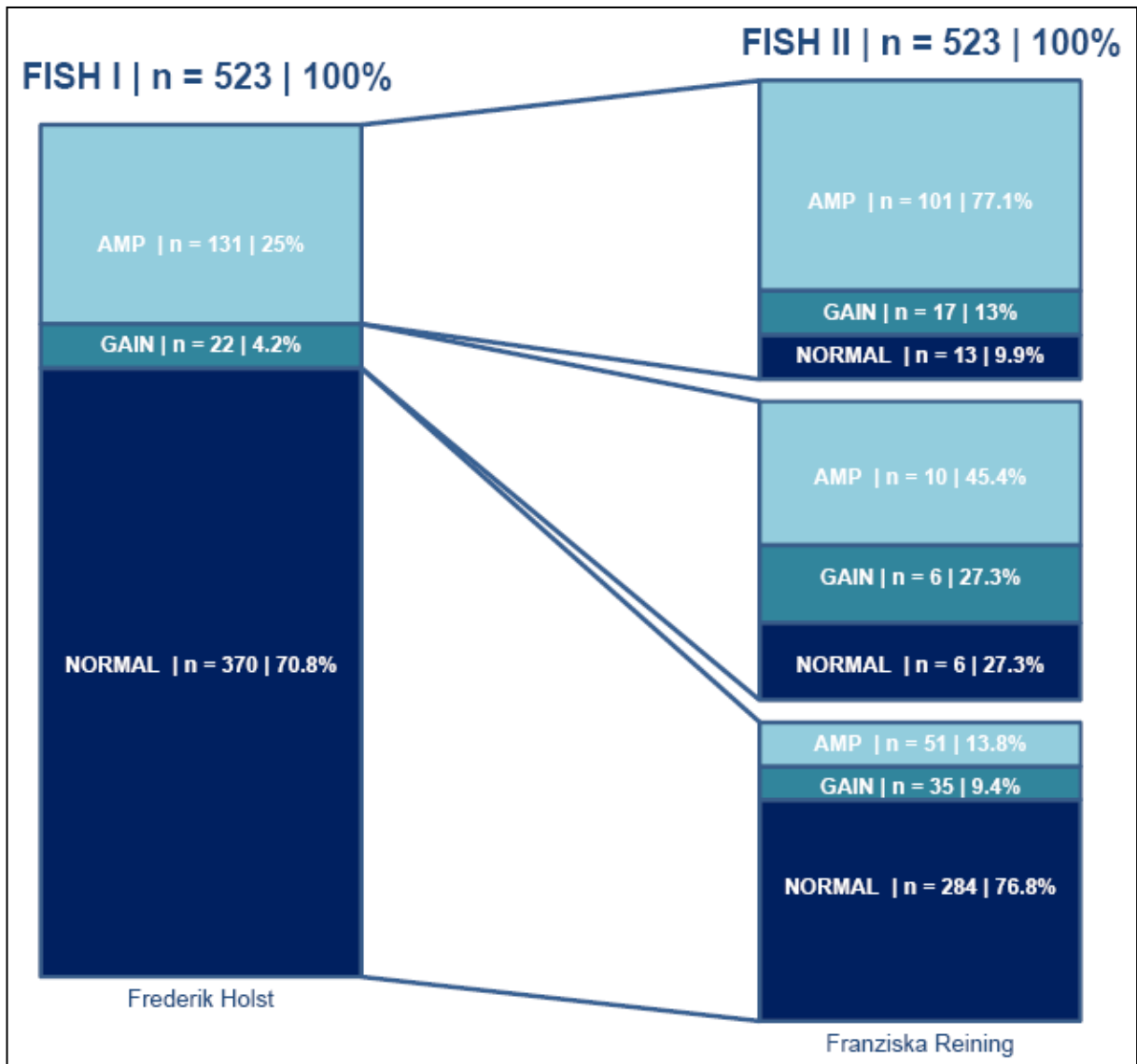


Abb. 4: Vergleich der 2 FISH-Analysen

Ein stark abweichendes Ergebnis, d.h. ein normales Ergebnis in der einen Analyse und eine Amplifikation in der anderen Analyse, wurde in 64 Tumoren gefunden. Bei 51 von diesen 64 Fällen wurde in der FISH-Analyse I (Frederik Holst/ FH) ein normales Ergebnis gefunden, jedoch in der Analyse II Franziska Reining/ FR) eine Amplifikation. Bei den restlichen 13 Tumoren zeigte Analyse I (FH) eine Amplifikation, während in Analyse II (FR) ein normales Ergebnis gefunden wurde. Die FISH-Ergebnisse dieser nachbeurteilten Gewebe sind in Tabelle 2 im Detail dargestellt.

Tabelle 2: Diskordante Spots

Analyse FH: normal;		Analyse FR: Amplifikation				Analyse FH: Amplifikation;		Analyse FR: normal			
Array	Lokalisation	ESR1_1	C6_1	ESR1_2	Cen6_2	Array	Lokalisation	ESR1_1	C6_1	ESR1_2	Cen6_2
BrScot_2	B 8h	2	2	15	2	BrScot_1	A 9f	8	2	2	2
BrScot_1	C 4d	2	2	10	2	BrScot_1	C 4b	4	2	2	2
BrScot_1	C 8i	2	2	9	2	BrScot_1	C 5g	4	2	3	3
BrScot_1	A 3f	2	2	8	2	BrScot_1	D 3l	5	1	2	2
BrScot_2	A 1c	2	2	8	2	BrScot_1	D 6f	5	2	2	2
BrScot_1	B 1m	2	2	7	2	BrScot_2	A 6h	4	2	2	2
BrScot_1	D 5l	2	2	7	2	BrScot_2	A 6l	5	1	2	2
BrScot_2	A 6e	2	2	7	2	BrScot_2	A 8l	6	2	2	2
BrScot_2	B 2g	3	1	7	2	BrScot_2	B 2l	5	1	2	2
BrScot_2	B 3f	4	1	7	2	BrScot_2	B 3d	6	2	3	3
BrScot_2	B 7p	2	2	7	2	BrScot_2	B 7e	4	2	2	2
BrScot_2	A 9n	2	2	10	3	BrScot_2	C 1e	8	2	2	2
BrScot_1	B 3h	2	2	6.5	2	BrScot_2	C 1f	5	2	2	2
BrScot_1	B 1o	2	2	6	2						
BrScot_1	B 3q	2	2	6	2						
BrScot_2	A 3b	4	1	6	2						
BrScot_2	A 6g	2	2	6	2						
BrScot_1	B 6o	2	2	5.5	2						
BrScot_2	A 8b	2	2	5.5	2						
BrScot_2	A 9d	4	1	5.5	2						
BrScot_2	B9d	2	2	5.5	2						
BrScot_1	B 4o	2	2	8	3						
BrScot_1	B 7m	2	2	7.5	3						
BrScot_2	A 8o	2	2	7	3						
BrScot_1	A 9l	2	2	4.5	2						
BrScot_1	B 3b	2	2	4.5	2						
BrScot_1	B 5e	2	2	4.5	2						
BrScot_1	B 7f	2	2	4.5	2						
BrScot_1	B 8k	2	2	4.5	2						
BrScot_1	B 9g	2	2	4.5	2						
BrScot_2	A 3k	2	2	4.5	2						
BrScot_2	A 4g	2	2	4.5	2						
BrScot_2	A 9c	2	2	4.5	2						
BrScot_2	A 9e	2	2	4.5	2						
BrScot_2	B 3q	2	2	4.5	2						
BrScot_2	B 7n	2	2	4.5	2						
BrScot_2	C 2h	2	2	4.5	2						
BrScot_1	C 8a	2	2	5.5	2.5						
BrScot_1	D 1k	2	2	5.5	2.5						
BrScot_1	D 1l	2	2	5.5	2.5						
BrScot_1	A 2r	2	2	4	2						
BrScot_1	A 9g	2	2	6	3						
BrScot_1	A 9p	2	2	4	2						
BrScot_1	B 5l	2	2	4	2						
BrScot_1	B 8p	2	2	6	3						
BrScot_2	A 6q	2	2	6	3						
BrScot_2	A 8f	2	2	4	2						
BrScot_2	B 1p	2	2	4	2						
BrScot_2	B 2a	2	2	4	2						
BrScot_2	B 3g	2	2	4	2						
BrScot_2	C 1k	2	2	4	2						

Es zeigt sich, dass in der Mehrzahl dieser Fälle nur geringfügige Unterschiede in der ESR1-Kopiezahl zu einer unterschiedlichen Einordnung geführt haben. So zeigen z.B. 11 Tumoren in der einen Analyse 4 ESR1-Signale und in der anderen Analyse nur 2 Signale, die bei normaler Zentromer-Kopiezahl (2 Signale) einmal als amplifiziert und einmal als normal gewertet wurden.

Allerdings fielen auch etwa 30 Tumoren auf, die z.T. erhebliche Unterschiede in der ESR1-Genkopiezahl in den beiden Analysen aufwiesen. Um diese Diskrepanz näher zu untersuchen, wurde die ESR1-Analyse ein drittes Mal wiederholt. Um zu klären, ob diese Unterschiede auf einer möglichen Heterogenität des Gewebes oder auf Zählfehlern in der einen oder anderen Analyse beruhten, wurden konventionelle Grossschnitte der Tumoren untersucht. Die am TMA untersuchten Tumorareale wurden aus diesen Präparaten entnommen.

Von allen der 23 untersuchten Tumoren konnte am Grossschnitt der ESR1-Status ermittelt werden. Es zeigte sich, dass die Ergebnisse dieser Analyse besser mit der zweiten TMA-Auswertung übereinstimmten als mit der ersten. So war die Übereinstimmung zwischen FISH I (FH) und der Grossschnittanalyse 21.7%, jedoch zwischen FISH II (FR) und der Grossschnittanalyse 86.9%. Allerdings handelte es sich bei den meisten diskrepanten Fällen nur um geringfügige Abweichungen, wobei die Zählungen der ESR1-Kopiezahl nur um 1-2 Signale voneinander abwichen. Diese Abweichungen führten jedoch zu einer unterschiedlichen Klassifikation bezüglich des ESR1-Amplifikationsstatus. Der direkte Vergleich der TMA-Analysen mit den Grossschnitten dieser 23 Tumoren ist in Abbildung 5 dargestellt, wobei Tumoren mit einer nur geringfügigen Abweichung und einer ESR1/Zentromer 6 Ratio zwischen 1.8 und 2.2 als „Borderline“ (grenzwertig) dargestellt sind.

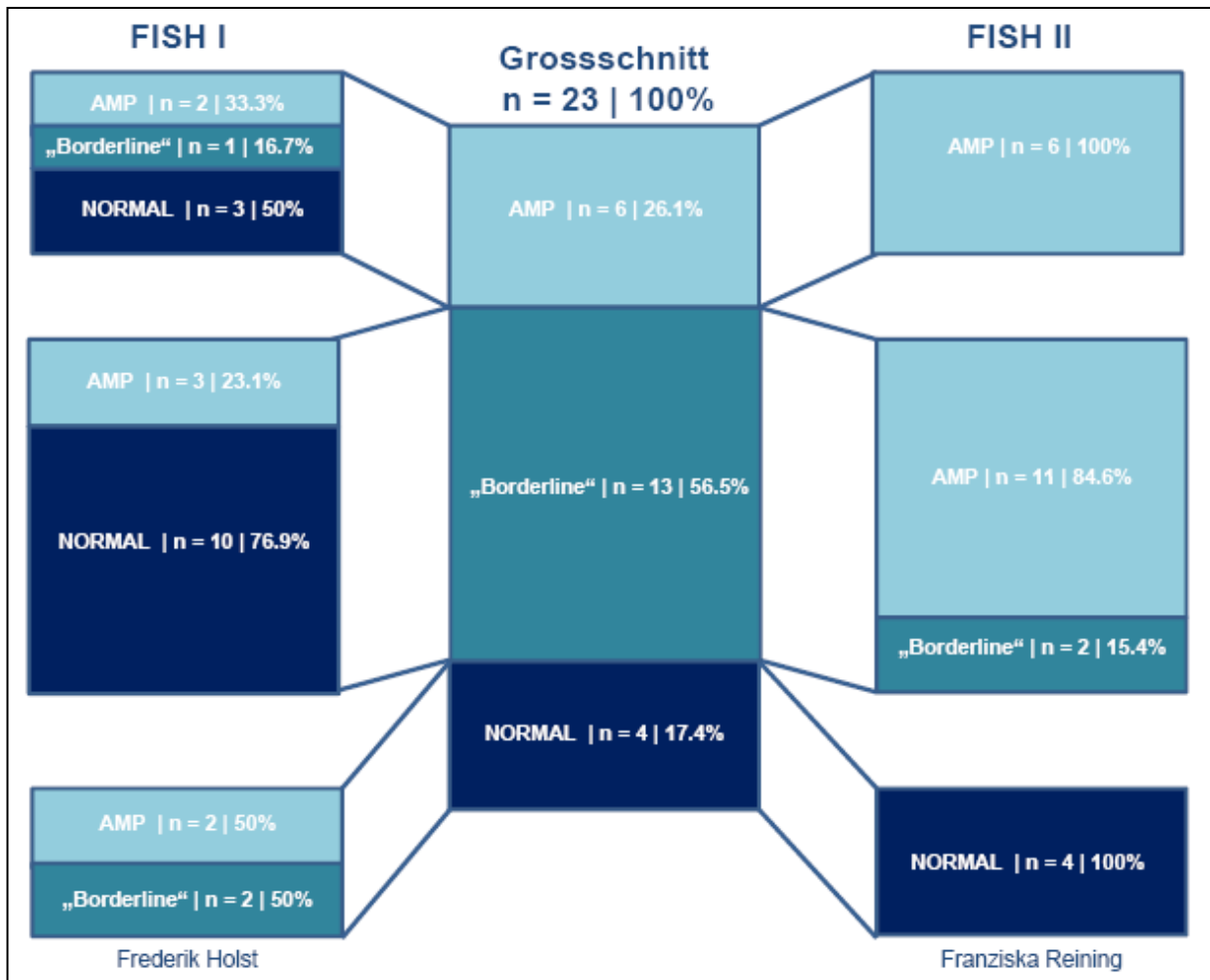


Abb. 5: Vergleich der 2 TMA-Analysen mit dem Grossschnitt der 23 Tumoren

3.2 Reproduzierbarkeit der IHC-Ergebnisse

3.2.1 Initiale Analyse mit dem Novocastra-Antikörper an Grossschnitten

Ein Ergebnis der immunhistochemischen Analyse der ER-Expression konnte aus den Patientenakten von 812 Tumoren des TMA erhalten werden. Der ER-Expressionsstatus war mit negativ (keine Expression, 117, 14.4%), schwach (46, 5.7%) oder stark (649, 79.9%) angegeben. Die ER-Expression war wie erwartet mit gut differenzierten (G1, $p < 0.0001$), frühen (pT1, $p < 0.0001$) Mammakarzinomen assoziiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: ER IHC-Resultat Novocastra (Grossschnitt)

	TMA-Statium	n	negativ(%)	schwach(%)	stark(%)	p
alle Tumoren		812	14.4	5.7	79.9	
Tumorstadium	pT1	464	9.9	4.7	85.4	0.0007
	pT2	285	21.8	6.3	71.9	
	pT3	43	16.3	9.3	74.4	
	pT4	20	10.0	10.0	80.0	
Grading	G1	166	3.6	2.4	94.0	<0.0001
	G2	523	9.4	6.3	84.3	
	G3	123	50.8	7.4	41.8	
Lymphknotenbefall	pN0	543	13.8	5.0	81.2	0.6490
	pN1	243	16.0	7.0	77.0	
	pN2	26	11.5	7.7	80.8	

3.2.2 Reanalyse mit dem DAKO-Antikörper am TMA

Die immunhistochemische Analyse der ER-Expression war in 771 (94.7%) der 814 Tumoren des Arrays erfolgreich. Insgesamt 43 Tumoren waren nicht analysierbar, weil entweder keine Tumorzellen im Gewebespot vorhanden waren oder weil der Gewebespot auf dem TMA fehlte. Mindestens eine schwache ER-Expression wurde in 616/771 (79.9%) der analysierbaren Tumoren gefunden. Davon zeigt der überwiegende Teil (573/616) der ER-positiven Tumoren eine starke Expression (Tabelle 3). Die ER-Expression war mit gut differenzierten (G1, $p < 0.0001$), frühen (pT1, $p = 0.0088$) Mammakarzinomen assoziiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: ER IHC-Resultat DAKO (TMA)

	TMA-Statium	n auf TMA	n analysierbar	negativ(%)	schwach(%)	stark(%)	p
alle Tumoren		814	771	20.1	5.6	74.3	0.0088
Tumorstadium	pT1		428	15.4	6.1	78.5	0.0084
	pT2		280	27.1	4.3	68.6	
	pT3		44	25.0	6.8	68.2	
	pT4		19	10.5	10.5	79.0	
Grading	G1		151	6.0	6.6	87.4	<0.0001
	G2		501	15.2	6.0	78.8	
	G3		119	58.8	2.5	38.7	
Lymphknotenbefall	pN0		510	19.2	4.1	76.7	0.0913
	pN1		236	22.5	8.1	69.4	
	pN2		25	16.0	12.0	72.0	

3.3 Vergleich der beiden immunhistochemischen Untersuchungen

Ein direkter Vergleich der beiden verwendeten immunhistochemischen Untersuchungen zeigte nur geringfügige Unterschiede in der Färbeintensität. Von 769 Gewebeproben, die für beide Antikörper auswertbar waren, zeigten 644 ein identisches Ergebnis. Bei den restlichen 125 Tumoren zeigte sich meist nur eine Abweichung um eine Kategorie, z.B. negativ versus schwach oder schwach versus stark. Insgesamt 53 dieser Tumoren hatten jedoch eine deutliche Abweichung, d.h. eine starke Expression mit dem einen Antikörper, aber fehlende Expression mit dem anderen Antikörper. Alle Daten sind in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5: Vergleich der IHC-Resultate der beiden anti-ER Antikörper. $P < 0.0001$

		Grossschnitt-Ergebnis (Novocastra)		
		0	1	2
TMA- Ergebnis (DAKO)	0 (n=102)	93 (91.2%)	2 (1.9%)	7 (6.9%)
	1 (n=41)	15 (36.6%)	6 (14.6%)	20 (48.8%)
	2 (n=626)	46 (7.3%)	35 (5.6%)	545 (87.1%)

3.4 Beziehung zwischen den FISH-Analysen zu den IHC-Daten der beiden Antikörper

Für diese Analyse wurden die FISH-Ergebnisse aus den 3 Analysen (FISH I (FH), FISH II (FR) und Grossschnittanalyse) zu einem Konsensusresultat kombiniert. Nur solche Tumoren, die übereinstimmend in der FISH I (FH) und in der FISH II (FR) eine Amplifikation zeigten, wurden als „amplifiziert“ gewertet. Alle anderen Tumoren wurden als nicht amplifiziert („ESR1 normal“) angesehen, es sei denn, der Tumor wurde am Grossschnitt reanalysiert und hatte dort eine Amplifikation gezeigt. Diese Proben wurden dann ebenfalls als „amplifiziert“ klassifiziert. Alle Gewebespots mit nur einem FISH-Ergebnis wurden von der Analyse ausgeschlossen. In der Analyse verbleiben somit 454 (Novocastra/Grossschnitt) bzw. 448 (DAKO/TMA) Tumoren mit kombiniertem FISH-Ergebnis. Ein direkter Vergleich der FISH-Ergebnisse mit den Ergebnissen von den beiden IHC-Analysen zeigte in beiden Fällen eine hoch signifikante Assoziation mit der ESR1-Amplifikation (Novocastra: $p < 0.0001$; DAKO $p < 0.0001$). Es zeigte sich für beide Antikörper, dass mehr als 97% der ESR1 amplifizierten, aber nur etwa 75% der Tumoren mit normaler ESR1 Kopiezahl eine starke ER-Expression aufwiesen.

Der Vergleich des kombinierten FISH-Ergebnisses und der beiden Antikörper ist in den Tabellen 6 und 7 detailliert gezeigt.

Tabelle 6: Vergleich der IHC-Resultate des GS/Novocastra-Experimentes mit den FISH-Befunden. P<0.0001

				negativ	schwach	stark
ESR1	AMP	(FISH	I+II),	0 (0.0%)	3 (2.5%)	116 (97.5%)
(n=119)						
ESR1			Normal	60 (17.9%)	23 (6.9%)	252 (75.2%)
(n=335)						

Tabelle 7: Vergleich der IHC-Resultate des TMA/DAKO-Experimentes mit den FISH-Befunden. P<0.0001

				negativ	schwach	stark
ESR1	AMP	(FISH	I+II),	2 (1.7%)	1 (0.8%)	116 (97.5%)
(n=119)						
ESR1			Normal	72 (21.9%)	14 (4.2%)	243 (73.9%)
(n=329)						

4 Diskussion

Holst et al. hatten 2007 eine signifikante Bedeutung von Amplifikationen des Östrogenrezeptor α kodierenden ESR1-Gens postuliert. An einer Untersuchung von über 2000 Mammakarzinomen fand die Arbeitsgruppe ESR1-Amplifikationen in 20.6% der untersuchten Karzinome. In dieser Arbeit waren ESR1-Amplifikationen hochsignifikant mit einer starken Östrogenrezeptor α -Expression assoziiert. 40–50% der immunhistochemisch stark positiven (ALLRED 7–8) hatten eine ESR-Amplifikation. Trotzdem erwies sich die Amplifikation häufig als nur geringgradig mit einem Zugewinn von nur wenigen ESR1-Gen-Kopien. Dies steht im sehr deutlichem Gegensatz beispielsweise zur HER2-Amplifikation bei der typischerweise die Zahl der HER2-Gene in amplifizierten Zellen mindestens verzehnfacht wird. Eine weitere Besonderheit der ESR1-Amplifikation war ihre Kleinheit. Mapping-Untersuchungen ergaben, dass die ESR1-Amplifikation in ca. zwei Drittel der Fälle nur das ESR1-Gen involviert, während die zentromerisch und telomerisch vorgelegenen Gene nicht mit in das Amplikon eingeschlossen sind.

Auch andere Arbeitsgruppen berichteten über signifikante Häufigkeiten von ESR1-Amplifikationen. Eine argentinische Arbeitsgruppe Nembrodt et al. hatte bereits 1990 mittels Southern Blot-Technik eine ESR1-Amplifikation in 6 von 14 östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen gefunden. Die mangelnde Wahrnehmung dieser Untersuchungsergebnisse ist möglicherweise der Lokalisation der Arbeitsgruppe in Südamerika geschuldet. Andere aktuellere Untersuchungen hatten beispielsweise ESR1-Amplifikationen in 13 von 94 Tumoren gefunden (Ejlertsen et al., 2007). Die Relevanz von ESR1-Amplifikationen konnte aber nicht in allen Laboratorien bestätigt werden. Kürzlich beschrieben vier verschiedene Arbeitsgruppen weitgehend negative Resultate bei ihren Versuchen, ESR1-Amplifikationen in Mammatumorgewebe nachzuweisen. (Brown et al., 2008), Vincent-Salomon et al., 2008, Horlings et al., 2008, Reis-Filho et al., 2008).

Zweck der jetzt vorliegenden Studie war deswegen die Validierung der ESR1-Amplifikation an einem unabhängigen Patientenkollektiv und die Untersuchung der Reproduzierbarkeit von ESR1-FISH-Auswertungen. Die Daten der folgenden Studien machen klar, dass bezüglich ESR1 zumindest ein reproduzierbares FISH-Phänomen vorliegt, das prinzipiell den Kriterien einer Amplifikation entspricht. Diese Aussage wird durch den hochsignifikanten Zusammenhang zwischen den FISH-Befunden des Experten (Frederik Holst) und der „angelernten“ Medizinstudentin Franziska Reining. Die Unterschiede zwischen den beiden Untersuchern sind allerdings für „FISH-Verhältnisse“ dramatisch. Nur wenige Vergleichsuntersuchungen ergaben derartig abweichende Ergebnisse bei dem Vergleich von HER2-FISH-Analysen, wie z.B. 28% (Lebeau et al., 2001), 21% (Pauletti et al., 2000), 18% (Onitilo et al., 2009), 31.9% (Plaza et al., 2009) oder 11% (Ge et al., 2009). Unsere Resultate machen die Schwierigkeiten bei der ESR1-FISH-Analyse deutlich. Die geringe Länge der ESR1-Amplikone (oft nur ESR1 als einziges Gen beinhaltend) führt zu geringen Abständen zwischen den Gen-Signalen, so dass zusätzliche ESR1-Kopien oft räumlich schwierig voneinander abzugrenzen sind, was ihre Zählung erschwert. Häufig sind diese „amplifizierten“ Zellen vor allem durch die insgesamt größere Ausdehnung der ESR1-Signale erkennbar, die erst nach genauer Betrachtung und manchmal nur in ausgewählten Zellarealen voneinander abgegrenzt und gezählt werden können. Der Einfluss der Länge von ESR1- und HER2-Amplikonen auf die mikroskopisch sichtbaren Amplifikationsmuster ist in Abbildung 6 und 7 schematisch dargestellt.

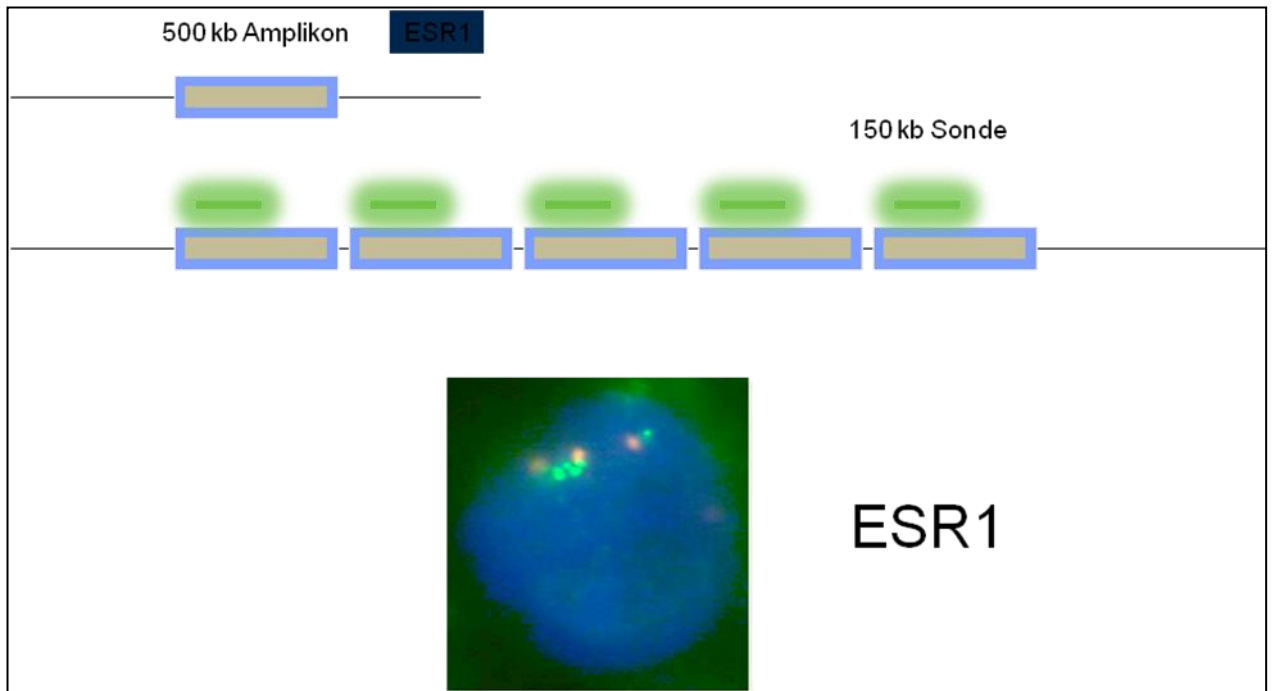


Abb. 6: Beziehung zwischen der Länge der ESR1-Amplikone und der mikroskopisch sichtbaren Amplifikation

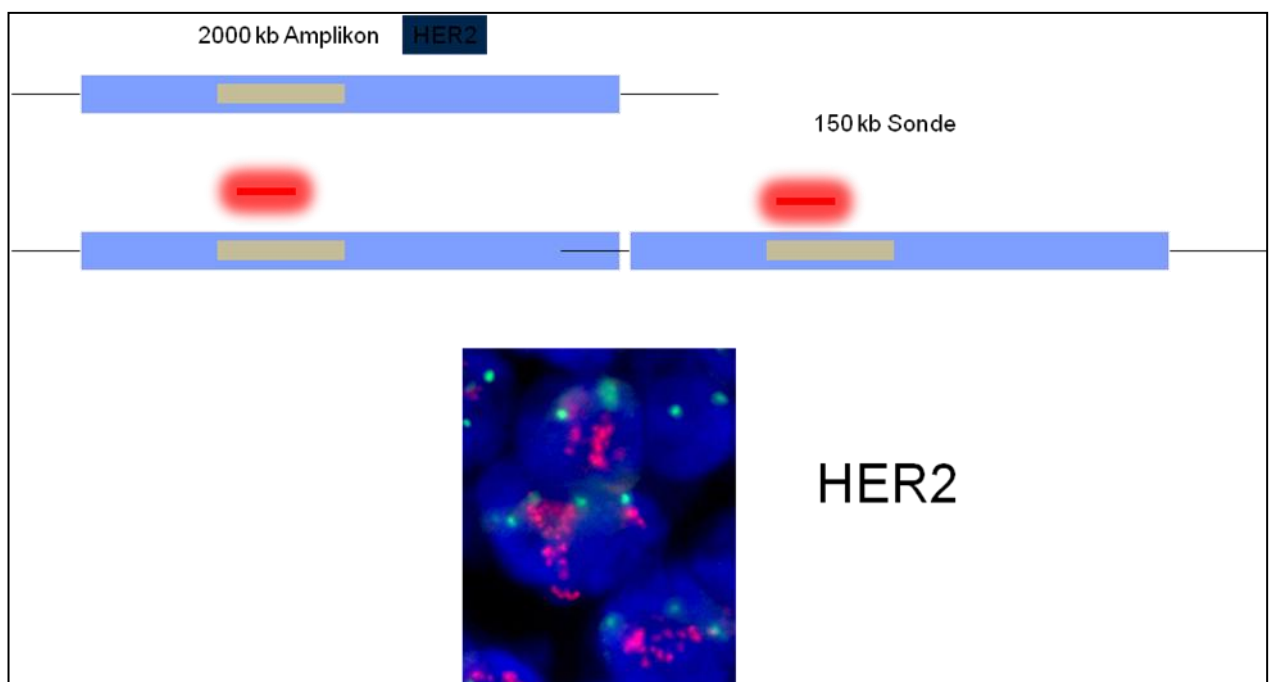


Abb. 7: Beziehung zwischen der Länge der HER2-Amplikone und der mikroskopisch sichtbaren Amplifikation

Die Schwierigkeiten bei der Interpretation werden auch in den Abbildungen 3 a-d, welche Original-FISH-Bilder aus unserer Studie zeigen, deutlich. Ein weiterer komplizierender Faktor für die Analyse ist die Qualität der FISH-Probe. Die Untersuchungen wurden mit einer selbst hergestellten FISH-Sonde durchgeführt. Es bleibt zu hoffen, dass die Interobserver-Schwankungen durch bessere Proben noch etwas vermindert

werden könnten. In unseren Untersuchungen waren jeweils 84.6% bzw. 71.7% der Tumoren auswertbar. Trotz des Erfahrungsunterschiedes zwischen den beiden Auswertern könnte die höhere Häufigkeit von Amplifikationen in dem Experiment mit weniger auswertbaren Fällen auch dadurch bedingt sein, dass Tumoren mit mehr ESR1-Signalen eher als auswertbar klassifiziert werden könnten als Tumoren mit nur 2 ESR1-Signalen. Diese Möglichkeit wird auch dadurch unterstützt, dass nicht auswertbare Fälle meistens durch fehlende ESR1-Signale bedingt sind, während die Zentromer 6-Signale noch erkennbar sind.

Unabhängig von den beobachteten Schwierigkeiten der Auswertung machen die Ergebnisse auch deutlich, dass die von Holst et al. publizierte „ESR1-Amplifikation“ offensichtlich biologische Relevanz hat. Unabhängig vom Untersucher und unabhängig davon, ob die Östrogenrezeptor-Immunhistochemie an Tissue-Microarrays oder an Grossschnitten durchgeführt wurde und welcher Antikörper verwendet wurde, bleibt eine signifikante Assoziation der ESR1-Amplifikation mit der Proteinexpression bestehen. Die Beziehung zwischen Amplifikation und Überexpression wird insbesondere dann deutlich, wenn rigorose Kriterien für die Amplifikation angewendet werden, z.B. die Klassifikation als Amplifikation durch zwei verschiedene Untersucher nach zwei unterschiedlichen FISH-Experimenten (Abbildung 4).

Angesichts dieser deutlichen Daten erstaunt die fehlende Reproduzierbarkeit der ESR1-Amplifikation in mehreren renommierten Laboratorien (Brown et al., 2208), Vincent-Salomon et al., 2008), Horlings et al., 2008), Reis-Filho et al., 2008). Bei genauere Betrachtung der Studien, welche keine oder kaum ESR1-Amplifikationen in Mammakarzinomen fanden, werden die diskrepanten Befunde durchaus verständlich.

Da es sich offensichtlich als schwierig erweist ESR1-Amplifikationen zu entdecken, werden nachfolgend die CGH (Comperative Genomic Hybridization) und qPCR (quantitative Polimerase Chain Reaction) der FISH und CISH (Chromogenic in situ Hybridization) gegenüber gestellt.

Die CGH und die qPCR haben beide den Nachteil, dass die DNA vor der Analyse aus dem Gewebe isoliert werden muss. Zwar gelten beide Methoden als sensitiv und durchaus geeignet, um auch geringgradige Kopiezahlveränderungen zu detektieren. Allerdings gilt dies im Wesentlichen nur unter optimalen Bedingungen. Bei einer heterogenen Zellpopulation, wie sie typischerweise in Tumoren vorkommt, können Nicht-tumorzellen das Ergebnis massiv beeinflussen. So kommen in Tumorgewebeproben

typischerweise neben den Tumorzellen auch andere Zelltypen wie Lymphozyten, normale Epithelzellen, Muskel- und Fettgewebe, Nerven oder Blutgefäße vor. Im Allgemeinen wird ein Tumorzellgehalt von mindestens 70% als ausreichend für PCR-Analysen angesehen. Im speziellen Fall von ESR1 ist es allerdings gut möglich, dass bereits bei nur 30% kontaminierenden Nichttumorzellen in der Gewebeprobe die Amplifikation nur noch schwer detektiert werden kann. Dies liegt an der nur geringgradigen Kopiezahlerhöhung, die wir typischerweise in den ESR1-amplifizierten Tumoren finden. Durch die Verdünnung der Tumorzell-DNA durch DNA aus den normalen Zellen kann es leicht zu einem Unterschreiten des Schwellenwertes für Amplifikation kommen. In einer optimalen Situation, d.h. 100% Tumorzellen, würde sich bei einem typischen ESR1-amplifizierten Tumor mit 5 Kopien des ESR1-Genes eine Ratio zwischen dem ESR1-Gen und einem nicht amplifizierten Referenzgen von 2.5 ergeben (5 ESR1-Kopien geteilt durch 2 Referenzgenkopien gleich 2.5). Bei nur 70% Tumorzellgehalt würde hierbei nur noch eine Ratio von 2.05 resultieren. Würde man in diesem Fall 100 Zellen auswerten, so ergäbe sich folgende Kalkulation: 70 Zellen hätten 5 ESR1-Kopien und 30 Zellen hätten 2 ESR1-Kopien, d.h. insgesamt 410 ESR1-Kopien in den 100 Zellen. Für das Referenzgen würden sich $100 \times 2 = 200$ Genkopien ergeben. Die resultierende Ratio wäre 410 geteilt durch 200 gleich 2.05. Da in qPCR-Studien typischerweise eine Ratio von 2.0 als Schwellenwert für die Diagnose einer Amplifikation angenommen wird, würde im gewählten Beispiel bei 70% Tumorzellgehalt die Amplifikation nur noch gerade so festgestellt werden können. Bereits eine etwas höhere Kontamination mit Normalzellen würde die Ratio unter den Schwellenwert 2.0 fallen lassen, wodurch der Fall als nicht amplifiziert beurteilt werden müsste. Hier können bereits Kleinigkeiten eine wichtige Rolle spielen. So zeigt zum Beispiel Reis-Filho et al., dass bereits die Wahl eines ungeeigneten Referenzgenes das qPCR-Ergebnis ungünstig beeinflussen kann. Ungünstig bedeutet in diesem Fall, dass die Genkopiezahl des Referenzgenes nicht exakt gleich 2 ist. Da Tumoren oftmals genetisch instabil sind, mit Zugewinnen und Verlusten auf vielen Chromosomen, kann es nur schwer ausgeschlossen werden, dass nicht auch das Referenzgen Kopiezahlveränderungen aufweist und somit das qPCR-Ergebnis verfälscht. Um das Risiko zu minimieren, geringgradige Amplifikationen zu übersehen, muss also der Tumorzellgehalt in der Probe möglichst hoch gehalten werden. Hierzu bietet sich die Methode der LCM (Laser Capture Mikrodissektion) an. Hiermit können unter mikroskopischer Kontrolle gezielt ausschließlich die Tumorzellen aus dem Gewebe isoliert werden. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Untersuchung nach LCM in 12 von 28 (42.8%) der Tumoren, die mittels FISH-Analyse eine Amplifikation zeigten auch mit der qPCR die Amplifikation bestätigt werden. Extrapoliert man diesen Wert auf das Gesamtkollektiv mit etwa 20%

Amplifikation nach FISH-Analyse, so müssten sich also ca. 40% dieser 20%, das heißt 8-9% der ESR1-Amplifikationen auch mit PCR nachweisen lassen. Tatsächlich passt dieser Wert gut zu den Ergebnissen von Reis-Filho et al., der nach Laser Capture Mikrodisektion mit CGH 4.3% Amplifikation und 7.1% Gains, das heißt geringgradigere Zugewinne die nicht den Schwellenwert für eine Amplifikation erreichen, nachgewiesen hat. Vincent-Salomon et al. hingegen, die in ihrer Studie ebenfalls CGH allerdings ohne Laser Capture Mikrodisektion angewendet hatten, fanden nur 0.9% ESR1-Amplifikationen. Offensichtlich kann also nur ein relativ kleiner Bruchteil der ESR1-amplifizierten Tumoren, nämlich solche mit hochgradigen Amplifikationen, sicher mit der CGH nachgewiesen werden, wenn die Tumorzellen vorher nicht durch Laser Capture Mikrodisektion angereichert worden sind.

Dass dieses Problem jedoch nicht nur grundsätzlich auf das ESR1 zutrifft, zeigt die Studie von Brown et al. Die Autoren stellen unter anderem eine Metaanalyse von Studien vor, die das gut bekannte HER2-Amplikon mittels Array-CGH untersucht haben. Sogar hier zeigt sich eine Spanne von 7-35% HER2-Amplifikation. Angesichts der hervorragend dokumentierten Häufigkeit von etwa 10-15% HER2-Amplifikationen in Mammakarzinomen mittels FISH in zahlreichen Untersuchungen wird deutlich, dass die Array-CGH zur Quantifizierung von Genkopiezahlveränderungen in Tumorgewebe n möglicherweise nicht immer optimal geeignet ist. Anders ist hier die Situation für in situ Analysen wie FISH oder CISH, die die Genkopiezahl direkt im Zellkern nachweisen. Vor allem die FISH gilt heute als der Goldstandard für Genkopiezahlbestimmungen in Tumoren.

Umso überraschender ist es in diesem Zusammenhang, dass auch mit FISH und CISH stark abweichende Ergebnisse zwischen 1% (Brown et al.) bis 22% (Tomita et al., 2009) ESR1-Amplifikationshäufigkeit berichtet wurden. Es ist gut denkbar, dass diese Diskrepanzen vor allem durch die geringe Größe des ESR1-Amplikons verursacht werden.

Mittels CISH anstelle von FISH kann die Erkennung von kleinen Genanhäufungen hingegen erschwert werden, da bei der CISH in der Regel größere Signale als in der FISH produziert werden. Ein weiteres Problem liegt in der Größe der FISH-Sonde. Wenn größere Sonden verwendet werden, kann es durchaus vorkommen, dass ein erheblicher Anteil der niedrigpotenten Amplifikationen übersehen wird.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass ein besseres Verständnis der technischen Probleme, in der Entdeckung von ESR1-Genkopiezahlen wohl der Schlüssel ist, um die wahre Häufigkeit von ESR1-Amplifikationen in Mammakarzinomen zu erfassen.

Die Konkordanz der immunhistochemischen Befunde war in diesem Projekt deutlich besser ausgeprägt als diejenige der FISH-Untersuchung. Dies spricht im vorliegenden Fall der Östrogenrezeptor-Messung für eine hohe Zuverlässigkeit der Immunhistochemie. Allerdings muss auch hier konstatiert werden, dass in 53 von 769 Fällen therapierelevante Unterschiede auftraten (6.9%). Insgesamt 9 (9.18%) Tumoren wurden am Grossschnitt mit dem Novocastra-Antikörper als rezeptorpositiv beurteilt, welche am Tissue-Microarray mit dem DAKO-Antikörper als rezeptornegativ beurteilt wurden. Umgekehrt wurden 61 Fälle (39.6%) am Tissue-Microarray mittels DAKO-Antikörper positiv gemessen, aber nicht an Grossschnitten mit dem Novocastra-Antikörper. Obwohl der prozentuale Anteil dieser Diskrepanzen gering ist, ist es unbefriedigend zu akzeptieren, dass 6.9% der Mammakarzinom-Patientinnen aufgrund von methodischen Problemen eine möglicherweise falsche Therapie verordnet bekommen. In Deutschland (55.000 Neuerkrankungen pro Jahr) würde ein technischer Fehler in 6.9% der Fälle immerhin potentiell zu einer Fehlbehandlung von 3795 Patientinnen pro Jahr führen. Die Tatsache ist, dass 61 Fälle am Tissue-Microarray positiv sind, jedoch nicht an Grossschnitten illustriert wurden und dass die beschriebenen Diskrepanzen nicht nur durch die kleinere untersuchte Gewebemenge am Tissue-Microarray bedingt sind. Noch größer sind die methodischen Probleme bei der HER2-Immunhistochemie. Hier werden weltweit ca. 20% der für eine Herceptin-Therapie qualifizierenden 3+Befunde mittels FISH-Untersuchungen nicht bestätigt (Press et al., 2007). Da in Zukunft wahrscheinlich die Zahl der therapierelevanten Marker-Untersuchungen ansteigen wird, besteht eine hohe Notwendigkeit zur Verbesserung der Standardisierung von molekularen Diagnoseverfahren, insbesondere im Bereich der Pathologie.

Insgesamt zeigen die Resultate unserer Untersuchung, dass vermehrte ESR1-FISH-Signale beim Mammakarzinom häufig sind und eng mit der Expression von Östrogenrezeptor α -Protein assoziiert sind. Diese Befundkonstellation passt gut zum Vorliegen von geringgradigen ESR1-Gen-Amplifikationen als Ursache für eine Östrogenrezeptor-Überexpression. Der Nachweis von ESR1-Amplifikationen ist nach entsprechender Einarbeitung manuell mit vernünftiger Reproduzierbarkeit möglich. Für die klinische Anwendung muss die DNA-Diagnostik aber noch weiter verbessert werden, z.B. durch die Entwicklung besserer FISH-Proben.

5 Zusammenfassung

Der Östrogen-Rezeptor α (Protein ER, Gen ESR1) ist das wichtigste Therapieziel beim Mammakarzinom. Amplifikationen des ESR1 Genes wurden in einer ersten Studie in

ca. 20% von Mammakarzinomen beschrieben und waren mit einer besonders guten Prognose in solchen Tumoren assoziiert, die mit dem ER-Inhibitor Tamoxifen behandelt wurden. Diese Daten deuten auf eine potentiell hohe klinische Relevanz der ESR1-Amplifikation. Nachfolgende Studien zeigten jedoch zum Teil erhebliche Diskrepanzen (0%-22%) beim Nachweis der ESR1-Amplifikation, sowohl mit Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH) als auch mit anderen Methoden. Das Ziel der Studie war es, die Reproduzierbarkeit des Nachweises der ESR1-Amplifikation mit FISH zu überprüfen.

Dazu wurde im ersten Versuchsschritt ein Gewebe-Mikroarray (Tissue Microarray, TMA) mit 814 Mammakarzinomen auf Amplifikation und Expression des ESR1-Genes analysiert. Die Auswertung der FISH-Analyse wurde unabhängig von zwei Personen durchgeführt. Der Vergleich beider Auswertungen bestätigte, dass die ESR1-Amplifikation häufig (Auswerter A: 23.9%; Auswerter B: 30.9%) vorkommt und signifikant mit der ER-Expression assoziiert ist ($p < 0.0001$ für beide Auswerter). Es zeigten sich aber auch erhebliche Unterschiede beim direkten Vergleich der beiden Analysen. Bei immerhin 64 von 523 (12%) Tumoren, für die ESR1-Daten aus beiden Analysen vorhanden waren, zeigte sich ein stark abweichendes Resultat, wobei Auswerter A in 51 Fällen eine Amplifikation interpretierte, während Auswerter B diese Fälle als nicht-amplifiziert einschätzte. Umgekehrt diagnostizierte Auswerter A 13 Tumoren als normal, die nach Auswerter B eine ESR1-Amplifikation aufwiesen. Eine detaillierte Betrachtung der Ergebnisse erbrachte, dass in der Hälfte (34 Fälle) der diskrepanten Fälle lediglich geringfügige Unterschiede in der ESR1-Kopiezahl zu einer unterschiedlichen Klassifizierung (amplifiziert versus nicht-amplifiziert) geführt hat. Von 23 Tumoren mit besonders starken Abweichungen der gezählten ESR1-Kopiezahl wurde im zweiten Teil der Studie die Analyse an konventionellen Grossschnitten wiederholt, um anhand der höheren Gewebemenge ein endgültiges Ergebnis zu erhalten. Es bestätigte sich auch hier, dass „Grenzbefunde“ mit 2-4 ESR1-Genkopien in 13 Fällen die Hauptursache für die Abweichungen darstellten. Nur 4 Fälle, die Auswerter A als amplifiziert oder nicht-amplifiziert eingestuft hatte, stellten sich als echte „Fehldiagnose“ heraus, während 10 weitere Fälle, die Auswerter A als nicht-amplifiziert, aber Auswerter B als amplifiziert eingestuft hatte, in der Grossschnitt-Analyse als tatsächlich schwer zu beurteilende Grenzbefunde mit 2-4 Genkopien auffielen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die in der Mehrzahl der ESR1-amplifizierten Tumoren nur geringfügige absolute Kopiezahlerhöhung, zusammen mit den für andere Gene etablierten Auswertekriterien, die Hauptursachen für die zum Teil erheblichen – und für FISH-Analysen eher untypischen – Diskrepanzen in der publizierten Literatur

zur ESR1-Amplifikation beim Mammakarzinom darstellen. Eine solche geringfügige Amplifikation ist bei anderen klinisch relevanten amplifizierten Genen (wie z.B. HER2 oder TOP2A), für welche die gängigen Auswertekriterien aufgestellt wurden, jedoch praktisch nicht vorhanden. Für eine mögliche ESR1-basierende Diagnostik sollten daher neue Standards und Verfahren etabliert werden, die der speziellen Situation der meist nur geringfügigen ESR1-Amplifikation beim Mammakarzinom besondere Rechnung tragen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AMP	Amplifikation
ASCO	American Society of Clinical Oncology
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CISH	Chromogenetik-in-situ-Hybridisierung
DNA	Desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure (DNS)
ER	Estrogen receptor = Östrogenrezeptor
ESR1 und 2	Isoformen des Östrogenrezeptors
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GS	Grossschnitt
HER2	Human epidermal growthfactor receptor 2 = humaner epithelialer Wachstumsfaktorrezeptor 2
IHC	Immunhistochemie
LHRH	luteinizing hormone-releasing hormone
RNA	Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure (RNS)
SERDs	selektiver östrogenrezeptor-destabilisierender „Downregulator“
SERMs	selektive Östrogenrezeptormodulatoren
TMA	Tissue-Microarray

7 Literaturverzeichnis

Beatson J. , On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet*, 1896; 104–7; 162–5.

Boccardo F, Rubagotti A, Guglielmini P, Fini A, Paladini G, Mesiti M, Rinaldini M, Scali S, Porpiglia M, Benedetto C, Restuccia N, Buzzi F, Franchi R, Massidda B, Distante V, Amadori D, Sismondi P. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial. *Ann Oncol*. 2006 Jun;17 Suppl 7:vii10-4. PMID: 16760270.

Breastcancer.org, ohne Jahr und Seite. Online im Internet.

URL:<http://www.breastcancer.org/treatment/>, Stand: 21.05.2008, 16:19.

Brown LA, Hoog J, Chin SF, et al. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? *Nat Genet*, 2008;40:806-7; author reply 10-2.

Budzar A. Nabholz J.M. et al., *Proc ASCO* 2000; 19; 609A.

Coons AH, Creech HJ, Jones RN(1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47-200-202.

Cowley S.M., et al. (1999), *J. Steroid Biochem Mol Biol* 69: 165-175.

Dabbs D.J. et al. 2001. *Diagnostic immunohistochemistry*. Churchill Livingstone; New York, Edinburgh, London, Philadelphia 673p. ISBN 0- 443- 06566-7.

Deroo and Korach (2006) , *Journal of Clinical Investigation* 116: 561-570.

Dirix et al., *Proc ASCO* 2001; 20; 29A.

Eisen A, Trudeau M, Shelley W, Messersmith H, Pritchard KI. Aromatase inhibitors in adjuvant therapy for hormone receptor positive breast cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2007 Dec 28; [Epub ahead of print] PMID: 18164821.

Ejlertsen B, Vang Nielsen K, Bruun Rasmussen B, et al. Poster #402: Amplification of ESR1 may predict resistance to adjuvant tamoxifen in postmenopausal patients with hormone receptor positive breast cancer. San Antonio Breast Cancer Symposium; 2007; San Antonio, TX; 2007.

Ge Y, Sneige N, Eltorkey MA, Wang Z, Lin E, Gong Y, Guo M. Department of Pathology, The Methodist Hospital, Weill Medical College of Cornell University, Houston, TX 77030, USA. Breast Cancer Res. 2009;11(3):R28. Epub 2009 May 14.

Giovanni Pauletti, Suganda Dandekar, HongMei Rong, Lillian Ramos, HongJun Peng, Ram Seshadri, Dennis J. Slamon, From the Department of Medicine, Division of Hematology-Oncology, University of California at Los Angeles, UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA; and Flinders Medical Centre, Bedford Park, South Australia, Australia. Journal of Clinical Oncology, Vol 18, Issue 21 (November), 2000: 3651-3664.

Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Jänicke F, Sauter G, Simon R. Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. Nat Genet. 2007 May;39(5):655-60. Epub 2007 Apr 8. PMID: 17417639.

Horlings HM, Bergamaschi A, Nordgard SH, et al. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? Nat Genet 2008;40:807-8; author reply 10-2.

Howell A, Robertson JF, Quaresma Albano J, Aschermannova A, Mauriac L, Kleeberg UR, Vergote I, Erikstein B, Webster A, Morris C. Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmenopausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. J Clin Oncol. 2002 Aug 15;20(16):3396-403. PMID: 12177099.

Javois Lorette C., Immocytochemical Methods and Protocols. 2nd Edition. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Jonat Water, Mammakarzinom- aktuelle Diagnostik und Therapie, 1. Auflage- Bremen: UNI- MED, 2001 (UNI- MED SCIENE) ISBN 3-89599-478-2.

Lebeau Annette, Deimling Daniela, Kaltz Christine, Sendelhofert Andrea, Iff Anette, Luthardt Beate, Untch Michael, Löhrs Udo, Pathologisches Institut and Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Klinikum-GroBhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany. Journal of Clinical Oncology, Vol 19, Issue 2 (January), 2001: 354-363.

Ludwig Dr. med. F.H., ohne Jahr und Seite. Online im Internet.

URL: <http://www.brustkrebs-kompetenz.de>, Stand: 22.05.2008, 17:49.

Mouridsen H. et al., J Clin Oncol 2001, 19:2596-2606.

Mouridsen H, Keshaviah A, Coates AS, Rabaglio M, Castiglione-Gertsch M, Sun Z, Thürlimann B, Mauriac L, Forbes JF, Paridaens R, Gelber RD, Colleoni M, Smith I, Price KN, Goldhirsch A. Cardiovascular adverse events during adjuvant endocrine therapy for early breast cancer using letrozole or tamoxifen: safety analysis of BIG 1-98 trial. J Clin Oncol. 2007 Dec 20;25(36):5715-22. Epub 2007 Nov 12. PMID: 17998546.

National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement, November 2000, ohne Seite. Online im Internet.

URL:<http://consensus.nih.gov/2000/2000AdjuvantTherapyBreastCancer114html.htm>, November 1-3, 2000, Stand: 22.05.2008, 15:36.

Nembrot M, Quintana B, Mordoh J. Estrogen receptor gene amplification is found in some estrogen receptorpositive human breast tumors. Biochem Biophys Res Commun 1990;166:601-7.

Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN.

Department of Hematology/Oncology, Marshfield Clinic Weston Center, Weston, Wisconsin 54401, USA. Clin Med Res. 2009 Jun;7(1-2):4-13.

Osborne C.K., et al. Double-Blind, Randomized Trial Comparing the Efficacy and Tolerability of Fulvestrant Versus Anastrozole in Postmenopausal Women With Advanced Breast Cancer Progressing on Prior Endocrine Therapy: Results of a North American Trial. Journal of Clinical Oncology 2002; 20(16).

Paepke S. et al., European Breast Cancer Conference, Brussels 2000, Abstr. 179.

Peters and Khan (2003), Mol Endocrinol 13(2):286-296.

Plaza JA, Torres-Cabala C, Ivan D, Prieto VG.

Department of Dermatopathology, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030-4009, USA. J Cutan Pathol. 2009 Jul;36(7):729-33.

Press M.F., Finn R.S., et al.: Biomarker analysis of lapatinib with paclitaxel versus paclitaxel as firstline treatment in 580 patients with metastatic breast cancer. ECCO 14, Barcelona, Proffered papers: Breast cancer- advanced disease, Tuesday 25 September 2007. European Journal of Cancer Supplements 2007; 5 (4): 212.

Reis-Filho JS, Drury S, Lambros MB, et al. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? Nat Genet 2008; 40:809-10; author reply 10-2.

Robert-Koch-Institut (2006) Hamburg, ohne Jahr und Seite. Online im Internet.

URL:http://www.rki.de/clin_048/nn_203956/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Broschuer_e/kid_2006,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/kid2006.pdf, Stand: 18.05.2008, 15:21.

Robert-Koch-Institut, Hamburg, ohne Jahr und Seite. Online im Internet.

URL:http://www.rki.de/clin_048/nn_199850/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBE, Stand: 18.05.2008, 15:47.

Stierer, M. et al (1993), Ann Surg, 218:13-21.

Tomita S, Zhang Z, Nakano M, et al. Estrogen receptor alpha gene ESR1 amplification may predict endocrine therapy responsiveness in breast cancer patients. Cancer Sci 2009; in press.

Vincent-Salomon A, Raynal V, Lucchesi C, Gruel N, Delattre O. ESR1 gene amplification in breast cancer: a common phenomenon? Nat Genet 2008; 40:809; author reply 10-2.

Weed Susan S., Brustgesundheits. Naturheilkundliche Prävention und Begleittherapie bei Brustkrebs. Orlanda. ISBN 3-929823-47-0.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Tumor-Array-Herstellung

Abb. 2: Tissue-Micro-Array (TMA)

Abb. 3: Beispiele von ESR1-amplifizierten Tumorzellen

Abb. 4: Vergleich der 2 FISH-Analysen

Abb. 5: Vergleich der 2 TMA-Analysen mit dem Grossschnitt der 23 Tumore

Abb. 6: Beziehung zwischen der Länge der ESR1-Amplikone und der mikroskopisch sichtbaren Amplifikation

Abb. 7: Beziehung zwischen der Länge der HER2-Amplikone und der mikroskopisch sichtbaren Amplifikation

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Histologisch-pathologische Daten von 814 Mammakarzinomen

Tabelle 2: Diskordante Spots

Tabelle 3: ER IHC-Resultat Novocastra

Tabelle 4: ER IHC-Resultat DAKO

Tabelle 5: Vergleich der IHC-Resultate der beiden anti-ER-Antikörper

Tabelle 6: Vergleich der IHC-Resultate des GS/Novocastra-Experimentes mit den FISH-Befunden

Tabelle 7: Vergleich der IHC-Resultate des TMA/DAKO-Experimentes mit den FISH-Befunden

10 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die Möglichkeit, in dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf zu promovieren.

Ich danke PD Dr. rer. nat. Ronald Simon für seine Betreuung während der Promotion und für wertvolle Korrekturvorschläge beim Verfassen der Doktorarbeit.

Ich danke meinen Kooperationspartnern dem Facharzt für Pathologie Dr. Volker Scotland und seiner Frau für die aus deren Praxis in der Atonaer Strasse zur Verfügung gestellten Mammakarzinomproben und Patientendaten sowie für zahlreiche mikroskopische Erläuterungen zum Thema Brustkrebs.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Ronald Simon, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Franziska Reining und Frederik Holst für die zeitaufwendige Auswertungen der jeweiligen FISH-Hybridisierungen bedanken.

Ein Dankeschön geht zusätzlich an Frau Mirlacher und das Team für die immerwährende Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Labor.

Herzlich danken möchte ich meinem studentischen Kollegen und Mitstreiter Igor Schwab, der für ein angenehmes und freundschaftliches Arbeitsklima sorgte und mich stets zum Lachen brachte.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und Grosseltern, die mir stets Bestand leisteten und nie an mir oder meinem Erfolg zweifelten.

Zum Schluss danke ich besonders meinem Freund Tobias Labus, der wohl die meiste Geduld und Zeit mit mir aufwenden musste und mir oft bei technischen Problemen zur Seite stand.

11 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzlichen Gründen

12 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: S.Hofmann